

Н.Н. Немова Р.У. Высоцкая

Биохимическая индикация состояния рыб



Pb

Cd



Hg



pH

t°

НАУКА

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
КАРЕЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ**

**RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
KARELIAN SCIENTIFIC CENTRE
INSTITUTE OF BIOLOGY**

N.N. Nemova R.U. Vysotskaya

Biochemical indication of fish state



MOSCOW NAUKA 2004

Н.Н. Немова Р.У. Высоцкая

Биохимическая индикация состояния рыб



МОСКВА НАУКА 2004

УДК 59
ББК 28.693.32
Н50

Светлой памяти профессора
Виктора Сергеевича Сидорова
посвящается.

Ответственный редактор
доктор биологических наук М.И. ШАТУНОВСКИЙ

Рецензенты:
член-корреспондент РАН А.Ф. ТИТОВ,
доктор биологических наук Л.П. РЫЖКОВ

Работа выполнялась при финансовой поддержке грантов Президента РФ “Ведущие научные школы” (НШ-894.2003.4), программы ОБН “Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами” (№ 10002-251/ОБН-02/151-433/200404-098), грантов РФФИ (98-04-48482, 01-04-48050, 02-04-48451, 03-04-58683, 03-04-58684)

Немова Н.Н.

Биохимическая индикация состояния рыб / Н.Н. Немова, Р.У. Высоцкая; отв. ред. М.И. Шатуновский; Ин-т биологии КарНЦ РАН. – М.: Наука, 2004. – 215 с.

ISBN 5-02-032891-X

Монография включает обзор результатов многолетних исследований и имеющихся в мировой, отечественной литературе данных по проблемам экологической биохимии рыб и некоторых других гидробионтов. Рассмотрены вопросы эколого-биохимического тестирования состояния гидробионтов при воздействии экологических (в том числе антропогенных) факторов среды на водоемы в природных условиях и условиях аквариальных экспериментов. Представленная новая информация вносит вклад в решение фундаментальных и прикладных аспектов проблемы биоиндикации водных экосистем.

Для исследователей, работающих в области экологии, биохимии, ихтиологии, гидробиологии, наук об окружающей среде, преподавателей вузов, аспирантов, студентов биологических специальностей.

ТП 2004-II-81

Nemova N.N.

Biochemical indication of fish state / N.N. Nemova, R.U. Vysotskaya; Ed. by M.I. Shatunovsky. – Moscow: Nauka, 2004. – 215 p.

ISBN 5-02-032891-X

The book includes the review of long-term own research and those from the literature on the fish environmental biochemistry. Ecologo-biochemical indication of fish status under effects of environmental and man-caused factors in natural and laboratory conditions is considered. New data presented in the book contributes to the fundamental and applied studies of biochemical indication of water ecosystems. The book is interest to specialists in biochemistry, ichthyology, hydrology, ecology, and for teachers, post-graduates and students studying biology.

The book can be used for reading the course on environmental biochemistry in universities.

ISBN 5-02-032891-X

© Российская академия наук, 2004
© Редакционно-издательское оформление. Издательство “Наука”, 2004
© Немова Н.Н., Высоцкая Р.У., 2004

ВВЕДЕНИЕ

Современная экология как наука о жизни биосферы включает в себя исследования, переплетающиеся с тематикой различных областей естествознания. В последние два десятилетия появилось новое направление исследований, которое называется “экологическая биохимия”. По решаемым задачам она ближе к экологической физиологии (Карпевич и др., 1979; Строганов, 1979; Слоним, 1971; Харборн, 1985), а по методам является разделом прикладной биохимии. Предметом экологической биохимии является исследование общих механизмов, с помощью которых происходят биохимические адаптации организма к изменению среды, а также изучение биохимических механизмов биотрансформации, в т.ч. детоксикации ксенобиотиков. Существует немало экологических проблем, для понимания и правильной интерпретации которых необходимо использование достижений и методологии биологической химии. Следует отметить, что многие метаболические процессы у животных и растений удалось объяснить только с помощью экологического подхода (Харборн, 1985; Остроумов, 1986; Телитченко, Остроумов, 1990; Немова, 1994, 1996). Необходимость выделения экологической биохимии в самостоятельное направление стала особенно ясной после выхода в свет работы П. Хочачки и Дж. Сомеро “Стратегия биохимической адаптации” (1977), в которой предельно четко сформулированы главные и специфические проблемы этого направления биохимической науки. Позднее, в 1984 (в русском издании – в 1988 г.) эти же авторы представили еще один фундаментальный труд “Биохимическая адаптация”.

Экологическая биохимия рыб – направление исследований, возникшее в пограничной области между биохимией, ихтиологией, физиологией и экологией рыб. Рыбы – это многочисленные по видовому составу, разнообразная по экологии группа пойкилотермных позвоночных животных, у которых легче, чем у теплокровных устанавливается взаимосвязь организма и среды. Многочисленные данные свидетельствуют о значительных вариациях биохимического статуса рыб под влиянием различных

экологических факторов, в том числе химических загрязнений. Эти изменения могут носить адаптивный характер, а могут быть результатом патологических процессов, приводящих к гибели рыб. Арсенал методов для выявления эффекта различных воздействий на состояние водных экосистем довольно разнообразен. Он включает гидрологические, гидрохимические, гидробиологические, ихтиологические, микробиологические, физиологические, гистохимические и другие методы анализа. Биохимические методы позволяют наблюдать изменения в обмене веществ в организме, наступающие, как правило, до появления физиологических, морфологических и других отклонений от нормы, дают возможность выявить границы адаптационных способностей, определить фазу воздействия (адаптация, предпатология, патология) и на основании этого делать выводы о степени устойчивости и чувствительности видов (Сидоров, Немова, 2000).

В последние три десятилетия различные группы биохимических показателей широко используются для оценки физиологического состояния рыб при влиянии самых разнообразных факторов среды (содержания кислорода, температуры, солености, химических загрязнителей и др.). 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 Малькольмом 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). У истоков развития этого направления в нашей стране стояли, прежде всего, отечественные ученые – Н.С. Строганов, П.А. Коржуев, Г.С. Карзинкин, А.Ф. Карпевич, которые пробудили у многих биологов интерес к эколого-биохимическим проблемам ихтиологии. В основном усилиями этих ученых в нашей стране была заложена традиция проведения научных конференций по экологической биохимии и физиологии рыб. Впервые идея о необходимости создания системы эколого-биохимического мониторинга и тестирования водоемов по состоянию рыб была предложена В.С. Сидоровым на первом симпозиуме по экологической биохимии рыб в 1987 г. А еще раньше проблему развития исследований по экологической биохимии гидробионтов обозначил академик Е.М. Кребс на биохимическом съезде в 1979 г. Заметный вклад в развитие этого направления исследований внесли известные ученые ихтиологи, гидробиологи, физиологи и биохимики – Ю.В. Наточин, М.И. Шатуновский, А.А. Нейфах,

Г.Е. Шульман, В.И. Лукьяненко, Н.Д. Озернюк, Л.Б. Кляшторин, М.А. Щербина, А.Я. Маляревская, И.Н. Остроумова, Л.П. Рыжков, Г.Г. Новиков, И.А. Баранникова, И.А. Остроумова и другие.

К настоящему времени в области биохимии рыб накоплен огромный материал, который теоретически еще недостаточно полно проанализирован и осмыслен. Например, часто нет ясности того, по каким принципам отбираются те или иные биохимические тесты для оценки состояния рыб в конкретных экологических ситуациях. Чаще всего число этих тестов очень небольшое (3–5, не более 10). Кроме того, известно, что обычно при комбинированном воздействии экстремальных факторов результаты определения биохимических показателей существенно отличаются от тех, которые наблюдаются при влиянии каждого фактора в отдельности. Поэтому перед экологической биохимией стоит проблема выбора среди многих возможных одной или нескольких схем анализа обмена веществ рыб, которая позволила бы ответить на такие вопросы как:

- на каком уровне происходит биохимическая адаптация к изменяющимся условиям среды;
- не вызывают ли эти факторы каких-либо биохимических сдвигов, выходящих за пределы адаптационных возможностей организма и угрожающих его существованию.

Решение многих практических задач в современной ихтиологии, рыбоводстве, токсикологии во многом зависит от создания и разработки информативной, логичной, емкой, экспериментально проверенной системы биохимической индикации и мониторинга состояния рыб. Такого рода исследования важны как для выяснения механизмов развития приспособительных реакций у рыб в ответ на воздействие разнообразных факторов среды, так и для прогноза возможных изменений ихтиофауны в водоеме. Они могут дать полезную информацию для научного обоснования и рыбохозяйственных мероприятий.

Глава 1

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ОРГАНИЗМА И СРЕДЫ

1.1. БИОХИМИЧЕСКИЕ АДАПТАЦИИ

1.1.1. Общие сведения об адаптациях

Проблема устойчивости организма, его адаптации к изменяющимся факторам среды остается одной из центральных проблем биологии. В историческом плане адаптации рассматривались такими эволюционистами, как А.Н. Северцов, И.И. Шмальгаузен, К.М. Завадский, С.С. Шварц, Е.М. Крепс и др. Г.Л. Шкорбагов (1971; 1973) дает определение адаптации как совокупности реакций биологической системы, поддерживающих ее функциональную устойчивость при изменении условий окружающей среды. Однако в результате адаптации системы должны обладать возможностью дальнейшего развития. Удачным можно назвать определение адаптации, данное в книге “Философские проблемы адаптации” (1975). Авторы рассматривают адаптацию как целостную систему реакций живых систем, имеющих активный направленный характер, способствующих не только поддержанию динамического равновесия в данных условиях среды, но и обеспечивающих возможность эволюции при их изменении (Путинцев, 1981). Понятие адаптации охватывает широкий круг вопросов приспособления организма к условиям среды. Проблема механизмов приспособления к условиям среды стоит в центре многих общеприродных дисциплин, поскольку она затрагивает ряд фундаментальных свойств живых организмов. Несмотря на большое разнообразие типов, уровней, механизмов адаптаций, их можно рассматривать как переходный процесс, вызванный сменой среды или отдельных ее факторов: переход живой системы любого уровня организации из одного устойчивого состояния в другое (Озернюк, 2003).

Каждый организм живет в многокомпонентной среде обитания, которая в каких-то пределах всегда изменяется и организм

постоянно к ней приспосабливается. Одни виды обладают узкой, другие – широкой приспособляемостью. Необходимо уделять внимание изучению всех сторон и уровней этого процесса. Адаптация рассматривается как способность живых организмов приспособляться к изменяющимся условиям окружающей среды с одновременным повышением вероятности выживания и самовоспроизведения (Слоним, 1971; Одум, 1975; Хочачка, Сомеро, 1977, 1988; Меерсон, 1981; Бергер, 1986; Озернюк, 1992, 2000а, 2000б, 2003).

Важнейшей особенностью адаптаций является их относительный характер, в соответствии с которым организм или популяция лучше или хуже приспособлены к конкретному типу природной среды в данный момент. При изменении условий среды или значения того или иного экологического фактора состояние адаптированности может измениться и ранее адаптивные признаки перестанут быть таковыми. Существенными признаками приспособительных процессов являются: системный характер, фазность и цена адаптации, включающая размер затрат ресурсов организма или популяции на приспособление к новым условиям (Хочачка, Сомеро, 1977, 1988).

Адаптации к условиям окружающей среды, как универсальное биологическое явление формируются и проявляются на самых различных уровнях биологической организации, – от молекулярного до биоценотического. На поведенческом уровне организмы действуют обычно таким путем, который, по всей видимости, увеличивает их шансы на выживание в данной среде и использование этой среды. На анатомическом уровне структуры организма часто обнаруживают очевидное соответствие его образу жизни. На физиологическом уровне способы осуществления жизненных функций нередко отражают те внешние условия, с которыми сталкивается данный вид.

Различные вопросы адаптаций, их классификации, определения, типы достаточно хорошо и подробно освещены в различных монографиях отечественных и иностранных специалистов (Слоним, 1971; Большаков, 1972; Хлебович, 1974, 1981; Проссер, 1977; Тимофеев-Ресовский и др., 1977; Бергер, 1986; Озернюк, 2000, 2003; Precht, 1958; Precht et al., 1973). Мы не будем на них останавливаться, так как целью наших исследований являются “биохимические адаптации”, наиболее полно обсуждаемые в трудах П. Хочачки и Дж. Сомеро (1977, 1988). Авторы сосредоточили внимание на биохимических механизмах, определяющих качественное и количественное своеобразие метаболических функций организмов.

Биохимические изменения адаптивны большей частью на уровне основных метаболических функций и поэтому макроскопически не проявляются. Успешная адаптация ферментных систем, мембран, дыхательных пигментов и т.п. к тем или иным условиям среды еще не говорит об идентичности этих систем у различных организмов, даже если внешние адаптивные признаки у них сходны. Для того чтобы выявить эти особенности в адаптации биохимических систем, авторы рассмотрели вначале те биохимические структуры и функции, которые абсолютно необходимы для всех живых систем и проявляют чувствительность к изменениям факторов среды. Это относится, прежде всего, к биохимическим адаптациям, направленным:

- на сохранение целостности и функциональной активности макромолекул (нуклеиновых кислот, ферментов, структурных и kontraktilных белков) и надмолекулярных комплексов (хроматина, хромосом, рибосом, мембран);
- на обеспечение организма источниками энергии и питательными веществами, используемыми для биосинтеза белков, нуклеиновых кислот, углеводов и липидов, составляющих ткани организма и являющихся запасами питательного материала;
- на поддержание регуляторных механизмов обмена веществ и его изменений в зависимости от непостоянных условий среды. (Хочачка, Сомеро, 1977, 1988).

Эти фундаментальные функции необходимы всем живым системам, в каких бы условиях они не находились. Поскольку метаболическая активность организмов находится в строгой зависимости от таких макромолекул, как ферменты и нуклеиновые кислоты, процессы адаптации должны сводиться к тому, чтобы функции макромолекул были такого типа и осуществлялись с такими скоростями, при которых жизненные процессы организма протекали бы удовлетворительно, несмотря на помехи со стороны окружающей среды. В процессе адаптации организм достигает векторного гомеостаза метаболических функций. Выражение “векторный гомеостаз” подчеркивает то, что в процессе адаптации к внешней среде, как скорости, так и направления метаболических реакций “настраиваются” таким образом, чтобы организм непрерывно получал необходимые ему продукты (Хочачка, Сомеро, 1988). Концепция гомеостаза, зачатки которой можно обнаружить еще в работах Клода Бернара, то есть более 100 лет назад, получила последовательное развитие в XX в. в теории У. Кэннона, согласно которой организмы способны поддерживать постоянство своей внутренней среды, несмотря на изменения окружающей среды (Слоним, 1971). Конечный результат

многих стратегий адаптаций состоит именно в поддержании гомеостаза. Следует отметить, что существуют и иные стратегии адаптации, не приводящие к постоянству состояния и даже не направленные на его поддержание. Например, фосфолипидный состав биомембран у организмов, приспособленных к холоду или теплу, различен. Существует представление, что во многих случаях поддерживается не состояние определенных структур, а их функция. Вязкость (текучесть) мембран хотя и изменяется с температурой, но таким образом, чтобы могли нормально функционировать мембраносвязанные ферменты, транспортные системы и гормоны. Результат адаптации в таком случае – не гомеостаз (постоянство состояния), а скорее “энантиостаз” (поддержание функции) (Хочачка, Сомеро, 1977, 1988). При всей сложности обмена веществ основных функций метаболизма очень немного. По сути дела клеточный метаболизм у всех организмов всегда выполняет задачи образования высокоэнергетических соединений, образования или получения извне достаточных количеств промежуточных веществ, необходимых для биосинтеза крупных молекул, генерирования биологических восстановителей, например, НАДФН, необходимых для восстановительных реакций, протекающих на определенных этапах различных метаболических путей. В результате сочетания трех перечисленных выше функций, организм должен синтезировать крупные молекулы, составляющие основу специфических биологических свойств живых систем. Над всеми этими метаболическими функциями или, точнее, над обуславливающими их последовательностями реакций надстроена эффективная система регуляции, приводящая каждый отдельный метаболический процесс, к строгому соответствию нуждам организма в целом. Ни один путь обмена не работает автономно, независимо от остального метаболизма клетки. Активность каждого метаболического пути и даже каждого из его регуляторных ферментов подвержена воздействию целой системы регуляторов, координирующих его работу с локальным химическим статусом клетки и, в конечном счете, с основными потребностями организма в целом. Эти регуляторные функции служат важными пунктами взаимодействия с внешней средой.

Следует заметить, что в действительности биохимическая адаптация часто является, по-видимому, крайним средством, к которому организм прибегает тогда, когда у него нет поведенческих или физиологических способов избежать неблагоприятного воздействия среды. Как правило, биохимическая адаптация – не легкий путь; часто оказывается проще найти подходящую среду путем миграции, чем перестроить химизм клетки. Регуляция ме-

таболизма осуществляется с помощью целой иерархии механизмов, заложенных в генах и реализующихся синтезом соответствующих белков.

В анализе процессов биохимической адаптации П. Хочачка и Дж. Сомеро выделяют три основных типа адаптивных механизмов или “стратегий”:

- приспособление макромолекулярных компонентов клеток или жидкостей организма;
- приспособление микросреды, в которой функционируют макромолекулы;
- приспособление на функциональном уровне, когда изменение эффективности макромолекулярных систем, в особенности ферментов, не связано с изменением числа имеющихся в клетке макромолекул или их типов.

Рассмотренные типы адаптивных ответов на уровне биохимического метаболизма не всегда четко разграничены, часто развитие в организме ответной приспособительной реакции включает все три вышеперечисленные стратегии (Хочачка, Сомеро, 1988). Первая стратегия биохимических адаптаций, связанная с изменением количества уже имеющихся макромолекул в клетке или с образованием их новых типов, реализуется на уровне изменений ферментных систем, во многих случаях тонкая регуляция каталитической способности ферментов имеет даже большее значение, чем просто высокая степень этой способности. Ферменты служат катализаторами и регуляторами биохимических процессов, и поэтому их конструкция должна быть гибкой для адаптации к огромному разнообразию функций. Ферментный аппарат можно рассматривать как своеобразное “сырье” для адаптивных процессов. Действию отбора подвергается целый ряд элементов этого аппарата (каталитическая эффективность, сродство фермента субстрату, существование изозимов, кооперативность, аллостерическая и стехиометрическая чувствительность к модуляторам, способность к фосфорилированию и т.д.). Наиболее быстрый адаптивный путь состоит в регулировании функциональной активности макромолекул, ранее синтезированных клеткой. Регулирующие факторы (сигналы) разнообразны по своей природе: это могут быть физические изменения внешних факторов (например, температуры или света) и разнообразные физиологические сигналы внутреннего происхождения (гормоны, электрические процессы). Такие сигналы могут изменять интенсивность метаболизма в целом и соотношение между отдельными, часто конкурирующими, путями метаболизма. Взаимодействие между каким-либо фактором среды и метаболиче-

ской активностью может быть очень резким или сравнительно медленным, в зависимости от того, на какой уровень иерархии метаболической регуляции поступает информация о данном факторе. Например, изменение на уровне транскрипции будет оказывать более медленное влияние на обмен веществ, чем прямое воздействие среды на активность уже существующего регуляторного фермента.

При рассмотрении биохимических адаптаций на уровне микросреды особо затрагивается роль липидного окружения, в котором функционируют многие ферменты, в особенности, связанные с мембранами. Липиды, не будучи “микромолекулами”, тоже могут подобно водной среде, окружающей растворимые ферменты, создавать микроокружение, благоприятное для функционирования белков. Известно, что процессы температурной адаптации сопровождаются существенными изменениями состава липидов. Аналогичные изменения, вероятно, происходят при адаптациях к перемене давления. При обсуждении процессов адаптаций, протекающих с участием мембранных липидов и осмолитов, следует учитывать процессы, обеспечивающие нужную величину рН в непосредственном окружении ферментов. Выбор этой величины и буферных систем для ее поддержания был, вероятно, важнейшей проблемой, которую пришлось решать живым организмам на заре клеточной эволюции. Это вытекает из того факта, что регуляция рН обнаруживается у всех исследованных к настоящему времени организмов (Слоним, 1971; Хочачка, Сомеро, 1977; Озернюк, 2000а, 2003; Shulman, Love, 2000). При надлежащей регуляции микроокружения макромолекул для адаптации организма к изменениям внешней среды может не требоваться какого-либо изменения самих макромолекул. Такое перенесение главной тяжести эволюционного процесса на плечи “микромолекул” означает, что скорость какого-то конкретного эволюционного процесса (например, освоения среды с иной соленостью) уже не будет лимитироваться возможной скоростью замены аминокислот в белках.

Механизмы биохимических адаптаций П. Хочачка и Дж. Сомеро подразделяют на два класса: компенсаторные и эксплуатативные. Если в результате воздействия какого-либо фактора в организме происходят биохимические изменения, приводящие к восстановлению функциональных способностей до их прежнего уровня, то такие адаптации называют “компенсаторными”. Если биохимические изменения открывают перед организмом новые возможности в использовании своей среды или освоении новой, то такой тип адаптации называют “эксплуатативным”.

Выбор того или иного механизма адаптации в значительной мере определяется требованиями к ее скорости. Чем больше времени предоставляется для адаптивных изменений, тем больше выбор возможных стратегий. По длительности адаптивного процесса различают три типа адаптации к внешним условиям – генетическая адаптация, акклимация и акклиматизация, и, немедленная адаптация. Скорость биохимической адаптации к какому-либо изменению среды будет зависеть от места осуществления этой адаптации в иерархии механизмов метаболической адаптации. Модуляция активности ферментов, уже функционирующих в клетке, иногда создает возможность почти мгновенной адаптации. В отличие от этого для активации и репрессии генов требуются часы, и даже дни. И, наконец, накопление в геноме новых последовательностей оснований ДНК, кодирующих адаптивные генные продукты, может потребовать несколько поколений. Таким образом, скорость адаптации должна быть, по-видимому, тесно взаимосвязана с использованным стратегическим механизмом адаптации.

1.2. ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКОЙ ИНДИКАЦИИ СОСТОЯНИЯ РЫБ В РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СИТУАЦИЯХ

1.2.1. Необходимость биохимической индикации состояния рыб

Жизнь в водоеме, в отличие от наземных условий, характеризуется большей зависимостью гидробионтов от факторов среды. Водные экосистемы, сообщества, организмы особо чувствительны к нарушению химического состава среды. Многие фундаментальные концепции современной биологии были установлены в процессе изучения водных организмов. С общеприродоведческих позиций рыбы, как одна из важнейших групп современных животных, представляют исключительный интерес, поскольку они характеризуются своеобразными особенностями физиологии и биохимии питания и дыхания (Коржув, 1979). Кроме того, рыбы являются наиболее удобными объектами в исследованиях, позволяющих установить степень влияния на живой организм различных факторов, в том числе токсикантов. Рыбы интегрируют неблагоприятные эффекты комплекса различных воздействий, имеют достаточно большие размеры и продолжительность жизни, обладают резистентностью к сублетальным воздействиям

различных веществ, могут быть использованы для прогноза различного рода воздействий на водные экосистемы и здоровье человека, употребляющего эту рыбу в пищу (Кашулин, 2000). Вместе с тем, при всей мощи биохимического аппарата, с помощью которого живые клетки защищаются от поллютантов, его возможности ограничены, что создает серьезные эколоксикологические и природоохранные проблемы. Рыбы характеризуются непрерывным ростом в течение всей жизни и способностью изменять его темп под влиянием внешней среды. Поэтому они испытывают воздействие изменяющейся многокомпонентной внешней среды на протяжении всего онтогенетического развития. На каждой стадии онтогенеза рыба может подвергаться экстремальным воздействиям. За последние десятилетия к обычным воздействиям на рыб (t° , pO_2 , pCO_2 , pH и др.) добавились токсические вещества – нефть и ее продукты, пестициды, детергенты, тяжелые металлы, органические соединения сточных вод и другие токсиканты, попадающие в водоемы (Строганов, 1979; Лукьяненко, 1967, 1983, 1987; Яблоков, Остроумов, 1985). Приспособляемость рыб к постоянно меняющейся среде – процесс сложный и многогранный. С момента возникновения и до наших дней рыбы, как и другие водные организмы, развивались в определенной среде, компоненты которой постоянно оказывали на них влияние. Вследствие этого происходил отбор тех особей, которые лучше всего существовали в этой среде. Норма, следовательно, формировалась, наследственно закреплялась на протяжении всей истории развития вида. Поэтому у современных рыб способность приспосабливаться к изменениям внешней среды в значительной степени определяется наследственными свойствами и в меньшей степени “тренировкой” каждой особи (Строганов, 1979).

В течение последних 30 лет в лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН разрабатываются различные аспекты эколого-биохимического тестирования и мониторинга (ЭБХМ) водоемов по биохимическому состоянию обитающих в них рыб. В многочисленных публикациях (Сидоров и др., 1990; 1995; Сидоров, Юровицкий, 1991; Биохимические методы..., 1993; Сидоров, Высоцкая, Такшеев, 1998; Высоцкая, Такшеев, 1999; Сидоров, Немова, 2000; Сидоров, Немова, Регеранд, 2000) рассматривались элементы и общая схема эколого-биохимического мониторинга водоемов. Эта схема была предложена и многократно апробирована для оценки реакции рыб на воздействие различных факторов среды, в том числе токсикологических (Зекина и др., 1987; Немова, Сидоров, 1990; Немова, 1992, 1996; Немова и др., 1994; 1999; Смирнов, Кирилук, 1994; Высоцкая,

Руоколайнен, 1996; Высоцкая, 1999; Богдан и др., 2000; Тойвонен и др., 2001; Kaivarainen et al., 1998). В этих исследованиях был использован большой спектр биохимических методов, позволяющий оценить вариабельность примерно 150–200 индивидуальных показателей белкового, липидного, углеводного, нуклеопротеинового обмена, энзиматического профиля организмов, тканей, клеток и субклеточных структур тканей рыб под влиянием таких факторов, как температура, освещенность, рН, изменения в питании, действие промышленных отходов, отдельных органических и неорганических соединений, в том числе тяжелых металлов, а также некоторых болезней рыб (некроз плавников, катаракта, гельминтозы, аэромонос, расслоение мышц и др.) (Третьяков и др., 1988; Физиолого-биохимический статус..., 1990; Биохимические особенности..., 1991; Высоцкая и др., 1994; Тойвонен, 1995; Немова, 1996; Богдан, Смирнов, 2000; Высоцкая, Каймина, Сидоров, 2000; Смирнов и др., 2000; Сидоров и др., 2000; Богдан и др., 2002; Мещерякова, 2002; Регеранд и др., 2002). Этой проблеме было посвящено уже немало публикаций (Лукьяненко, 1983, 1987; Флеров, 1989; Хоружая, 1989; Сидоров и др., 1990; 1995; Захаров, Кларк, 1993; Love, 1970; 1980).

Необходимость создания системы эколого-биохимического тестирования рыб пока еще не нашла соответствующего отражения в публикациях. К настоящему времени накоплены значительные материалы в области экологической биохимии рыб и других гидробионтов, в области водной токсикологии и ихтиотоксикологии, которые могут оказаться полезными при разработке методов и принципов эколого-биохимического мониторинга (Строганов, 1962; Юровицкий, Мильман, 1969; Баранникова, 1975; Лав, 1976; Лукьяненко, 1967; 1983; 1987; Метелев и др., 1971; Шульман, 1972; Наточин, Чапек, 1976; Рыжков, 1976; Проссер, 1977; Хочачка, Сомеро, 1977, 1988; Маляревская и др., 1978; Романенко, 1978; Маляревская, 1979; Романенко и др., 1980; Шатуновский, 1980; Крепс, 1981; Хлебович, 1981; Ведемейер и др., 1982; Кляшторин, 1982; Сорвачев, 1982; Биоэнергетика и рост..., 1983; Сидоров, 1983; Аминева, Яржомбек, 1984; Love, 1980). Разработка принципов эколого-биохимического мониторинга имеет междисциплинарный характер. Одной из сложнейших его задач является определение размеров биологической выборки, которая была бы достаточна для оценки состояния водоема с помощью биохимического тестирования. При решении этой задачи нельзя обойтись без знаний биологии и экологии отдельных гидробионтов. Применительно к этой проблеме могут быть полезны труды, обобщающие исследования ихтиологов и гидробиологов,

прежде всего отечественных (Шульман, 1972; Титова, 1973; Потапова, 1978; Смирнов, 1979; Решетников, 1980; Шустов, 1983, 1995; Шатуновский, 1980; Лукьяненко, 1967; 1983; 1987 и др.).

К сожалению, большинство данных, накопленных к настоящему времени в области экологической биохимии рыб и других водных организмов, имеют узкий (ограниченное число биохимических показателей для небольшого числа органов, если речь идет о рыбе, и небольшое число произвольно выбранных других гидробионтов), частный (для отдельных и очень немногих водоемов) и несистемный (во времени и пространстве как на организменном и популяционном, так и молекулярном уровнях) характер. При этом недостаточно учитываются достижения современной гидробиологии, свидетельствующие о наличии в водоемах сложнейших смесей органических и неорганических загрязнителей разной токсичности и возможности синергического и антагонистического их действия на живой организм, а также и данные современной биохимии, свидетельствующей о сложнейшей химической архитектонике живых организмов, что предполагает поиск важнейших и чувствительных биохимических тестов на токсические химические воздействия. Накопленные данные не могут быть настоящей основой для оценки экстремальных (в том числе антропогенных) воздействий на не менее сложную химическую систему живых организмов, состоящую из десятков тысяч различных макромолекул. Современная биохимия уже в тот период предоставляла в распоряжение исследователя огромные и еще должным образом не использованные возможности. Рекомендуемые в литературе (Колупаев, 1989; Кудрявцева, 1990; Кудрявцева, Шишкин, 1996) системы для мониторинга и тестирования водных объектов, как правило, включали не более 5–10 биохимических тестов. Предполагалось, что обмен веществ живых организмов представляет собой такой многокомплексный процесс, в котором все составляющие компоненты настолько тесно связаны друг с другом, что при каком-либо достаточно существенном изменении одного из них, независимо от его локализации в том или ином органе или ткани, обязательно произойдет нарушение состояния метаболизма в любом другом звене общей цепи. В этом случае использование сложных и многокомпонентных систем тестирования организма, состоящего из нескольких десятков (если не сотен) тысяч индивидуальных биополимеров (белков, углеводов, липидов), низкомолекулярных метаболитов и веществ, из которых образуются полимеры, было проблематично. Это достаточно распространенное мнение, к сожалению, с нашей точки зрения,

не соответствует действительности, и, по крайней мере, никем не подтверждено экспериментально. Об этом свидетельствует тот факт, что при медицинском обследовании населения число используемых биохимических тестов для диагностики патологических состояний из года в год увеличивается, достигая уже нескольких сотен в наиболее сложных случаях. И чисто теоретически, исходя из огромного числа разнообразных химических реакций, протекающих в живом организме, трудно представить, чтобы с помощью нескольких, часто достаточно случайно выбранных показателей, можно было бы оценить все возможные изменения в том поистине микроскопическом реакторе, которым является живая клетка и организм. Это особенно важно иметь в виду при проведении исследований по изучению влияния антропогенных химических загрязнений на биосистемы. Ведь количество индивидуальных химических компонентов, поступающих в отечественные водоемы в качестве отходов техногенной деятельности человека, в свою очередь достигает десятков и сотен тысяч. При этом каждое вещество находит свою специфическую "мишень" в метаболизме гидробионтов. Кроме того, практика показывает, что при определенных локальных условиях токсическими могут быть и элементы, не имеющего подобного свойства при других обстоятельствах. Такой эффект "тайного агента" значительно усложняет поиск его точки поражения и для выяснения последствий действия на метаболическом уровне вынуждает значительно расширять спектр используемых методов и параметров.

Анализ материалов, накопленных в лаборатории экологической биохимии за последние годы, привел нас к необходимости создания единого комплексного подхода или индикационной системы биохимических показателей. В этом подходе должны учитываться современная экологическая и биохимическая парадигмы и содержаться разнообразные внутренние контроли, повышающие достоверность получаемых данных при малой выборке, когда вынужденно использовались усредненные пробы. Была разработана принципиальная концепция такой комплексной биохимической системы, которая могла бы с успехом быть использована для выявления различных отклонений физиологического состояния рыб, возникающих под влиянием разнообразных экологических факторов, в том числе имеющих и антропогенный характер. Основные положения этого подхода были неоднократно опубликованы (Горизонтов, 1974; Ведемейер и др., 1981; Сидоров, 1986; Колупаев, 1989; Кудрявцева, 1990; Сидоров и др., 1990; Сидоров, Юровицкий, 1991; Захаров, Кларк, 1993; Руднева-Тито-

ва, 1994; Кудрявцева, Шишкин, 1996; Гвозденко и др., 1997; Кесельман и др., 1997; Love, 1970; 1980; Shulman, Love, 1999).

Разрабатываемая нами комплексная система тестов включает в себя несколько принципиальных позиций, в которых учитывается экологическая и таксономическая вариабельность объектов, стадии их онтогенеза, необходимость использования в анализах разных органов и тканей, уровень достижений биохимической диагностики в медицине, применение различных контролей, уменьшающих ошибку современных микрометодов при небольшой статистической выборке, а также разработка и использование методов полевой биохимии (экспресс методы, различные способы фиксации материала, его хранения и доставки в лабораторию, и др.). Рассмотрим кратко эти принципы.

1.2.2. Основные принципы эколого-биохимического мониторинга

Принцип учета экологического и таксономического разнообразия объектов (водных организмов)

При отборе проб для эколого-биохимического мониторинга необходимо учитывать биологическую вариабельность материала, определяющую его разную чувствительность к действию экстремальных (в том числе антропогенных) факторов среды. Речь идет не только о необходимости оценивать эколого-биохимическую изменчивость основных групп гидробионтов, но и о важности выбора из каждого таксона наиболее чувствительных и распространенных видов, занимающих определенные и значимые для водоема экологические ниши. При богатой ихтиофауне, по видимому, можно ориентироваться только на рыб, причем в систему биохимического мониторинга необходимо включать объекты, различающиеся систематическим положением, характером размножения, типом питания, возрастной и сезонной динамикой. Такой вывод следует не только из наших многолетних данных по эколого-физиологической вариабельности содержания в тканях рыб различных липидов, аминокислот, активности лизосомальных ферментов и др. (Лизенко, 1973; Лизенко и др., 1975; 1979; Рипатти, 1975; Болгова, 1978; Сидоров и др., 1981; 1989; Немова, 1982; Сидоров, 1983; 1986; Руоколайнен, 1985; Крупнова, 1986; Нефедова, 1989; Высоцкая, 1999), но и многочисленных литературных источников (Шульман, 1972; Лав, 1976; Шатуновский, 1980; Лукьяненко, 1983; 1987; Уголев, Кузьмина, 1993).

Сравнение близких и далеких по филогении видов, обитающих в сходных экологических условиях, может оказаться полез-

ным для понимания причин, вызывающих вариабельность биохимических показателей. Совершенно ясно, что на формирование биохимического статуса и обмена веществ любого организма влияют как наследственные (генетические) особенности более крупного таксона (к которому относится тот или иной вид), так и специфические биохимические адаптации данного вида к конкретным условиям жизни. Различить обе компоненты и понять их роль в обеспечении биохимической чувствительности и устойчивости организма к факторам внешней среды (в том числе и к токсикантам) можно, используя именно сравнительно-биохимический подход. Оценивая ситуацию в целом, можно сказать, что к настоящему времени в мировой литературе накоплен достаточно большой материал по таксономической, экологической и токсикогенной вариабельности различных веществ, входящих в состав живых организмов, причем некоторые из них достаточно широко апробированы – чувствительные и специфические эколого-биохимические тесты (Сидоров и др., 1993).

Принцип исследования комплекса органов рыб и других гидробионтов

Изменение биохимического статуса разных органов при воздействии на организм различных факторов среды неоднозначно. Поэтому при проведении эколого-биохимического мониторинга необходимо на первых порах использовать максимально возможное число органов рыб для того, чтобы отобрать наиболее показательные и реагирующие на действующие факторы среды. Особенно это стало ясно при изучении вариабельности липидов разных органов в зависимости от различных экологических факторов (Сидоров, 1983), а также при исследовании биохимического статуса молоди карпа в зимовальный период, при ее различных заболеваниях и токсикозах (Биохимия молоди..., 1985; 1987; Богдан, 1986). Следует отметить, что в сравнении с рыбами, другие гидробионты в этом плане практически не изучены.

Наибольший интерес представляет печень, как орган, где происходит детоксикация ксенобиотиков, особенно важны в этом плане ферменты, участвующие в процессах детоксикации чужеродных веществ и некоторых собственных метаболитов. К ним относятся, прежде всего, цитохром P-450, монооксигеназы, гидроксигеназы, ферменты, участвующие в конъюгации с глюкуроновой кислотой, серной кислотой, глицином и др. Многие из этих ферментов обладают адаптивной функцией, то есть их активность возрастает при увеличении концентрации ксеноби-

отиков (Арчаков, 1975; Мишин, Ляхович, 1985; Саприн, 1991; Гуляева и др., 1994). Параллельно с биотрансформацией ксенобиотиков и выведением продуктов через желчные протоки и почки в печени происходит интенсивная деградация естественных метаболитов до конечных продуктов обмена, которые выводятся из организма. В связи с этим особое внимание привлекает билирубин и его аналоги, окрашивающие содержание желчного пузыря в разные цвета (красный, коричневый, зеленый, синий и др.). Как собственные, так и наблюдения ряда ихтиологов говорят о возможной корреляции цветности желчи с интенсивностью протекающих в организме патогенных процессов. Особого внимания заслуживает и то, что в окислении холестерина (как эндогенного, так и поступающего с пищей) участвуют те же ферменты, что и в детоксикации ксенобиотиков. При адаптивном росте активности этих ферментов в ответ на увеличение в воде концентрации токсических веществ или при развитии патологического процесса в печени происходит изменение количественного соотношения различных моно-, ди- и триоксихолановых кислот в желчи. Так как этот процесс идет с разной скоростью у разных рыб, то это еще в большей степени может влиять на вариабельность содержания желчных кислот в желчи рыб под влиянием токсических факторов. К такому выводу мы пришли при изучении вариабельности холатного показателя (отношения холиевой кислоты к общей сумме желчных кислот) в водной среде, загрязненной промышленными стоками (Попова, 1978; Рипатти, Сидоров, 1983; Сидоров, 1983; Зекина и др., 1987; Богдан и др., 2000). Требуются дополнительные исследования роли других компонентов биохимического метаболизма, обеспечивающих полифункциональность печени в развитии ответных реакций организма при изменении факторов среды. Это касается биохимических систем, участвующих в биосинтезе холестерина, жирных кислот, липопротеинов, фосфолипидов, глюкозы, гликогена, креатина, глобулинов крови и др. Особое значение этот поиск имеет еще и потому, что содержание многих из названных компонентов в достаточной степени изменяется в зависимости от функционального состояния печени и при воздействии различных эколого-физиологических факторов.

Известно, что в крови, как в интегрирующей среде организма, отражаются патологические изменения, возникающие во внутренних органах, но они в значительной степени нейтрализуются механизмами гомеостаза. Большое значение в этой связи для эколого-биохимического мониторинга могут иметь органоспецифические ферменты, включая соотношение изоферментов

и множественных форм ферментов. Имеется большое число литературных сведений по использованию этих особенностей распределения ферментов в органах и тканях для биохимической диагностики заболеваний человека и животных (Уилкинсон, 1968; Тодоров, 1968; Райдер, Тейлор, 1983). При развитии патологий в органах возможно нарушение проницаемости клеточных мембран, в результате чего в крови появляются специфические белки (в том числе и изоферменты), которые сигнализируют о появлении патологических изменений в том или ином органе. В качестве примера такого подхода можно привести наши исследования так называемого “расслоения мышц” у осетровых рыб Волжского бассейна (1997–1999 гг.). Следовало выяснить, происходит ли разрушение мышечной ткани в самих волокнах, или в межклеточном пространстве без нарушения клеточных мембран мышечных волокон. В первом случае в крови должно было бы, на наш взгляд, измениться соотношение изоферментов ЛДГ в сторону сходства с мышцами. Этого мы не наблюдали (Груздев и др., 1990). Однако, обнаруженное нами увеличение активности в мышечной ткани Ca^{2+} -активируемых протеолитических ферментов, участвующих, как известно, в дезинтеграции т.н. “Z-дисков” мышечных волокон, может косвенно указывать на то, что все-таки имеет место нарушение в структуре мышечных белков (Немова и др., 1992).

Жабры рыб принимают на себя первый “удар”, вызванный химическими изменениями в водной среде, что часто адекватно отражается на биохимических показателях в этом органе. Такой вывод неоднократно подтверждался нашими исследованиями разных групп веществ у рыб в аквариальных и полевых экспериментах по изучению токсических веществ различной природы. Так, было показано сильное воздействие стоков целлюлозно-бумажного производства на состояние мембранных структур жаберных клеток, о чем можно судить по увеличению в липидной фракции относительной доли лизолецитина при соответствующем уменьшении доли лецитина (Сидоров, Попова, 1978; Сидоров, 1983). При хронических воздействиях абиотической кислоты в жабрах радужной форели уменьшалась активность изоферментов лактатдегидрогеназы группы “С” (Груздев, Сидоров, 1987).

Селезенка представляет наибольший интерес как кроветворный и иммунокомпетентный орган. Многие протекающие в организме физиолого-биохимические процессы в экстремальных условиях при сильном изменении среды обитания затрагивают кроветворную и иммунную системы. Известно, что любой сильный стресс обычно подавляет иммунитет животных, в то время как

слабые стрессовые воздействия активизируют защитные силы организма (Ведемейер и др., 1981).

Интересно отметить, что такие же иногда неожиданные результаты получаются и при эколого-биохимическом анализе почек, что может иметь значение при использовании систем эколого-биохимического мониторинга при ранней диагностике хронических изменений в организме рыб в водоеме. Например, при изучении изменения содержания различных липидов в разных органах у волжского осетра в норме и при “расслоении” мышц самые значительные различия были обнаружены нами именно в почках, хотя по другим биохимическим показателям (лизосомальные ферменты, изоферменты ЛДГ, содержание свободного и белковосвязанного оксипролина) наибольшие изменения наблюдались в жабрах, затем в печени, гонадах и мышцах. Значение изучения почек при разработке эколого-биохимического может быть более понятным в свете наших результатов по сравнительному анализу содержания эфиров холестерина и триацилглицеринов (ТАГ) – запасных липидов у рыб. Было показано, что суммарные липиды более древних в филогенетическом отношении рыб (осетровые, лососевые) содержат во многих органах большую долю триацилглицеринов, чем липиды менее древних рыб. Кроме того, для филогенетически более молодых рыб (щучковых, окуневых, карповых, тресковых) характерна высокая доля в суммарной липидной фракции эфиров холестерина. Расчет на сухую массу тканей показал, что применительно к триацилглицеринам эта закономерность сохраняется для мускулатуры, плавательного пузыря, головного мозга и гонад, а в отношении эфиров холестерина – только для почек и спинного мозга. По-видимому, существует определенный антагонизм между триацилглицеринами и эфирами холестерина как запасными липидами. Представляется логичным, что эфиры холестерина, по сравнению с ТАГ, являются более универсальными запасными веществами, так как в их молекулах в нейтральной, нетоксичной для организма форме сохраняются запасы как структурных, так и энергетических элементов. Более того, именно в тех тканях, где роль холестерина особенно велика (почки, печень, спинной мозг), мы наблюдали и более высокую концентрацию холестерина (Сидоров, 1983). Не исключено, что повышенная чувствительность лососевых рыб к резкой смене температур, действию токсикантов и других стрессовых факторов (Проссер, 1977; Лукьяненко, 1983; 1987) в определенной степени связана и с отсутствием достаточных резервов холестерина, необходимого при перестройке их мембран или активации метаболизма (Сидоров, 1986), чему пред-

шествует образование кортикостероидов из холестерина (Селье, 1960; Покровский, Тутельян, 1976; Юдаев и др., 1976). Почкам также принадлежит очень важная функция выделения конечных продуктов обмена (с мочой) и детоксикации многих чужеродных веществ. Для рыб, у большинства из которых отсутствует мочевой пузырь, использование мочи для диагностических целей исключено. Однако во внутренних полостях почек находится достаточное количество выделенной почками жидкости, содержащей различные продукты обмена, что можно использовать при разработке методов эколого-биохимического мониторинга, учитывая огромный опыт, накопленный медицинской биохимией на этом направлении. Здесь уместно высказать некоторые соображения о принципиальных различиях между медицинской диагностикой и биохимическим тестированием в ихтиологии и водной токсикологии. Специалисты-биологи находятся в более выгодном положении по сравнению с медиками, так как имеют возможность использовать для анализов все органы животных и получать уникальную информацию о ходе биохимических процессов при разных видах патологий. Полученные в ходе этих исследований данные могут иметь важнейшее теоретическое значение для понимания биохимических механизмов как адаптивных реакций, так и патологий разной этиологии.

Мышцы и гонады (в репродуктивный период) составляют основную массу тела рыб и тоже служат индикаторами загрязнений, хотя и в меньшей степени, чем печень, почки, жабры. В наших исследованиях было показано что, например, содержание структурных (мембранных) липидов в этих органах достаточно стабильно и слабо зависит от изменений в окружающей среде (Баранникова, 1975; Лизенко и др., 1975; 1979; Сидоров и др., 1981; Сидоров, 1983; 1986; Тойвонен и др., 2001). Что касается запасных липидов, то их содержание сильно варьирует в зависимости от условий нагула (пищевого фактора). При этом, в запасных липидах (в жировых тканях лососевых, осетровых) могут накапливаться жирорастворимые токсиканты, находящиеся в водной среде в низких концентрациях, что, в конечном счете, при утилизации жировых накоплений во время созревания гонад и нерестового голодания, перед выклевом личинок и сразу после их выклева до перехода на внешнее питание, может приводить к высвобождению токсических веществ из жировых депо, что может вызвать негативные изменения в организме. Такой путь появления патологий часто выдвигают токсикологи для объяснения возникающих токсикозов у рыб, как, например, в случае возникновения у осетровых рыб так называемого “расслоения” мышц и

уменьшения прочности (истончения) стенок у икры тех же рыб. Хотя убедительных факторов в пользу такой версии приведено не было, что в том числе подтвердили и наши биохимические исследования этой патологии (Физиолого-биохимический статус ..., 1990), тем не менее игнорировать такую возможность, на наш взгляд, нельзя. В любом случае, мышцы и гонады следует использовать в системе эколого-биохимического мониторинга, чтобы получить сравнительные с другими органами и тканями данные о влиянии на организм тех или иных воздействий.

Особое значение для эколого-биохимического мониторинга (до сих пор еще мало используемое и оцененное) следует придавать пробам головного и спинного мозга рыб. Как известно, они в большей степени защищены от воздействий среды. Гомеостаз химического состава мозга необходим для его нормальной работы, и даже небольшие его изменения могут привести к патологическим отклонениям в функционировании всего организма (Крепс, 1981). Если результаты химического анализа опытных и контрольных проб мозга сильно различаются, и это подтверждается другими биохимическими исследованиями и методами, то можно говорить о существовании сильных или специфических факторов воздействия на организм.

Недостаточно изучены в эколого-биохимическом аспекте желчный пузырь, кожа, слизь, костные ткани, слизь рыб. Хорошо известен симптом искривления позвоночника при воздействии на рыб токсических веществ, относящихся к пестицидам (токсафен, кепон, мирекс, хлорофос, бутифос, 2,4-Д и др), а также при нехватке в кормах витамина С (Теоретические вопросы водной..., 1981; Козловская, Павлов, 1988). Этот эффект вызывается ингибирующим влиянием токсикантов на образование коллагена, входящего в состав межпозвоночных хрящей. Представляется вероятным, что нарушение образования коллагена и эластина, входящих в состав хряща, может происходить при действии различного рода загрязнителей водной среды на процессы биосинтеза и формирования этих белков, в частности, если имеет место ингибирование лизилоксидазы, участвующей в образовании поперечных “сшивок” между коллагеновыми нитями, различными аминами, при ингибировании тяжелыми металлами образования S-S мостиков при сворачивании проколлагеновых молекул в трехнитевые тяжи и др.

Нами была показана широкая экологическая вариабельность содержания эфиров холестерина и триацилглицеринов в плавательном пузыре рыб в зависимости от их филогенетического положения (Сидоров, 1986). Глаза, кожные покровы,

кожная слизь, жабры, непосредственно контактируя с токсическими компонентами водной среды, представляют несомненный интерес для использования их как дополнительных тестов эколого-биохимического мониторинга. Однако информация об этом достаточно скудная.

Онтогенетический принцип

Повреждающее действие факторов среды (имеются в виду прежде всего токсические вещества антропогенного происхождения) в значительной степени зависит от этапа (стадии) развития организма, поэтому при эколого-биохимическом мониторинге необходимо это учитывать. Этот принцип хорошо обоснован в литературе, включая и наши публикации (Строганов, 1962; Шульман, 1972; Лав, 1976; Шатуновский, 1980; Сидоров, 1983; Лукьяненко, 1983; 1987; Нефедова, 1989; Немова, 1996; Высоцкая и др., 2000; Регеранд и др., 2002). Особое внимание этому принципу уделял один из основоположников отечественной водной токсикологии Н.С. Строганов и его ученики (Строганов, 1971; 1973; 1938; Путинцев, 1981; Биологические процессы..., 1984). Действие токсических веществ на формирование половых продуктов гидробионтов он считал одним из опаснейших эффектов химического загрязнения, так как, в конечном счете, это может привести к изменению генофонда гидробионтов. В определенной степени о таких изменениях в созревающих гонадах можно судить с помощью подбора адекватных биохимических тестов. В качестве примера можно привести результаты, полученные нами при изучении воздействия на только что оплодотворенную икру сига солей никеля (0,02 мг/л) и цинка. В эксперименте показано достоверное изменение содержания отдельных липидов на последующих этапах эмбриогенеза (Лизенко, Нефедова, 1987). Кроме того, удалось обнаружить, что при такой обработке икры разными концентрациями солей никеля и цинка (0,01 и 0,1 мг/л) с помощью определения активности изоферментов ЛДГ и активности ряда лизосомальных ферментов можно установить, на ранних стадиях развития икры, только действие более высоких концентраций указанных металлов (Высоцкая и др., 1984; Немова и др., 1984; Груздев, Касаткина, 1987). Иначе говоря, полученные двумя способами результаты свидетельствуют об одном и том же, о возможности биохимическими методами диагностировать концентрации ионов тяжелых металлов не ниже 0,1 мг/л.

Для избежания ошибок при интерпретации данных, что особенно важно при диагностике и оценке хронических и слабых токсикогенных воздействий на гидробионтов, нужны не отдельные, пусть даже достаточно чувствительные биохимические тесты, а система тестов, в которой изменение каждого показателя было бы логически, исходя из современных представлений о схеме метаболических путей, связано с теоретически ожидаемым изменением других показателей. Такой подход не только служил бы внутренним контролем получаемых данных, но и позволил бы вскрыть механизм и направление биохимических изменений. Применение этого принципа в значительной степени позволило бы уменьшить необходимую статистическую выборку, так как достоверность результатов в большой степени обеспечивалась бы их биохимической логичностью. В настоящее время нами для целей эколого-биохимического мониторинга используется система биохимических показателей, включающая как легко варьирующие под влиянием изменяющихся факторов среды показатели клеточного метаболизма (запасные липиды, жирные и желчные кислоты, лизосомальные ферменты, изоферменты ЛДГ, свободные аминокислоты), так и фенотипически более устойчивые, изменяющие свое содержание в тканях при патологических состояниях организма (мембранные липиды и белки, свободный оксипролин и др.). Так, например, при изучении изменений биохимического метаболизма в органах карпа в процессе зимовки, было показано, что из 75 исследуемых биохимических показателей заметно (50%-е различия) реагировали на факторы “зимовки” 25 в печени и только 17 в мышечной ткани. Если рассматривать 3-кратные изменения, то для печени таких показателей было обнаружено 9, а для мышц – 7. Среди них, в печени изменялась активность лизосомальных катепсина D, кислой фосфатазы и β -глюкозидазы, содержание свободного оксипролина, эфиров холестерина, включение радиоактивных предшественников в липиды, ДНК, РНК, белки. В мышцах это относилось к активности катепсина D, цитохромоксидазы, изоферментов ЛДГ, содержанию цАМФ, витаминов B₁, B₂, B₆, свободного оксипролина, белка фракции I, триацилглицеринов (Биохимия молодежи..., 1987). Эти результаты позволяют предположить следующий характер процессов, протекающих при зимнем голодании карпов: в печени уменьшается биосинтез липидов и ДНК, активизируются гидролитические процессы с участием лизосом, утилизируется даже коллаген, активно используется холестерин из запасных эфиров

холестерина. Известно, что голодание – это стресс, сопровождающийся активным синтезом кортикостероидов из холестерина. В мышцах происходят те же процессы, но в отличие от печени, наряду с расщеплением белков в них активизируется биосинтез. Аналогично, при изучении влияния различных факторов на биохимический статус рыб с использованием определенного набора биохимических “тестов”, были получены результаты, свидетельствующие об активации или ингибировании в организме тех или иных процессов. Однако эта система помимо установления биохимических изменений в организме должна включать еще ряд других необходимых принципов.

Принцип биохимической диагностики

Это принцип обеспечивает идентификацию действующих факторов. Система биохимических тестов, применяемых в эколого-биохимическом мониторинге, как и в медицине, должна, хотя бы в первом приближении, ответить на вопрос, какого рода фактор действует на водные организмы. Обоснование такого требования вытекает из достижений биохимической диагностики в медицине. Система тестов должна быть достаточно универсальной для этой цели и включать, на наш взгляд, 150–200 биохимических показателей (Сидоров, Шатуновский, 1983). Специфичность биохимического ответа организмов, составляющих отдельные популяции, позволяет проследить логическую цепь от следствия к причине, идентифицировать действующее начало, приводящее к эколого-биохимической модуляции. Это очень важно, поскольку для каждого компонента биоценоза существуют свои, характерные для них допустимые и критические значения функции антропогенного воздействия (Баранникова, 1975; Аминова, Яржомбек, 1984; Биохимия молоди ..., 1985). Во многих случаях действует не один, а несколько факторов, определяющих характер патологии. В этой связи предлагаемая “система” выявляет один или несколько факторов, вызывающих патологию. В частности, одной из причин некроза плавников молоди лосося могла быть нехватка и дисбаланс в кормах линолевой (незаменимой) кислоты (Болгова и др., 1977; Сидоров, 1986; Тойвонен, 1995). Экспериментальные исследования частично подтверждают этот вывод: добавка в корма метилового эфира линолевой кислоты снимала патологию на 20% (Болгова и др., 1987). По-видимому, в кормах не хватает и других незаменимых компонентов (витаминов, аминокислот) или, возможно, присутствуют пищевые токсины, так как при использовании высококачественных и свежих кормов эта болезнь у молоди не обнаруживалась. Ясно, что

для ответа на поставленный вопрос требуются дополнительные исследования с использованием методов определения в кормах и крови рыб “незаменимых” компонентов и пищевых токсинов. В случае изучения так называемого “расслоения” мышц у осетровых, применяемая система тестов позволила с учетом вышеназванных принципов с большей степенью вероятности выявить механизм “расслоения” – ослабление формирования коллагена, одного из компонентов (наряду с протеогликанами) межклеточного вещества мышц и оболочки икры. В частности, по сравнению с нормой (осетры без “расслоения” мышц) в мышцах была увеличена активность ферментов гидролиза коллагена (коллагеназы, лизосомальной протеиназы – катепсина D), повышено содержание свободного оксипролина, наряду с уменьшением содержания свободного оксипролина, увеличена вариабельность холатного показателя (Какоткин и др., 1990; Лизенко и др., 1990).

Принцип адекватности методов задачам эколого-биохимического мониторинга

Эколого-биохимический мониторинг используется для контроля биохимического состояния гидробионтов в естественной для них среде – в водоеме. Поэтому методы, применяемые для этих целей, должны соответствовать решению двух задач: оперативного получения результатов биохимических анализов в полевых условиях, что может определить последующие методы мониторинга, и фиксации материала в полевых условиях, и доставки его в лабораторию для последующего анализа.

В целом, эта система тестов позволяет в первом приближении оценить по некоторым биохимическим параметрам несколько физиолого-биохимических функций в организме рыб: окислительный стресс, процессы деградаци и биосинтеза биополимеров, состояние органов по проницаемости их биомембран и появлению в крови специфических компонентов для отдельных тканей и органов, детоксикационную способность печени и почек, генную регуляцию обмена веществ, общий адаптивный синдром, функционирование путей транспорта липидов, функционирование биомембран. Предлагаемая система была успешно апробирована при изучении влияния некоторых токсических веществ (ртути и сопутствующих факторов – кислотности и гумифицированности водоемов, других тяжелых металлов, нитратов, нитритов, солей калия) на разные стороны метаболизма рыб (Немова и др., 2001; Суховская и др., 2001; Богдан и др., 2002; Высоцкая и др., 2002; Регеранд и др., 2002; Kaivarainen et al., 1998).

В настоящее время все шире биохимические методы стали использовать при изучении влияния на рыб различных токсикантов (с различными целями, например, при определении ПДК). Однако в литературе отсутствуют достаточно информативные руководства, в которых бы обосновывались различные вопросы биохимического тестирования. Создается впечатление, что в большинстве случаев выбор того или иного набора биохимических показателей происходит совершенно произвольно. Тем не менее, в литературе описано несколько достаточно удачных систем для комплексного биохимического тестирования рыб, каждая из которых включает от 5 до 20 биохимических показателей. Если эколого-биохимические работы по рыбам рассматривать как своеобразное биохимическое тестирование их состояния, то количество такого рода работ достигает нескольких тысяч, но и в них используется достаточно ограниченное число биохимических показателей (Love, 1970; 1980; Shulman, Love, 1999). Например, в одном из лучших в этом плане руководств – “Биотест (интегральная оценка здоровья экосистем и отдельных видов)”, выпущенного под редакцией В.М. Захарова и Д.М. Кларка (1993), рекомендуется около 12 биохимических показателей (определение активности супероксиддисмутазы, монооксигеназы, содержания продуктов деградации нуклеиновых кислот – цитозинных и тиминных гликолов, 8-оксиформ аденина и гуанина, цитохрома Р-450, свободного и связанного оксипролина, металлотионеинов, желчных кислот и холестерина в желчи, отдельных изопреноидов и хлорофилла в растениях), которые позволяют в некоторой степени оценить активность окислительного стресса, повреждения ДНК, детоксикационную активность печени. Наряду с биохимическими показателями в инструкции рекомендуется использовать морфологические и гистологические тесты (более десятка), генетические методы (5 тестов), физиологические (около 5), иммунологические (около 7), что технически сильно затрудняет организацию выполнения такого рода комплексных работ, так как требует создания специализированных и достаточно больших лабораторий, в которых нужно иметь разнородное оборудование и специалистов разного профиля – морфологов, гистологов, генетиков, цитогенетиков, иммунологов и биохимиков.

Б.И. Колупаев (1989) рекомендует для оценки состояния гидробионтов при воздействии на них различных экстремальных экологических факторов и химических загрязнений систему тестов, связанных одной функцией – обеспечения кислородного режима организма (СОКРО). Предлагаемая система состоит из трех частей: звена доставки кислорода к поверхности газообмена

(частота дыхания), звена транспорта газов кровью (частота сердцебиений, содержания эритроцитов, концентрация оксигемоглобина и метгемоглобина, активность каталазы, пероксидазы, карбогидразы, гематокрит крови) и звена поглощения кислорода клетками-потребителями (потребление кислорода, выделение углекислоты, дыхательный коэффициент, активность цитохромоксидазы в жабрах и печени, активность сукцинатдегидрогеназы в жабрах и печени). Эта система базируется на постулате, что любое изменение в метаболизме организма гидробионтов прямо или косвенно отражается на компонентах его дыхательной системы. Недостатками предлагаемой системы тестов является то, что большинство из них выполняется на живом материале в условиях стационарного аквариального эксперимента и оценивается лишь одна функция организма – дыхательная, что не всегда позволяет понять механизм действия токсиканта и выйти на приоритетные загрязнители при изучении многокомпонентных загрязнений природных водоемов.

И еще несколько примеров. Г.В. Кудрявцева обратила внимание экологов и токсикологов на высокую чувствительность соотношений активности ферментов окислительной ветви пентозофосфатного пути (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, лактоназа, 6-фосфоглюконат-дегидрогеназа) к ферментам неокислительной ветви этого пути (пентозофосфатизомераза, пентозофосфатэпимераза, транскетолаза и трансальдолаза). Для оценки физиологического состояния рыб и других гидробионтов она рекомендует использовать “пентозный коэффициент” – отношение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы к общей пентозофосфатметаболизирующей активности или иногда просто отношение двух ключевых ферментов окислительной и неокислительной ветви пентозофосфатного пути деградации глюкозы (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа / транскетолаза) (Кудрявцева, 1990; Кудрявцева, Шишкин, 1996). И здесь, несмотря на многие интересные корреляции между степенью реакции организма на различные экологические факторы, в том числе и воздействие загрязнений, мы имеем дело с оценкой только одной функции организма. Это не гарантирует получения адекватного ответа во всех возможных экологических ситуациях, а также не позволяет выявить основной механизм нарушения или изменения метаболизма и выйти на приоритетные загрязнители.

Можно было бы привести и другие примеры поиска подходящих или даже универсальных биохимических систем оценки физиологического состояния гидробионтов, при этом, недостаточное внимание обращается на теоретическое обоснование биологиче-

ской выборки (учет экологического и таксономического разнообразия биологических объектов, отбор для анализа органов и тканей, возраст и этапы развития организмов, не учитываются достижения медицинской диагностики). Среди многих работ, появившихся в этой области в последние годы, следует отметить работы С.И. Гвозденко с сотрудниками и И.И. Рудневой-Титовой, использующих довольно широкий комплекс показателей окислительного стресса (продукты окисления липидов, антиоксидантные ферменты – каталаза, супероксиддисмутаза и пероксидаза, сульфгидрильные группы, глутатионредуктаза, глутатион) при изучении действия некоторых токсикантов (Руднева-Титова, 1994; Руднева, Жерко, 1994; Руднева и др., 2004). Наиболее полной и близкой к нашему подходу по постановке проблемы является система комплексной оценки состояния природных сред, предлагаемая исследователями из НИИ биологии Днепропетровского университета. В ней для комплексного эколого-биохимического тестирования наземных сред использовали несколько видов беспозвоночных (дождевые черви) и позвоночных животных (озерная лягушка и прыткая ящерица). Эта система включала в себя около 75 эколого-биохимических показателей, таких как различные фосфолипиды, холестерин, белки, глутаминовую кислоту, цитохромы P-450 и ψ_5 , триацилглицерины, нуклеиновые кислоты, разные белковые фракции, РНК, свободные жирные кислоты в печени, почках, сердце, легких, коже и мышцах (Гвозденко и др., 1997; Кесельман и др., 1997).

Разумеется, что предлагаемая нами и другими группами исследователей, работающими в области экологической биохимии, система биохимических показателей клеточного метаболизма, которые могут служить биоиндикаторами состояния рыб при воздействии различных (в том числе антропогенных) экстремальных факторов среды требует дополнения и дальнейшего совершенствования. Параметры данной книги не позволяют привести все конкретные результаты, полученные нами при изучении биохимического состояния рыб в различных эколого-физиологических ситуациях с использованием обсуждаемой системы ЭБХМ, представленные в многочисленных публикациях в отечественных и зарубежных изданиях. Поэтому в следующей главе мы ограничимся рассмотрением только одного из аспектов этой системы – роли и значения гидролитических ферментов лизосом органов рыб в развитии ответных реакций организма на воздействие изменяющихся факторов среды. Лизосомам, как известно, принадлежит очень важная роль в клеточных адаптациях к изменению факторов внутренней и внешней среды, в том числе, в осуществлении защитных функций организма.

Глава 2

РОЛЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ АДАПТАЦИЯХ РЫБ К ИЗМЕНЯЮЩИМСЯ ФАКТОРАМ СРЕДЫ

Материалы, представленные в этой главе, демонстрируют возможность использования изменяющихся биохимических показателей в качестве тестов при индикации состояния рыб и других гидробионтов, а также при оценке экологической ситуации в водоеме. Подробно излагаются сведения по адаптациям на уровне ферментов, поскольку именно в этой области авторы имеют наибольший опыт собственных исследований.

Все стороны жизнедеятельности живого организма испытывают влияние множества абиотических и биотических факторов, таких как освещенность и долгота дня, температура, минеральный и газовый состав среды, характер грунтов и течений, качественный состав и количество пищевых объектов, взаимоотношения с особями своего вида и другими организмами и т.д. (Никольский, 1963; Слоним, 1971; Кауфман, 1989, 1995; Потапенко, 1996). Среди них температура окружающей среды является важнейшим экологическим фактором, оказывающим глубокое влияние на интенсивность большинства проявлений жизнедеятельности, как на отдельные физиологические и биохимические процессы, так и на поведенческие реакции на уровне организмов, популяций и сообществ (Шмидт-Ниельсен, 1982; Одум, 1986; Озернюк, 1992; 2000).

2.1. УЧАСТИЕ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В АДАПТАЦИЯХ РЫБ К ТЕМПЕРАТУРЕ СРЕДЫ

При колебаниях температуры в среде обитания изменяется скорость отдельных ферментативных реакций, а в результате и общая интенсивность обмена веществ у животных. Как правило, при повышении температуры биохимические реакции ускоряются, а при понижении замедляются. Однако интенсивность этих изменений не

Активность лизосомальных ферментов при температурной акклимации радужной форели (акклимация 7 сут, $n = 8$)

Орган	Температура	Фосфатаза*	β -Глюкозидаза*	ДНКаза**	РНКаза**
Печень	15°	2,08	0,06	0,86	1,10
	4°	3,04	0,18	0,85	1,28
Почки	15°	3,00	0,18	2,67	2,41
	4°	2,45	0,16	1,62	1,54
Мышцы	15°	0,53	0,011	0,80	0,65
	4°	0,50	0,006	0,46	0,50
Селезенка	15°	3,00	0,36	1,75	1,80
	4°	2,50	0,20	1,10	0,90

Примечание. * – В микромолях п-нитрофенола на 1 г сырого веса ткани; ** – в ΔE_{260} на 1 г сырого веса ткани.

одинакова, акклимация к тем или иным температурам связана с дифференциальными эффектами в различных ферментативных системах (Хочачка, Сомеро, 1988). Любое температурное воздействие отражается на состоянии лизосомального аппарата (Табукашвили и др., 1991; Bhattacharya, 1985). Особое значение имеет температура внешней среды для эктотермных животных, у которых температура тела, а, следовательно, и скорость биохимических процессов меняются в соответствии с температурой окружающей среды (Саутин, Романенко, 1982; Коцарь, 1988; Романенко и др., 1991; Пономарев, 1995; Campbell, Davies, 1978; Laidley, Leatherland, 1988). Выработанные в процессе эволюции метаболические приспособления у пойкилотермных организмов направлены на сглаживание экстремального воздействия данного фактора (Озернюк, 1992). Температурная акклимация рыб сопровождается приспособительными изменениями метаболизма, при которых нарушается привычное соотношение скоростей анаболизма и катаболизма. Как было показано, при тепловой акклимации у радужной форели в мышцах наблюдалось изменение седиментационных характеристик лизосом, увеличивалась общая активность фермента-маркера этих органелл – кислой фосфатазы (Milanesi, Bird, 1972a,b). Возрастание активности этого фермента при повышении температуры отмечено и в сыворотке крови радужной форели (Pegrier et al., 1980). С другой стороны, имеются данные, показывающие увеличение активности кислой фосфатазы в печени форели и при повышении температуры воды (Berlin, 1967). Однако противоречия здесь нет, вероятность такого явления подтверждает сравнительное изучение активности лизосомальных ферментов у пойкилотермных и гомойотермных животных. Высокая активность лизосомальных ферментов и сродство их к субстратам обнаружены в печени рыб, обитающих при 5–10 °С, по сравнению с печенью крысы (Dannevig, Berg, 1978). Эти кинетические и термодинамические свойства рассматриваются авторами как большое преимущество рыбы, которое компенсирует недостаток термической энергии, необходимой для осуществления химических реакций в клетке.

Влияние температуры в аквариальных экспериментах

Для выявления особенностей в механизмах температурных адаптаций было проведено сравнительное изучение ферментных систем лизосом у разных по экологии рыб – теплолюбивого карпа и холодноводной радужной форели. Как известно, эти виды обладают неодинаковыми способностями адаптироваться к различным диапазонам температур (Лукьяненко, 1987).

Результаты показали, что при тепловой акклимации у радужной форели в печени происходило некоторое снижение активности лизосомальных фосфатазы, РНКазы и β -глюкозидазы, а в других органах (мышцах, почках, селезенке) повышение внешней температуры вызывало рост активности лизосомальных гидролаз (табл. 1).

Сопоставление этих данных с приведенными ниже (табл. 10, 11) и представленными в табл. 2 позволяют сделать заключение о существовании одинаковой направленности в изменении общей активности лизосомальных ферментов в одноименных органах у разных видов при температурной адаптации.

Изучение молекулярных форм кислой фосфатазы в печени рыб при температурных адаптациях показало, что низкая температура в среде обитания вызывает модификации спектра изоформ фермента. Так, у карпа адаптация к холоду приводит к перераспределению активности кислой фосфатазы между отдельными молекулярными формами в сторону увеличения активности гетероформ с массой 110 кДа и заметному снижению активности высокомолекулярной формы массой около 300 кДа (табл. 3).

При фракционировании заряженных форм кислой фосфатазы из печени рыб на ДЭАЭ-целлюлозе было обнаружено усиление относительной активности анионных форм фермента в условиях пониженной температуры (Руоколайнен, 1985). Выявленные модификации фракционного состава кислой фосфатазы, вероятно, биологически целесообразны. Эти данные свидетельствуют о том, что кроме количественных изменений в содержании ферментов при температурной адаптации рыб происходят сдвиги и в качественном составе отдельных белков.

Таблица 2

Зависимость активности кислой фосфатазы в печени карпа от температуры окружающей среды (акклимация в течение 24 сут)

Температура воды, °С	Активность фермента, мкг P _{in} на 1 г сырого веса ткани			
	n	M±m	σ	S, %
0-7	16	13,8±1,7	2,2	24
18	6	6,3±2,2	1,9	46

Таблица 3

Относительная активность молекулярных форм кислой фосфатазы печени карпа в зависимости от температуры (в % к общей, акклимация 24 сут)

Температура, °С	n	Молекулярная масса, кДа	
		311	110
0-7	15	6,7	93,3
18	8	15,6	84,4

Температура окружающей среды в значительной степени определяет интенсивность метаболических процессов в организме рыб как пойкилотермных животных, для которых ведущим параметром в поддержании гомеостаза является сохранение жизнедеятельности в условиях низких температур. Известно, что в течение года температура водоема значительно изменяется. Эти колебания быстро передаются биохимическому аппарату клеток рыб и сказываются, прежде всего, на скорости и интенсивности реакций метаболизма. Еще раз подчеркнем, что у многих пойкилотермных организмов хорошо развиты компенсаторные механизмы изменения стандартного метаболизма, сезонная акклимация (Слоним, 1971; Хочачка, Сомеро, 1988; Milanesi, Bird, 1972a, b). Например, уровень макроэргических фосфорных соединений может колебаться в значительных пределах и определяться рядом факторов, в том числе сезоном года. При низких температурах относительная величина энергозатрат растет, то есть понижение температуры воды при плавании рассматривается как увеличение интенсивности нагрузки (Трусевич, 1978).

Интенсивность многих катаболических реакций при акклимации к холоду возрастает. Наибольшую степень компенсации температурных эффектов обнаруживают те ферментативные реакции, которые участвуют в генерировании “энергетической валюты” клетки, необходимой в любое время года. К таким реакциям можно отнести и катализируемые кислой фосфатазой. Лизосомальная фосфатаза, хоть и не принимает непосредственного участия в синтезе макроэргических соединений, безусловно, влияет на их количество, регулируя уровень неорганического фосфата в клетке (Руоколайнен, 1985).

Особенно велико значение температурного режима для рыб на ранних этапах их развития (Лукьяненко, 1987). Так, развитие лососевых рыб в эмбриональный период определяется в первую

очередь температурным фактором, чем южнее место обитания лосося, тем раньше наблюдается выход личинок из бугров. В дальнейшем темпы роста молоди атлантического лосося, их способность переходить в миграционное состояние прямо зависят от длительности периода с оптимальными температурами (Шустов, 1983). В зависимости от климатических условий региона речной период молоди лосося может варьировать от одного до семи лет. Количество дней с оптимальной для роста и развития рыбы температурой (10–18 °С) за весь речной период должно составить в сумме девять месяцев (Смирнов, 1979). При пониженных (ниже 10 °С) и повышенных (выше 19,7 °С) температурах рост пестряток лосося значительно замедляется.

На Кемском рыбоводном заводе нами было проведено изучение влияния температуры воды в период выдерживания и подрашивания личинок на некоторые биохимические показатели, в том числе и на активность кислой фосфатазы. В контрольном лотке личинки развивались в условиях естественного температурного режима, который был крайне неблагоприятен для личинок в мае–июне. Вследствие высоких температур воды в начале инкубации икры (сентябрь–октябрь предыдущего года) эмбриональное развитие лосося произошло очень быстро, и уже в феврале–марте наблюдался массовый выклев личинок. Длительное время после выклева сохранялась низкая температура (0,2–0,4°), что привело к нарушению обмена веществ, нормального хода онтогенеза и высокой смертности. С целью получения прямого подтверждения высказанного предположения был поставлен эксперимент. В одном из лотков с высоким отходом личинок (постэмбрионов) начали искусственно повышать температуру воды от 0,5° (6 мая) до 10–12° (16 мая), после чего ее поддерживали в заданных пределах до выравнивания в опыте и контроле (21 июня). В контроле температура воды к 16 мая поднялась до 4,5°.

Кроме того, была определена активность лизосомальных ферментов у ранних сеголеток из лотка, где большая часть молоди лосося обнаруживала признаки заболевания (плавниковой гнили) невыясненной этиологии (молодь “парила”, основания парных плавников были покрыты белым налетом).

Общая активность кислой фосфатазы у сеголеток из естественного (неблагоприятного) температурного режима была ниже, чем из варианта с регуляцией температуры воды. Еще ниже оказалась активность фермента у большой молоди (табл. 4).

Эти данные свидетельствуют о закономерном снижении уровня обменных процессов у рыб, что подтверждается их меньшими размерами и весом тела. Более высокая активность кислой фос-

Таблица 4

Активность кислой фосфатазы (в мкМ п-нитрофенола/г ткани/мин) и вес тела у сеголеток лосося при разных температурных режимах

Вариант	Активность фермента	$M \pm m$	n	Вес, г
Большая молодь	Свободная	0,707±0,011	30	0,151±0,023
	Общая	0,892±0,025	30	
Контроль	Свободная	0,775±0,016	30	0,226±0,030
	Общая	0,999±0,020	30	
Подогрев	Свободная	0,699±0,012	30	0,330±0,046
	Общая	1,032±0,025	30	

фатазы у сеголеток с регулируемым температурным режимом говорит об интенсификации метаболических процессов при повышении температуры окружающей среды. Как отмечалось выше, понижение температуры тела угнетает процессы фагоцитоза, следовательно, и защитные функции организма (Учитель, 1978). В процессах фагоцитоза, уничтожении чужеродных веществ и болезнетворных бактерий (естественный иммунитет) активное участие принимают лизосомы фагоцитов (Гуткин и др., 1984; Фрейдлин, 1996). Более низкие значения активности кислой фосфатазы и более высокое поражение плавниковой гнилью сеголеток первого варианта (см. табл. 4) по сравнению, со здоровыми (второй вариант и вариант с подогревом) можно объяснить подавлением их фагоцитарной активности. Высокая активность лизосомальной кислой фосфатазы – это свидетельство наличия большого числа лизосом, содержащих ферменты, необходимые для расщепления полимерных компонентов в клетке. Продукты расщепления являются материалом для синтеза, интенсивно происходящего в растущем организме. Результаты эксперимента приводят к выводу, что повышение температуры в сторону оптимальных значений (Яндовская и др., 1966) в период выдерживания и подращивания личинок лосося вызывало активизацию работы лизосомального аппарата. В результате мальки быстрее растут, повышаются их защитные силы, они в меньшей степени подвержены заболеваниям, то есть обеспечивается их лучшая выживаемость, что в конечном счете и является целью адаптаций.

Высокая чувствительность лизосомального аппарата рыб на ранних этапах развития к экстремальным значениям температуры продемонстрирована нами в экспериментах на лососевых. На разных этапах развития икры нарвской кумжи, ладожского лосося и радужной форели изучалось воздействие высокой температуры



Рис. 1. Влияние температуры 22 °C на активность кислой ДНКазы нарвской кумжи в раннем онтогенезе.

По оси ординат – активность фермента в $\Delta E_{260}/\text{мг}$ белка. По оси абсцисс – этапы эмбрионального развития: 1 – IV этап, органогенез; 2 – V этап, дифференцировка хвостовой почки и ее рост; 3 – VI этап, функционирование системы кровообращения; 4 – VI этап, пигментация глаз; 5 – VII этап, дифференцировка непарных плавников; 6 – VII этап, жаберная крышка прикрывает первую жаберную дугу; 7 – VII этап, скопление мезенхимы в области брюшных плавников; 8 – VII этап, жаберная крышка прикрывает две пары жаберных дуг; 9 – VII этап, зародыш перед выклевом; 10 – IX этап, личинки (9 сут.), начало выделения плавника из плавниковой складки; 11 – конец IX этапа, личинки (20 сут.), на челюстях зачатки зубов; 12 – начало XI этапа, личинки (35 сут.), полное выделение плавниковой складки; 13 – XII этап, личинки (49 сут.), края всех плавников, кроме жирового, зубчатые

(22 °C). Этапы эмбрионального и личиночного периодов определяли по Л.П. Рыжкову (1976). Пробы для биохимического анализа брали после гибели 50% особей из оставшихся в живых. Определяли неосаждаемую, общую (с добавлением тритона X-100) и связанную с ядерной и лизосомально-митохондриальной фракциями активность кислой фосфатазы, β -глюкозидазы, ДНКазы и РНКазы.

Сопоставление полученных данных позволило заключить, что лизосомы изученных лососевых рыб на разных этапах раннего онтогенеза неодинаково чувствительны к воздействию температурной нагрузки. Как известно, развитие икры этих видов происходит при низкой температуре (от 0,2–0,1 °C зимой до 3–4 °C весной) (Рыжков, 1976; Кох и др., 1980). Наиболее сильно сказывается влияние высокой температуры у нарвской кумжи на этапах начала кровообращения, пигментации глаз, перед выклевом эмбрионов и у 35-суточных личинок (рис. 1); у ла-

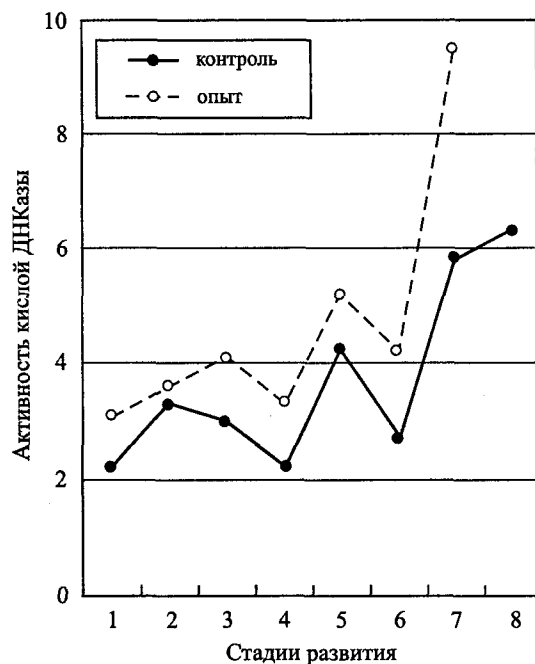


Рис. 2. Влияние температуры 22 °С на активность кислой ДНКазы озерного лосося в раннем онтогенезе.

По оси ординат – активность фермента в $\Delta E_{260}/\text{мг}$ белка. По оси абсцисс – этапы эмбрионального развития: 1 – VI этап, функционирование системы кровообращения; 2 – VI этап, полная пигментация глаз; 3 – VII этап, дифференцировка непарных плавников; 4 – VII этап, жаберная крышка прикрывает первую пару жаберных дуг; 5 – VII этап, скопление мезенхимы в области брюшных плавников; 6 – VII этап, жаберная крышка прикрывает две пары жаберных дуг; 7 – VII этап, на голове формируется “пигментная шапочка”; 8 – VII этап, зародыш перед выклевом

дожского лосося – на VII этапе развития (скопление мезенхимы в области брюшных плавников) и на одной из последних стадий эмбриогенеза – “пигментной шапочки” (рис. 2); у радужной форели – на этапах гаструляции, органогенеза и функционирования системы кровообращения (рис. 3). На рисунках представлены данные по нуклеазам, активность других гидролаз изменялась сходным образом.

Под влиянием экстремальной температуры изменялась и связь лизосомальных ферментов с мембранными структурами, о чем можно судить по уровню неосаждаемой активности фермен-

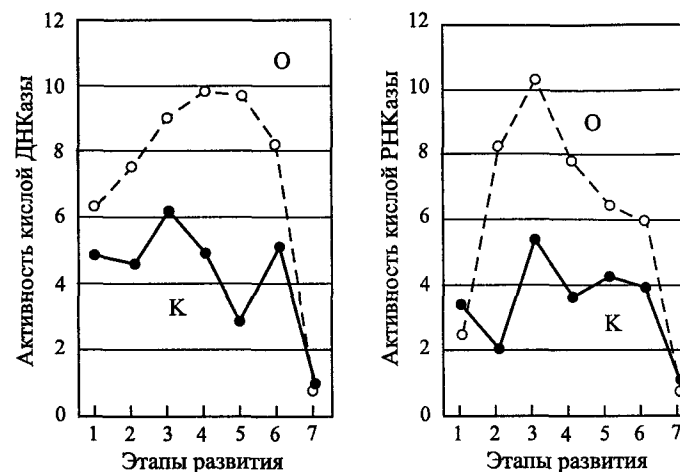


Рис. 3. Влияние температуры 22 °С на активность кислых ДНКазы и РНКазы радужной форели на разных этапах эмбриогенеза.

По оси ординат – активность фермента в $\Delta E_{260}/\text{мг}$ белка. По оси абсцисс – этапы развития: 1 – II этап, дробление зародышевого диска; 2 – III этап, гаструляция; 3 – IV этап, органогенез (40 пар сомитов); 5 – IV этап, функционирование системы кровообращения; 6 – VII этап, дифференцировка непарных плавников; 7 – личинки

тов (табл. 5–7). Как правило, температурное воздействие вызывало снижение не связанной со структурами активности ферментов. Более лабильной была эта связь для некоторых гидролаз у нарвской кумжи на стадии пигментации глаз (4) и перед выклевом зародышей (9), у озерного лосося на этапе образования “пигментной шапочки” (7) и у радужной форели в момент гаструляции (2), органогенеза (4) и функционирования системы кровообращения (5).

То же самое можно сказать и о связанной с органеллами активности ферментов. В лизосомально-митохондриальной фракции практически на всех стадиях эмбриогенеза нарвской кумжи воздействие температуры вызывало снижение активности кислой фосфатазы и β -глюкозидазы, активность связанных нуклеаз значительно повышалась на стадии пигментации глаз (4) и у эмбрионов перед выклевом (9). В личиночный период отмечено повышение уровня активности всех ферментов у 35-суточных личинок (табл. 8).

В ядерной фракции значительно чаще наблюдалось повышение активности изученных ферментов под воздействием “удар-

Таблица 5

Изменение свободной активности лизосомальных ферментов в раннем онтогенезе нарвской кумжи под воздействием температуры 22 °С (на 1 мг белка; этапы развития 1–13, как на рис. 1)

Этап развития	Фосфатаза		Глюкозидаза		ДНКаза		РНКаза	
	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт
1	0,0	0,0	0,024	0,044	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,41	0,0	0,024	0,060	0,12	0,43	0,07	0,0
3	0,24	0,26	0,025	0,025	0,25	0,0	0,27	0,45
4	0,11	0,42	0,006	0,0	0,17	1,6	0,09	1,75
5	0,36	0,18	0,040	0,0	0,60	0,30	0,74	0,0
6	0,08	0,0	0,0	0,0	0,50	0,27	0,47	0,34
7	0,44	0,0	0,159	0,193	0,21	0,21	0,43	0,11
8	0,22	0,08	0,033	0,0	0,0	0,0	0,18	0,0
9	0,24	0,63	0,119	0,280	0,28	1,67	0,23	0,05
10	0,21	0,18	0,092	0,004	0,08	0,06	0,18	0,09
11	0,39	0,16	0,111	0,0	0,03	0,11	0,21	0,08
12	0,22	0,19	0,032	0,021	0,29	0,08	0,13	0,12
13	0,20	0,27	0,012	0,010	0,14	0,17	0,05	0,13

Таблица 6

Изменение свободной активности лизосомальных ферментов в эмбриогенезе озерного лосося под воздействием температуры 22 °С (на 1 мг белка; этапы развития 1–7, как на рис. 2)

Этап развития	Фосфатаза		Глюкозидаза		ДНКаза		РНКаза	
	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,27	0,0	0,19
2	1,07	0,60	0,15	0,09	0,56	0,50	0,62	0,38
3	0,22	0,0	0,05	0,01	0,24	0,13	0,45	0,11
4	0,16	0,07	0,0	0,0	0,46	0,42	0,0	0,10
5	0,0	2,04	0,03	0,01	0,42	0,24	0,13	0,29
6	0,0	0,0	0,0	0,01	0,27	0,32	0,14	0,16
7	0,36	0,84	0,06	0,24	0,52	1,12	0,14	0,88

Таблица 7

Изменение свободной активности лизосомальных ферментов в раннем онтогенезе радужной форели под воздействием температуры 22 °С (на 1 мг белка; этапы развития 1–7, как на рис. 3)

Этап развития	Фосфатаза		Глюкозидаза		ДНКаза		РНКаза	
	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт
1	0,0	0,09	0,28	0,12	0,35	0,37	0,14	0,0
2	0,08	0,80	0,07	0,26	0,30	0,24	0,05	0,06
3	0,0	0,12	0,0	0,0	1,05	0,80	1,25	2,50
4	0,16	0,33	0,04	0,18	0,24	0,30	0,48	0,97
5	0,05	0,40	0,05	0,21	0,0	0,36	0,20	1,17
6	0,05	0,0	0,01	0,05	0,12	0,06	0,18	0,22
7	0,51	0,37	0,02	0,03	0,31	0,28	0,0	0,0

Таблица 8

Связанная с лизосомально-митохондриальной фракцией активность ферментов в развивающейся икре нарвской кумжи при воздействии высокой (22 °С) температуры (на 1 мг белка; этапы развития 1–13, как на рис. 1)

Этап развития	Фосфатаза		Глюкозидаза		ДНКаза		РНКаза	
	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт
1	0,0	0,0	0,16	0,12	0,91	0,88	1,18	1,64
2	0,80	0,21	0,28	0,28	1,44	0,50	1,82	1,39
3	0,11	0,03	0,12	0,02	1,02	0,70	1,23	0,82
4	0,04	0,10	0,05	0,04	0,82	1,92	0,67	2,08
5	0,0	0,0	0,26	0,08	1,35	1,15	1,25	1,06
6	0,04	0,02	0,06	0,08	0,96	1,19	1,06	1,07
7	0,33	0,0	0,56	0,24	1,35	1,98	0,94	1,13
8	0,24	0,07	0,48	0,0	2,52	1,75	1,80	2,58
9	0,30	0,31	0,19	0,53	1,98	1,78	1,60	2,07
10	0,09	0,32	0,40	0,06	2,52	1,09	2,07	1,59
11	0,13	0,09	0,39	0,06	1,32	1,07	1,54	1,58
12	0,0	0,15	0,26	0,72	2,15	5,00	2,25	4,38
13	0,28	0,30	0,10	0,05	1,16	1,00	0,94	0,72

ной” температурной нагрузки, особенно это относится к нуклеазам (табл. 9).

У озерного лосося в ядерной фракции повышенная температура на всех этапах развития вызывала возрастание удельной (рассчитанной на один мг белка) активности ДНКазы, у радужной форели это отмечалось и в лизосомально-митохондриальной фракции.

Таблица 9

Связанная с ядерной фракцией активность кислых гидролитических ферментов в развивающейся икре нарвской кумжи при воздействии высокой (22 °С) температуры (на 1 мг белка; этапы развития 1–13, как на рис. 1)

Этап развития	Фосфатаза		Глюкозидаза		ДНКаза		РНКаза	
	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт
1	0,29	0,54	0,53	0,53	1,73	0,90	0,46	0,65
2	1,25	0,42	0,50	0,46	1,42	1,45	0,77	0,75
3	0,46	1,00	0,39	0,27	0,92	2,55	0,48	1,77
4	0,44	1,08	0,17	1,05	1,00	3,70	0,93	2,40
5	1,17	0,60	0,69	1,05	4,46	1,95	1,14	0,54
6	0,65	0,36	0,04	0,15	2,95	1,23	1,76	1,08
7	1,26	0,58	0,56	0,46	0,47	4,64	0,15	0,25
8	1,34	1,00	0,55	0,45	5,57	5,90	0,07	0,12
9	0,97	1,08	0,37	0,45	3,28	6,10	0,61	1,20
10	1,31	1,46	0,29	0,25	4,63	3,58	1,54	1,00
11	1,10	0,60	0,13	0,01	1,85	1,66	0,82	0,88
12	0,53	0,50	0,37	0,41	2,19	3,24	0,99	0,86
13	0,29	0,38	0,11	0,09	1,00	1,55	0,29	0,76

Таким образом, полученные в этих экспериментах результаты отражают своеобразие реакции лизосомального аппарата развивающегося организма на воздействие экстремальных температурных условий. Эта реакция зависела от вида рыбы, этапа ее развития и специфики действия изучаемой ферментной системы.

Сезонная динамика лизосомальных ферментных систем. Вопрос о температурных адаптациях рыб теснейшим образом связан с сезонными колебаниями метаболизма, для пойкилотермных животных именно температура является ведущим фактором, определяющим ритмичность биологических процессов (Озернюк, 1992, 2000).

В течение года температура водоема значительно изменяется. Так, в озерах Карелии температура воды с декабря до конца апреля составляет всего 1,0–1,5 °С. В мае наблюдается резкий скачок: вода прогревается до 20 °С. Начиная с августа, происходит постепенное снижение температуры (Китаев, 1984). Эти колебания температуры сказываются и на состоянии кормовой базы рыб, и на их пищевой активности (Шустов, 1983), а, следовательно, и на интенсивности обмена веществ.

Изучение динамики активности лизосомальных ферментов у пяти видов рыб (форели, сига, окуня, щуки, налима), находив-

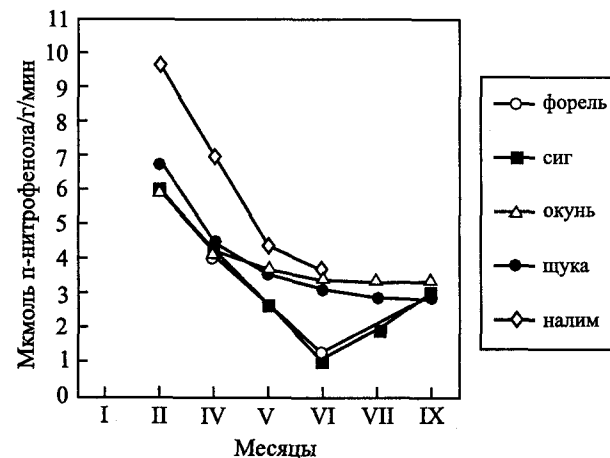


Рис. 4. Сезонная динамика кислой фосфатазы в печени рыб

шихся в естественных условиях, показало, что в зимне-весенние месяцы (февраль–апрель) общая их активность в печени рыб в 2–4 раза выше, чем в летние (май–август) (рис. 4).

Отмечены сезонные различия и во фракционном составе кислой фосфатазы (Руоколайнен, Высоцкая, 1981; Высоцкая и др., 1988). Во-первых, наблюдалось увеличение в летнее время относительной активности низкомолекулярной формы, уменьшение относительной активности высокомолекулярной лизосомальной и цитоплазматической гетероформ кислой фосфатазы. Во-вторых, происходило возрастание доли анионных форм фермента в летние месяцы по сравнению с зимними. При этом абсолютные значения активности каждой из гетероформ кислой фосфатазы летом были ниже, чем зимой.

Наличие в лизосомах гетероформ фермента с молекулярными массами 300 и 100 кДа может свидетельствовать об олигомерном строении фермента. Возможно, гетероформа с массой около 300 кДа содержится в первичных лизосомах, а при трансформации их во вторичные лизосомы происходит диссоциация олигомера на молекулы с массой 100 кДа. Если это предположение верно, то наблюдаемое зимой увеличение относительной активности высокомолекулярной лизосомальной изоформы говорит об усилении синтеза первичных лизосом *de novo*, взаимопревращения же этих двух форм или относительное преобладание активности одной из них могут представлять собой механизм регуляции действия лизосомальных ферментов (Руоколайнен, 1985).

Обнаруженное возрастание общей активности лизосомальных ферментов зимой также говорит в пользу интенсивного синтеза большого числа лизосом у рыб в этот сезон года.

Следует отметить, что в наших работах по влиянию различных токсикантов на лизосомы рыб было выявлено, что в зимне-весенний период проницаемость мембран, а следовательно, и повреждаемость их токсикантами наибольшая (Высоцкая и др., 1978; Высоцкая, 1999). Летом лизосом синтезируется меньше и их мембраны более стабильны. Может быть, большая проницаемость и меньшая устойчивость лизосомальных мембран в зимний-весенний период связана с более высоким содержанием в них полиеновых жирных кислот.

Отмеченные факты, а также увеличение зимой относительной активности цитоплазматической гетероформы кислой фосфатазы могут служить указанием на активизацию процессов аутофагии у рыб в зимний период. В естественных водоемах на рыб действует комплекс факторов, основным из них, определяющим жизнедеятельность наряду с температурой, является обеспеченность пищей. При понижении температуры происходит снижение пищевой активности рыб. Для обеспечения организма энергией включаются компенсаторные механизмы изменения стандартного обмена. При этом, как отмечалось выше, возрастает интенсивность многих реакций катаболизма (Хочачка, Сомеро, 1988), в том числе и тех из них, которые осуществляются с участием лизосомальных ферментов, происходит переключение на другие механизмы получения энергии.

Таким образом, приведенные данные позволяют сделать вывод об участии лизосом в биохимической адаптации организма рыб к меняющейся температуре среды, о включении их на определенном этапе адаптивных перестроек в механизмы регуляции ферментативных реакций. То, что в мышцах при акклимации к низкой температуре наблюдалось снижение активности лизосомальных ферментов, а в печени – повышение, свидетельствует о тканевой специфичности адаптивных перестроек. Достоверное снижение латентной активности кислых гидролаз при тепловой акклимации было выявлено также Миланези и Бердом (Milanesi, Bird, 1972) в скелетных мышцах радужной форели. Показано, что при акклимации пойкилотермных животных к температурным изменениям одни и те же функции в разных тканях ведут себя неодинаково (Александров, 1975). Видимо, в печени и мышцах сдвиг температуры вызывает разные компенсаторные изменения метаболизма, что характерно и для гомойотермных животных (Табукашвили и др., 1991). Активизация лизосомальных ферментов у рыб при сезонной акклиматиза-

ции свидетельствует о переходе организма с понижением температуры на эндогенное питание. Адаптивные перестройки в функционировании лизосом в этот период направлены на оптимальное перераспределение внутриклеточных резервов, обеспечение организма материалами для необходимого синтеза и выработки энергии.

Влияние температуры на активность ферментов в ходе зимовки рыб. В жизненный цикл некоторых видов рыб, например, карповых, включен этап, который называется “зимовка”. Гибель молоди карпа в зимовальный период, как показывают исследования, в значительной степени является результатом физиолого-биохимической неподготовленности ее к зимовке, хотя непосредственная причина ее гибели – неподходящие условия зимовки (слишком низкая температура воды, нехватка кислорода, несоблюдение биотехники, заболевания и травмы). Все эти факторы могут вызвать у зимующих рыб стрессовую реакцию, которая будет сопровождаться в каждом конкретном случае как общими для любого адаптационного синдрома биохимическими признаками, так и особыми специфическими признаками, характерными только для данного экстремального фактора. Чтобы выявить биохимическое своеобразие реакции организма молоди карпа на отдельные экстремальные факторы во время зимовки, была проведена экспериментальная работа на базе ВНИИ прудового рыбного хозяйства. Итоги этих исследований отражены в целой серии публикаций сотрудников лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН (Биохимия молоди..., 1987; Богдан, 1986).

Материалом для исследований служили сеголетки карпа, отловленные из экспериментальных зимовальных прудов осенью перед зимовкой (октябрь–ноябрь), в середине зимы (декабрь–январь) и весной в конце зимовки (март–апрель). На биохимический анализ брали печень, мышцы, жабры, почки, головной мозг рыб. Для оценки физиологического состояния молоди карпа использовали следующие биохимические показатели: около 45 липидных компонентов (включая до 30 жирных кислот), 6 лизосомальных ферментов, катализирующих гидролиз белков, нуклеиновых кислот, углеводов и фосфорных эфиров, 6 групп окислительных ферментов, 7 показателей, характеризующих биосинтез белков, липидов, нуклеиновых кислот, а также качественный и количественный состав водорастворимых белков. Было показано, что из 75 изученных показателей заметно реагировали на зимовальные факторы в печени 25, а в мышцах 17. Более чем в три раза на протяжении зимовки в печени варьировали такие показатели, как активность катепсина D, β -глюкозидазы, включение

радиоактивных предшественников в липиды, РНК, ДНК, белки, содержание свободного оксипролина, эфиров холестерина; а в мышцах – активность катепсина D, цитохромоксидазы, изоферментов ЛДГ, содержание цАМФ, витаминов В₁, В₂, В₆, свободного оксипролина, белка первой фракции, триацилглицеринов. Полученные результаты позволили в значительной степени приблизиться к установлению физиологических причин плохой выживаемости молоди карпа в период зимовки.

В ходе этих исследований были проведены модельные эксперименты по акклимации карпа к разным температурам, в которых было показано, что амплитуда и направленность изменения активности лизосомальных ферментов в разных тканях зависела как от вида ткани, так и от начальной температуры акклимации рыб. Сеголетков карпа содержали в аквариумах с температурой 18° и 7 °С. Далее проводили опыты по холодовой акклимации рыб. Из аквариумов с температурой 7 °С их пересаживали в аквариумы с температурой 0 °С и выдерживали в этих условиях в течение 24 дней. Кроме того, осуществляли опыты по кратковременному (12 часов) воздействию низкой температуры: из воды с температурой 18 °С и 7 °С рыб переносили в 0 °С. В печени и мышцах карпов определяли активность лизосомальных гидролаз, ферментов углеводного обмена и содержание липидов. Как видно из данных, представленных в табл. 10, 11, более высокая активность лизосомальных ферментов была в мышцах и печени рыб, живших при температуре 7 °С, по сравнению с акклимированными к 18 °С.

Когда молодь карпов перемещали из воды с температурой 7 °С в воду с температурой 0 °С, то через 24 дня активность кислых гидролаз в печени возрастала, а в мышцах заметно снижалась по сравнению с ее начальным уровнем (см. табл. 10 и 11). Подобные результаты были получены и при кратковременной холодовой акклимации. Так, при перемещении карпов из 7 °С в 0 °С активность РНКазы в печени повышалась с 0,77 до 0,82; а из 18 °С в 0 °С наблюдалось еще большее увеличение – до 1,09 единиц. Как отмечалось выше, биохимическая адаптация к меняющимся температурным условиям может осуществляться и за счет изменения качества фермента, его свойств, например, энергии активации, сродства к субстрату, конформации, и за счет увеличения его количества в клетке. Известно, что адаптация к холоду приводит к смещению метаболизма в анаболическую сторону, происходит интенсивный синтез белка, повышается содержание ферментов (в том числе и лизосомальных) в клетке (Александров, 1975). Этим, видимо, и объясняется более высокая активность изученных нами ферментов в печени карпов, акклимированных к низкой температуре. Усилен-

ные протеолитической активности было выявлено в печени и мозге крыс при изучении их динамики акклимации к холоду (Ломакина, Шугалей, 1980). Однако в скелетных мышцах рыб при холодовой акклимации нами обнаружено понижение активности лизосомальных ферментов. Вероятно, в этом случае имеет место более сложный механизм, чем простое переключение метаболизма на интенсивный синтез ферментов. Одним из способов регуляции обменных процессов в клетке является контроль за количеством фермента, выражающийся в поддержании сбалансированности между синтезом и деградацией ферментов. В расщеплении макромолекул белков активную роль выполняют протеолитические ферменты, и среди них большой вклад вносят кислые протеиназы, заключенные в лизосомах (Bohley, 1968). В наших экспериментах было показано, что при понижении температуры воды активность катепсинов В и D в печени и мышцах молоди карпов повышалась, а затем при снижении ее до предельно низких значений (близких к нулю) резко падала (Немова, 1992). Объясняется это тем, что близкие к нулевым значениям температуры выходят за пределы адаптивных возможностей молоди карпа.

Полученные данные позволяют сделать вывод об активном участии лизосом в биохимической адаптации организма рыбы к меняющейся температуре среды, о включении их на определенном этапе адаптивных перестроек в механизмы регуляции ферментативных реакций. У холодноводной радужной форели и обитающего в теплых водах

Таблица 10

Активность лизосомальных ферментов в мышцах карпа при акклимации к разной температуре (n = 5)

Температура воды, °С	РНКаза*	ДНКаза*	Фосфатаза**
18	0,58	0,25	1,37
7	0,66	0,42	1,26
0	0,17	0,20	0,77

Примечание. * – В ΔE₂₆₀ на 1 мг белка; ** – в микрограммах фосфора на 1 мг белка. Здесь и далее на рисунках и в таблицах, если не сказано иначе, имеется в виду общая активность ферментов.

Таблица 11

Активность лизосомальных ферментов в печени карпа при акклимации к разной температуре (n = 5)

Температура воды, °С	РНКаза*	ДНКаза*	Фосфатаза**
18	0,17	0,16	3,23
7	0,37	0,19	5,03
0	0,45	0,32	8,18

Примечание. Обозначения те же, что в табл. 10.

карпа механизмы адаптации к температуре одинаковы. Однако существует тканевая специфичность адаптивных перестроек и асинхронность в подключении разных лизосомальных ферментов в реакции. Адаптивные преобразования в клетке осуществляются как за счет количественных изменений содержания ферментов, так и за счет регуляции качественного состава их изоформ.

2.2. ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Важным экологическим фактором, с которым связано удовлетворение энергетических потребностей организма рыбы является наличие кислорода в воде (Озернюк, 1992). Потребность в кислороде меняется в процессе онтогенеза рыб, существенно различается у представителей разных видов и экологических групп (Рыжков, 1976; Кляшторин, 1982; Столбов и др., 1995, 1996; Шульман и др., 2003; Polat et al., 1995). Концентрация кислорода во внешней среде оказывает влияние на темпы роста и развития рыб. При гипоксии организм переключается на альтернативные источники обеспечения энергией. Так, при гипоксии и полной аноксии для энергообеспечения разные экологические группы рыб используют в той или иной степени катаболизм белка.

В работах, выполненных в нашей лаборатории, показано влияние этого фактора на активность лизосомальных и некоторых других ферментов у рыб. В экспериментах с развивающейся икрой сига установлено, что длительная гипоксия (6 недель) вызвала снижение уровня активности лизосомальных протеиназ, что объяснялось снижением адаптационных возможностей лизосомального аппарата. В этих опытах отмечалась значительная гибель икры сига (Немова, 1992).

По нашим данным, у молоди карпа происходило возрастание активности кислой фосфатазы и катепсина D в ответ на кратковременную гипоксию и снижение активности лизосомальных ферментов в печени и мышцах рыб, живших в условиях с повышенным содержанием кислорода (Высоцкая и др., 1985).

Изучение уровня активности лизосомальных ферментов у годовиков карпа из прудовых хозяйств после зимовки показало, что в вариантах с увеличенной плотностью посадки (3, 4 и 5) в мышцах и в печени отмечался повышенный уровень кислой фосфатазы (табл. 12) и глюкозидазы, что можно рассматривать как свидетельство того, что в этих прудах складывались неблагоприятные для развития молоди условия. Одним из негативных факторов в этой си-

Таблица 12

Активность лизосомальных ферментов в мышцах годовиков карпа, выращиваемых в поликультуре, из прудов с разной плотностью посадки (на 1 г сырого веса ткани/мин)

Фермент	Варианты				
	1	2	3	4	5
Фосфатаза	0,18	0,13	0,23	0,25	0,28
β-глюкозидаза	0,03	0,02	0,03	0,03	0,04
ДНКаза	0,16	0,15	0,11	0,16	0,09
РНКаза	0,37	0,27	0,31	0,48	0,38

Примечание. Сравнимые варианты:
1 – карп, 60 тыс., и белый толстолобик, 40 тыс./га; 2 – карп, 60 тыс., и пестрый толстолобик, 40 тыс./га; 3 – карп, 60 тыс., белый толстолобик, 11 тыс., и пестрый толстолобик, 42 тыс./га; 4 – карп, 85,8 тыс., и пестрый толстолобик + гибрид толстолобика, 40 тыс./га; 5 – карп, 73 тыс., и белый толстолобик, 53 тыс./га.

Таблица 13

Активность ферментов в мышцах годовиков радужной форели, содержащихся в садках в акваториях с разным содержанием кислорода

Сравниваемые варианты	Активность ферментов / мг белка / мин					
	КФаза	ДНКаза	РНКаза	Глюкозидаза	Альдолаза	ЩФаза
Сямозерский рыбозавод	0,10	0,44	0,40	0,077	7,83	0,21
Вохтозеро*	0,12	0,26	0,31	0,047	23,88	0,12
Крошнозеро**	0,08	0,36	0,34	0,028	15,33	0,06

Примечание. * – Пониженное содержание кислорода (меньше 9 мг/л);
** – Антропогенное загрязнение воды.

туации является дефицит кислорода, что существенно влияет на выживаемость рыб в период зимовки (Биохимия молоди ..., 1987).

О высокой чувствительности к изменению экологических условий, в том числе к содержанию кислорода, лизосомального аппарата рыб говорят результаты садкового эксперимента с годовиками радужной форели. Молодь рыбы в течение месяца жила в садках в различных акваториях двух водоемов (Крошнозеро и Вохтозеро), имевших в момент проведения эксперимента пониженное содержание кислорода. Активность кислых нуклеаз и β-глюкозидазы в мышцах снижалась, но в 2–3 раза возрастала активность альдолазы, что позволяет говорить о перестройке в системах энергообеспечения, включении при недостатке кислорода компенсаторных анаэробных механизмов производства энергии (табл. 13).

2.3. РОЛЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В РЕАКЦИЯХ РЫБ НА ТОКСИЧЕСКИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

Как уже упоминалось, количество токсических веществ, поступающих в водоемы с промышленными, хозяйственными и бытовыми стоками, исчисляется десятками тысяч и с каждым годом этот список пополняется множеством новых, синтезированных человеком химических соединений, которые могут составить опасность для животных, в том числе гидробионтов (Брагинский, 1972; Влияние загрязняющих..., 1979; Патин, 1979; Яблоков, Остроумов, 1985; Филенко, 1988). О степени загрязнения водных объектов токсикантами разной природы красноречиво говорит фраза из книги С. С. Юфита (2002): "... мы пьем не чистую воду, загрязненную стоками, а стоки, которые разбавлены чистой водой" (с. 44). Многие из этих веществ проявляют мутагенные, канцерогенные, тератогенные свойства, нарушают структурно-функциональные системы клетки, оказывая влияние на мембранные образования, ферментный и генетический аппарат (Врочинский и др., 1980; Яблоков, Остроумов, 1983; Ильницкий и др., 1993). Поллютанты, входящие в промышленные стоки, изменяют физические и химические свойства воды, оказывают отрицательное действие на водные сообщества.

Современные исследования по водной токсикологии проводятся на молекулярном, субклеточном, тканевом и организменном уровнях, поэтому ихтиотоксикология опирается на достижения биохимии физиологии и экологии рыб. Ихтиотоксикологию следует рассматривать как важнейшую, самостоятельную ветвь санитарной гидробиологии. Центром внимания рыбохозяйственной токсикологии, по мнению В.И. Лукьяненко (1967, 1983), должен быть рыбохозяйственный водоем в целом, вся сложная цепь соподчиненных процессов. Таким образом, рыбохозяйственная токсикология призвана решать вопросы, связанные с влиянием токсикантов на динамику численности и запасы экономически ценных видов рыб. В результате многочисленных исследований установлены прямой и косвенный пути влияния токсикантов на рыбопродуктивность водоемов, то есть непосредственное токсическое влияние на все стадии жизненного цикла рыб, начиная с оплодотворенной икринки и кончая взрослым организмом, а также на кормовую базу рыб и условия обитания, на физико-химический и гидробиологический режим водоемов (Лукьяненко, 1983; Кошелев, 1984). Загрязнение вод отрицательно сказывается на всех звеньях трофической цепи, но особое значение имеет исследование действия токсикантов на рыб, являющихся послед-

ним звеном пищевой цепи, в котором токсические вещества концентрируются (Лукьяненко, 1967).

Чрезвычайно важной и трудной задачей ихтиотоксикологии является диагностика отравлений рыб в естественных водоемах. Задача эта усложняется тем, что, часто в водоемы попадает комплекс загрязнений от нескольких источников. В этом случае необходимы эксперименты для выяснения картины отравлений рыб той или иной группой веществ, определения приоритетных токсикантов. Причем следует выявлять всю гамму изменений, начиная с поведения и кончая внутренними показателями отклонения от нормы: биохимическими, физиологическими, морфологическими (Флеров, 1989). Довольно часто симптомы отравления у рыб и других животных, подвергшихся воздействию различных химических веществ, сходны (Браун, Моженко, 1987), что, безусловно, затрудняет диагностику. Но, учитывая большую практическую значимость таких данных, поиск в этом направлении необходимо продолжить с привлечением современных физиолого-биохимических методов.

На любое токсическое действие организм отвечает довольно сложно, и прежде всего реакция проявляется на уровне мембранных структур клетки и макромолекул. Как правило, изменения на тканевом и организменном уровне становятся заметными несколько позже (Heißmeier et al., 1973). На этом основании предлагается раннюю диагностику токсикозов проводить с привлечением исследований на клеточном и субклеточном уровнях.

В последнее время цитологами и биохимиками показано, что в развитии патологических процессов, детоксикации ядов активное участие принимают лизосомы. По данным многих исследователей, любые чужеродные вещества, попав в клетку, захватываются лизосомами, им отводится одна из ведущих ролей в механизмах клеточной защиты. Так как патологический процесс, вызванный в организме каким-либо токсическим веществом или физическим фактором, проходит стадию разрушения внутриклеточных структур, совершенно очевидно, что в ликвидации этих аварийных очагов в клетке также принимают участие лизосомальные органеллы. Это убедительно продемонстрировано, в основном, для теплокровных животных и человека. И, поскольку показано, что общие закономерности и механизмы развития токсического процесса у рыб сходны с аналогичными у более высокоорганизованных животных, была выдвинута гипотеза о возможности применения такого подхода при ихтиотоксикологических исследованиях (Сидоров и др., 1975). Все вышесказанное определило выбор именно этого

направления в наших исследованиях – изучение реакции лизосомального аппарата на воздействие различных токсических веществ.

Влияние сточных вод целлюлозно-бумажного комбината на лизосомальный аппарат рыб. Сточные воды предприятий целлюлозно-бумажной промышленности остро токсичны для гидробионтов (Гидробиология..., 1988; Kukkonen, 1996). В их составе содержатся такие токсические вещества, как фенолы, меркаптаны, лигнин, сернистые соединения, диметилсульфит, дубильные вещества, метиловый и другие спирты, а также смоляные и жирные кислоты, обладающие детергирующими свойствами (Комшилов, 1965; Сидоров и др., 1978; Овчинников, 1987), поэтому их выпуск в водоемы вызывает нежелательные последствия, оказывает негативное влияние на гидробионтов (Метелев и др., 1971; Грушко, 1981; Стом, 1982). Вопрос о влиянии стоков бумажного производства на жизнь водных обитателей изучается давно (Правдин, 1948; Bartsch, 1963; Китаев, 1974; Веселов, 1977; Кауфман, 1978). Довольно много работ, посвященных изучению влияния фенола на рыб и других гидробионтов (Лукияненко, 1967, 1983; Влияние фенольных..., 1981; Флеров, 1989). Однако исследований на биохимическом уровне, которые объяснили бы тонкие механизмы реагирования живых организмов на этот фактор среды, пока все еще недостаточно.

Для выяснения влияния и степени токсичности некоторых компонентов промышленных стоков на организм рыб были проведены эксперименты в условиях *in vivo* (аквариальные и садковые опыты) и в условиях *in vitro* (с изолированными из клеток лизосомами). Испытывалось воздействие сульфатного щелока, фенола, смоляных кислот.

В частности, был проведен садковый эксперимент на Выгозере, на берегу которого расположен крупнейший в Европе Сегежский целлюлозно-бумажный комбинат (ЦБК). Лещей, отловленных в чистой зоне, помещали в садки размером 3 × 3 × 3 м, которые устанавливали в загрязненной промстоками зоне озера. Через определенные интервалы времени от 8 до 120 часов рыбу брали для проведения биохимического анализа. Контролем служили лещи, отловленные в чистой зоне. Кроме того, для сравнения были взяты лещи из среднезагрязненной зоны озера, предполагалось, что они адаптировались к этим условиям. Результаты садкового эксперимента показали, что реакция организма рыбы на этот фактор очень сложна и зависит от времени нахождения в условиях эксперимента. В первые часы пребывания рыбы в сад-

ках с загрязненной промстоками водой у нее происходит некоторое понижение активности изученных лизосомальных ферментов, затем с 12 до 30 часов наблюдается повышение свободной (не связанной с лизосомами) активности ферментов и к 60 часам снижение ее до первоначального уровня. У лещей, взятых на анализ через 5 суток, все гидролазы имели повышенную активность (Высоцкая, Сидоров, 1981). Сравнение активности лизосомальных ферментов печени контрольных лещей из загрязненной и чистой зон показало, что у первых активность ферментов гораздо выше. Видимо, в процессе адаптации к условиям постоянной интоксикации в печени рыб увеличивается выработка лизосом, о чем можно судить по повышению свободной и связанной активности лизосомальных ферментов. Рост свободной активности ферментов, наблюдающийся при этом, вызван, вероятно, выходом ферментов из лизосом в результате повышения проницаемости мембран. Это может происходить под прямым или опосредованным влиянием отдельных компонентов, входящих в состав промышленных стоков, на лизосомы.

Сотрудниками нашей лаборатории было отмечено, что липидный состав лизосомальной фракции, выделенной из печени этих лещей, под влиянием сточных вод ЦБК сильно изменяется (Сидоров, Лизенко, 1979; Лизенко, 1982). Несомненно, это может вызвать увеличение проницаемости мембран лизосом.

Известно, что в печени происходит детоксикация чужеродных веществ. Однако остается неясным, каково непосредственное участие лизосом в этом процессе. Связано ли наблюдаемое в экспериментах увеличение свободной активности лишь с ликвидацией внутриклеточных повреждений, вызванных действием токсических веществ (лизис поврежденных мембран, органелл и т.п.) или лизосомы (или их ферменты) каким-то образом непосредственно участвуют в механизме детоксикации чужеродных веществ. Если первое положение не вызывает особых сомнений, то второе требует основательных доказательств. Можно допустить, что лизосомы, соединяясь с фагосомами, поглотившими какие-то комплексы с чужеродными веществами, затем через выведение поглощенных веществ из клеток в процессе экзоцитоза частично осуществляют гидролитическую модификацию этих комплексов, чтобы уменьшить их молекулярный вес и увеличить растворимость, что необходимо для дальнейшего выведения токсикантов.

Основным компонентом промышленных стоков ЦБК является *сульфатный щелок*, поэтому следующим этапом в изучении влияния стоков на организм гидробионтов были эксперименты

по действию на лизосомы рыб сульфатного щелока в опытах *in vitro* (в пробирке). Для исследований брали печень, так как этот орган осуществляет детоксикацию различных ядов и наиболее богат лизосомами. Фракцию лизосом выделяли из гомогената печени методом дифференциального центрифугирования. Суспензию лизосом инкубировали с растворами сульфатного щелока разной концентрации (конечные разведения составляли в 5000, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10 раз). Затем после осаждения лизосом центрифугированием в среде их инкубации определяли активность лизосомальных ферментов. Осадок лизосом отмывали 0,25 М раствором сахарозы, добавляли детергент тритон X-100 для полного разрушения лизосом и выявления связанной, заключенной внутри частиц, активности ферментов (Высоцкая и др., 1978).

Полученные в этой серии экспериментов данные позволили сделать вывод о том, что сложная смесь химических агентов, которой является сульфатный щелок, при воздействии на лизосомы *in vitro* приводит к разрушению лизосомальных мембран и выходу кислых гидролаз в цитоплазму клетки. Об этом свидетельствует повышение неседиментируемой активности кислых ДНКазы и РНКазы при одновременном уменьшении седиментируемой (осаждающейся при центрифугировании с частицами) активности этих ферментов. В пользу этого предположения говорят и данные об изменении липидного состава лизосомальных мембран под действием сульфатного щелока (Сидоров, 1983, 1984). Кроме того, некоторые из компонентов сульфатного щелока оказывают ингибирующее влияние на активность отдельных ферментов лизосом, о чем говорит снижение свободной и связанной активности кислой фосфатазы под влиянием высоких концентраций этой сложной смеси веществ. При деструкции лигнина в сточных водах обнаруживается от 15 до 22 токсичных и дурнопахнущих веществ, среди них фенолы, сульфиды, спирты, кетоны, органические кислоты (Грушко, 1981).

То, что кислая фосфатаза является ферментом, весьма чувствительным к действию различных химических агентов, подтверждают данные других авторов (Жуковский, 1965; Allen, Lee, 1972; Покровский, Тутельян, 1976). В своих исследованиях влияния на активность лизосомальных ферментов сульфатного щелока, мы испытывали его воздействие не только на суспензию лизосом, т. е. по существу на лизосомальную мембрану, но и на сам фермент. Для этого готовили гомогенат лизосомальной фракции с тритоном X-100, разрушающим мембрану, осаждали центрифугированием все осколки мембран и микросомы при 105 000 *g* в течение

30 минут, получали раствор ферментов и этот раствор инкубировали с различными концентрациями сульфатного щелока. Установлено, что даже слабые концентрации сульфатного щелока угнетали активность кислой фосфатазы. Активность же нуклеаз не ингибировалась и высокими концентрациями действующего агента. Видимо, в составе сульфатного щелока присутствуют компоненты, к которым кислая фосфатаза проявляет особую чувствительность.

При проведении этих исследований было замечено, что в разные сезоны года прочность, стабильность лизосомальной мембраны, ее чувствительность к токсикантам не одинакова. Так, активность кислой фосфатазы в лизосомах из печени зимнего окуня под влиянием возрастающих концентраций сульфатного щелока повышалась, а в другом случае, когда использовались лизосомы из печени весеннего окуня, снижалась (Высоцкая и др., 1978). Это может свидетельствовать о различном состоянии лизосом у рыб, находившихся на разных стадиях жизненного цикла.

Для выяснения, какой из компонентов сульфатного щелока является ингибитором кислой фосфатазы, мы провели дополнительные исследования, испытывая влияние отдельных составляющих сульфатного щелока, в частности смоляных кислот и фенола.

Опыты по сравнительному изучению влияния фенола на изолированные лизосомы из печени крыс и рыб показали (табл. 14, 15), что этот химический агент ингибирует активность кислой фосфатазы, причем наблюдаемый эффект тем явственней, чем выше концентрация фенола в среде инкубации. Активность нуклеаз при высоких концентрациях фенола значительно возрастает, что в первую очередь, по-видимому, обусловлено разрушением лизосомальной мембраны и выходом из лизосом связанных гидролаз.

Лизосомы крысы слабее реагируют на присутствие фенола в среде инкубации, чем лизосомы рыб. Кроме того, лизосомы рыб, находившихся в разном физиологическом состоянии, по-разному реагировали на действие высоких концентраций фенола. Наиболее чувствительны к нему лизосомальные нуклеазы из печени рыб, взятых на анализ в период нереста.

По современным представлениям возможной точкой приложения различных воздействий среды в клетке могут являться ее мембранные структуры, в том числе и лизосомальная мембрана. Полученные нами результаты подтверждаются данными по изменению липидного состава этих органелл. Было показано, что при действии сульфатного щелока и особенно фенола происходи-

Таблица 14

Изменение свободной активности лизосомальных ферментов под влиянием различных концентраций фенола у крыс ($n = 8$)

Варианты опыта	Фосфатаза*			РНКаза**			ДНКаза**		
	$M \pm m$	δ	CV, %	$M \pm m$	δ	CV, %	$M \pm m$	δ	CV, %
Контроль	2,9±0,6	1,6	55	2,7±0,3	0,9	33	0,2±0,02	0,05	25
10 мг/л	2,2±0,5	1,4	64	2,7±0,2	0,6	24	0,2±0,01	0,02	10
50 мг/л	2,4±0,4	1,2	50	2,6±0,3	0,7	30	0,2±0,01	0,03	13
8 г/л	0,4±0,2	0,6	150	5,0±0,4	1,1	22	0,2±0,03	0,08	40

Примечание. * – В мкМ п-нитрофенола/ 1 г ткани/ мин, ** – ΔE_{260} на 1 мг белка.

Таблица 15

Изменение свободной активности лизосомальных ферментов под влиянием различных концентраций фенола у рыб ($n = 6-12$)

Вид рыбы	Время опыта	Фермент	Варианты опыта			
			Контроль	10 мг/л	50 мг/л	8 г/л
Окунь	Зима	КФаза	1,7	1,5	0,8	0,1
		РНКаза	1,2	1,0	1,2	2,9
		ДНКаза	0,2	0,2	0,2	0,2
	В период нереста	КФаза	2,2	1,4	2,1	0,1
		РНКаза	3,4	5,2	5,2	35,0
		ДНКаза	1,3	2,3	2,3	36,0
	После нереста	КФаза	2,4	0,5	0,5	0,01
		РНКаза	0,4	0,3	0,4	0,4
		ДНКаза	0,7	0,6	0,6	0,6
Лещ	В период нереста	КФаза	2,4	2,4	2,4	0,1
		РНКаза	2,4	2,2	2,1	14,6
		ДНКаза	1,1	2,2	2,5	14,5
	После нереста	КФаза	2,2	2,9	3,0	1,2
		РНКаза	1,0	0,5	0,8	0,6
		ДНКаза	0,7	0,8	0,7	1,1
Плотва	В период нереста	КФаза	2,8	1,2	1,2	0,1
		РНКаза	1,4	6,5	5,5	29,4
		ДНКаза	1,4	3,3	3,7	28,7

ло снижение содержания лецитина, кефалина и сфингомиелина с одновременным увеличением доли лизосоединений. Образование последних может происходить в результате лабильности лизосомальных мембран и высвобождения из частиц под воздействием токсикантов гидролаз широкого спектра действия, в том числе фосфолипаз, липаз, лецитиназы (Лизенко, 1982; Сидоров, 1984).

В составе стоков ЦБК содержится смесь смоляных кислот, образующаяся в процессе варки целлюлозы, доминирующей в этой смеси является *абиетиновая* кислота (Смирнов, Сидоров, 1960; Комшилов, 1965; Сумароков и др., 1965).

Смоляные кислоты – производные дитерпенов, кольцевая структура которых лежит в основе различных групп соединений (таких как витамины, инсектициды, ихтиотоксины, гиббереллины), обладающих специфическим физиологическим действием на живые организмы (Кустова, 1953; Овчинников, 1987). Обнаружено влияние смоляных кислот на обмен веществ животных, в том числе и водных (Davis, Hoos, 1975; Ikeda et al., 1977).

Проводили эксперименты по воздействию натриевой соли абиетиновой кислоты на лизосомальный аппарат животных как в условиях *in vivo*, помещая рыб в ванны с определенными концентрациями смоляной кислоты, так и *in vitro*, инкубируя фракции лизосом из печени рыб с разными дозами действующего агента. Конечная концентрация абиетиновой кислоты в опытах составляла $1 \cdot 10^{-6}$ М, $1 \cdot 10^{-5}$ М, $1 \cdot 10^{-4}$ М, $1 \cdot 10^{-3}$ М, $1 \cdot 10^{-2}$ М.

В опытах *in vivo* в качестве объекта исследования использовали радужную форель. При высоких концентрациях абиетиновой кислоты рыба очень скоро погибала, поэтому для проведения длительных опытов мы остановились на концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М (3 ppm). В таких условиях форель выдерживали от 7 до 21 суток. При вскрытии у побывавших в опытах экземпляров обнаруживались все признаки отравления. Печень у рыб, живших в среде, содержащей абиетиновую кислоту, была более светлой окраски, желчный пузырь был янтарного цвета, тогда как у контрольных – печень была темной, а желчный пузырь зеленого оттенка. Жабры у подопытных рыб были покрыты кровавой слизью, сердце и другие внутренние органы гиперимированы. Общая активность лизосомальных ферментов в 7 изученных органах и тканях (печень, сердце, головной мозг, селезенка, почки, мышцы, жабры) в опыте была ниже, чем в контроле.

В опытах *in vitro* при икубации фракции богатой лизосомами из печени разных видов рыб (окунь, плотва, лещ, сиг, хариус, радужная форель) с абиетиновой кислотой наблюдалось специфиче-

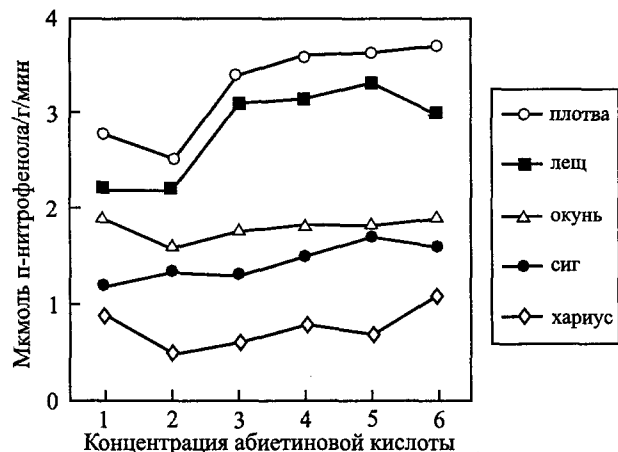


Рис. 5. Изменение свободной активности кислой фосфатазы во фракции лизосом из печени рыб под влиянием абиединовой кислоты

По оси абсцисс – концентрация абиединовой кислоты: 1 – 0; 2 – 10^{-5} ; 3 – 10^{-4} ; 4 – 10^{-3} ; 5 – 10^{-2} ; 6 – 10^{-1} , моль; по оси ординат – активность фермента в мкМ п-нитрофенола/1 г сырого веса ткани/мин

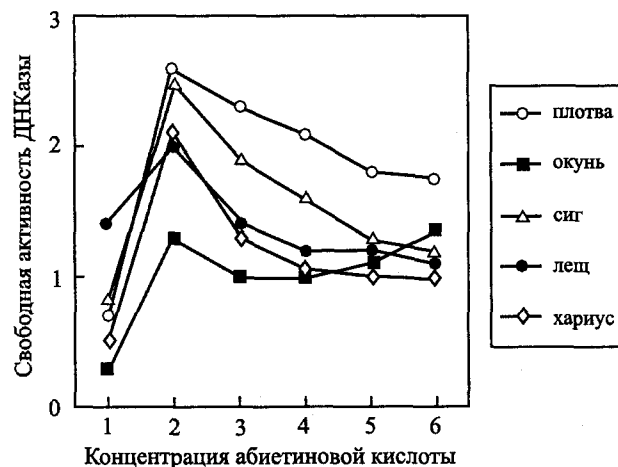


Рис. 6. Изменение свободной активности ДНКазы во фракции лизосом из печени рыб под влиянием абиединовой кислоты.

1 – хариус, 2 – лещ, 3 – сиг, 4 – окунь, 5 – плотва. По оси ординат – активность фермента в $\Delta E_{260}/1$ г сырого веса ткани/мин

ческое для каждого фермента изменение свободной активности, которое зависело от концентрации действующего агента, а также от вида рыбы. Так, активность кислой фосфатазы при увеличении концентрации абиединовой кислоты несколько возрастала, а при самых высоких концентрациях – снижалась (рис. 5), тот же характер изменений наблюдался и для кислых нуклеаз, но увеличение активности ферментов было более значительным (рис. 6). У некоторых рыб зависимость активности кислой РНКазы от концентрации абиединовой кислоты носила более сложный характер. Следует отметить, что такое изменение активности ферментов повторялось очень четко от опыта к опыту, что дает основание считать полученные данные достоверными. Сложный характер этих изменений указывает на разнообразии процессов, происходящих в инкубируемой смеси.

Сравнительное изучение изменения свободной, связанной и общей активности ферментов при воздействии абиединовой кислоты показало, что последняя обладает мембранотропными свойствами. Действуя как детергент, абиединовая кислота оказывает лабилизирующее действие на мембрану лизосом и способствует выходу ферментов из частиц в цитоплазму. В то же время токсикант, вероятно, взаимодействует непосредственно с молекулами высвобождающихся из лизосом ферментов, изменяя их каталитические свойства.

С целью выяснения возможного ингибирующего действия изучаемого вещества на ферменты проводили инкубацию экстрактов гидролаз с вышеуказанными концентрациями абиединовой кислоты. Показано, что высокая доза агента ($1 \cdot 10^{-2}$ М) значительно угнетала активность кислой фосфатазы из печени форели, меньшие концентрации не влияли на этот фермент, активность кислых нуклеаз слабо изменялась при действии абиединовой кислоты (Руоколайнен и др., 1979; 1983).

К настоящему времени накопилось достаточно много сведений, свидетельствующих о тонком и высокочувствительном реагировании изоферментных систем организма на изменения условий внешней среды. Появляется все больше данных, говорящих, что молекулярная гетерогенность ферментов и других белков (например, гемоглобина) служит своеобразным биохимическим инструментом, с помощью которого организм повышает свои гомеостатические свойства (Лукияненко и др., 1991).

Для исследований такого рода в нашей лаборатории был выбран один из лизосомальных ферментов – кислая фосфатаза. Хронические и острые токсикологические аквариальные эксперименты ставили на двухлетках заводской радужной форели.

Изучение модификаций фракционного состава кислой фосфатазы в печени форели под влиянием натриевой соли абиетиновой кислоты в хронических опытах продемонстрировало увеличение доли изоформ с большей молекулярной массой, а также заметное изменение распределения активности заряженных изоформ фермента. Сублетальное состояние рыбы в остром опыте характеризовалось незначительной долей анионных множественных форм фермента (Руоколайнен и др., 1979; 1983). Наблюдаемые сдвиги активности изоферментов в ответ на действие факторов внешней среды являются выражением регуляции клеточного обмена, механизм которой может заключаться в индукции биосинтеза отдельных изоформ или в проявлении специфических ингибиторов, или во взаимодействии этих факторов.

По нашему мнению, исследования в данном направлении могут привести к получению критерия, указывающего на изменения биохимических характеристик лизосом, вызванных наличием токсикантов в водной среде. Этот тест можно использовать для оценки физиологического состояния рыб при изменении экологической обстановки в водоеме.

Учитывая, что наиболее чувствительны к внешним воздействиям ранние стадии онтогенеза рыб, опыты по выяснению степени токсичности абиетиновой кислоты проводили с икрой радужной форели, развивающейся в средах с разной концентрацией испытуемого вещества (0,0001–10,0 мг/л). Исследования проведены совместно с сотрудниками лаборатории экологической токсикологии СевНИИРХа. В конце опыта у личинок форели определяли активность лизосомальных ферментов, а также цитоплазматических ферментов: щелочной фосфатазы и альдолазы.

При самых низких из испытанных концентраций действующего вещества (0,0001–0,001 мг/л) активность большинства изученных ферментов на 20–40% снижалась по сравнению с контролем; начиная со значений 0,01 и 0,1 мг/л происходило возрастание активности почти всех ферментов, особенно значительно β -галактозидазы, β -глюкозидазы и щелочной фосфатазы. Высокие концентрации абиетиновой кислоты (10 мг/л) угнетали активность кислой фосфатазы и альдолазы. В этих экспериментах, как и в описанных выше, была выявлена зависимость активности фермента от дозы реагента. Угнетающее действие абиетиновой кислоты на ферментные системы энергообеспечения в некоторых тканях трехгодовалых радужной форели было показано и другими исследователями (Груздев, Сидоров, 1987). Таким образом, наиболее заметные нарушения функционирования изученных ферментов у личинок радужной форели наблюдалось при концентрации аби-

етиновой кислоты 0,01–0,1 мг/л. Эти значения могут быть использованы при определении ПДК данного вещества.

Еще сложнее происходящие изменения при воздействии смеси, даже схожих по своей химической природе, веществ. Было испытано влияние *in vivo* и *in vitro* смеси смоляных кислот, которую получали из живицы сосны и ели многократной экстракцией ацетоном. Основной составляющей в этой смеси является абиетиновая кислота, наряду с которой есть и другие, в частности неоабиетиновая, дигидроабиетиновая, декстропимаровая.

При действии *in vivo* на радужную форель смесь смоляных кислот вызывала значительные изменения активности лизосомальных ферментов, которая в печени, почках и головном мозге увеличивалась, а в сердце и селезенке уменьшалась (табл. 16). В опытах *in vitro* смесь смоляных кислот в низких концентрациях (30 мг/л), как правило, несколько угнетала активность лизосомальных РНКазы, ДНКазы и фосфатазы из печени, а в высоких (3000–30000 мг/л) – активность одних ферментов увеличивала, а других – уменьшала.

Как видим, воздействие абиетиновой кислоты и смеси смоляных кислот на форель приводило к разным по знаку и величине изменениям активности лизосомальных ферментов в органах рыбы. Такое различие в реакции может быть обусловлено либо присутствием в смеси более активного соединения, чем абиетиновая кислота, либо синергическим эффектом.

Смоляные кислоты являются веществами поверхностно-активными, так как их молекулы состоят из гидрофобной кольцевой и полярной карбоксильной частей. Благодаря такому строению они могут изменять проницаемость биологических мембран. Известно, что некоторые стероидные гормоны в определенных концентрациях оказывают стабилизирующее действие на мембраны лизосом. Например, под влиянием гидрокортизона они более прочно удерживают ферменты и этим препятствуют контакту ферментов с субстратом (Касавина и др., 1972). Другие же производные тритерпенов – сапонины, вызывают лизис мембранных образований, высвобождают связанные с ними ферменты (Антонов, 1982).

Кроме того, результаты опытов со смоляными кислотами показали, что при непосредственном (*in vitro*) и опосредованном (*in vivo*) воздействии химического агента реакция лизосомального аппарата совершенно различна. Это подтверждается многочисленными экспериментами других исследователей по выяснению влияния витаминов, гормонов и различных токсикантов на лизосомы в опытах *in vivo* и *in vitro* (Покровский, Крыстев, 1977; Учитель, 1978).

Влияние смеси смоляных кислот на общую активность лизосомальных ферментов в разных органах форели (экспозиция 22 дня, Мг/л, n = 6)

Орган	Вариант	Фосфагаза	ДНКаза	РНКаза	Катепсин D
Печень	Контроль	0,89±0,050	0,02±0,001	0,15±0,012	0,11±0,004
	Опыт	1,17±0,061	0,05±0,003*	0,24±0,021*	0,20±0,016*
Сердце	Контроль	0,58±0,032	0,02±0,001	0,09±0,005	0,09±0,009
	Опыт	0,70±0,037	0,06±0,002*	0,04±0,002*	0,08±0,006
Селезенка	Контроль	0,93±0,073	0,17±0,023	0,21±0,017	0,31±0,023
	Опыт	0,52±0,020*	0,06±0,008*	0,10±0,007*	0,17±0,013*
Почки	Контроль	0,54±0,048	0,08±0,006	0,13±0,010	0,20±0,014
	Опыт	0,87±0,027*	0,19±0,018*	0,28±0,025*	0,40±0,026*
Жабры	Контроль	0,56±0,080	0,03±0,004	0,09±0,009	0,20±0,021
	Опыт	0,56±0,018	0,03±0,003	0,12±0,011	0,09±0,006*
Мышцы	Контроль	0,16±0,010	0,02±0,001	0,01±0,001	0,10±0,024
	Опыт	0,08±0,002*	0,01±0,001*	0,004±0,0*	0,05±0,001
Головной мозг	Контроль	0,43±0,029	0,06±0,002	0,01±0,001	0,03±0,003
	Опыт	0,47±0,036	0,02±0,003*	0,03±0,002*	0,13±0,005*

Примечание. * Различия между опытом и контролем достоверны при $P \leq 0,05$.

Лизосомальные ферменты разных органов неодинаково реагируют на воздействие одного и того же химического агента, во-первых, вследствие энзиматической гетерогенности лизосом из разных органов. Во-вторых, результаты наших опытов показывают, что наиболее чувствительны к воздействию смоляных кислот те ткани, которые находятся в постоянном контакте с токсином. Прежде всего, это жабры. Неоднозначно реагируют на смоляные кислоты кроветворные и осуществляющие выведение и обезвреживание токсических веществ системы – селезенка и почки.

Несомненно одно: организм рыб весьма чувствителен к смоляным кислотам, в частности к абиеиновой кислоте, и лизосомы принимают активное участие в ответной реакции организма на это воздействие.

Для обсуждаемого нами вопроса очень существенно, что характер изменений активности кислых гидролаз при воздействии химических агентов на организм, будь то смоляные кислоты или сложная смесь промстоков ЦБК, весьма напоминает кривую изменения функций при общем адаптационном синдроме Селье (1960).

Сопоставление наших данных с подробным анализом поведенческих и физиолого-биохимических особенностей (включая изменения в нейроэндокринной секреции) на каждой из стадий приспособительных реакций при интоксикациях различными химическими соединениями (в том числе и фенолом) (Лукьяненко, 1983) позволяет сделать вывод, что лизосомы участвуют в стрессовых реакциях рыб, вызванных стоками ЦБК и некоторыми, составляющими их, компонентами.

Влияние детергентов и флотореагентов на лизосомальный аппарат рыб. В связи с загрязнением водоемов различными поверхностно-активными веществами, многие из которых являются токсичными для рыб и других гидробионтов (Крылов, 1969), было предпринято исследование воздействия неионных детергентов – неололов АФ-14 и 2В-1317-12 на функционирование лизосом сига в процессе его эмбриогенеза. Материал для исследований был получен на экспериментальной базе ПИНРО. Икру сига инкубировали в воде, содержащей детергенты в концентрации 0,25, 0,5 и 1,0 мг/л.

Результаты этих экспериментов представлены в табл. 17.

Неионный детергент АФ-14 в испытанных концентрациях не оказывал очень заметного влияния на активность гидролитических ферментов лизосом. Другой неонол – 2В-12 в концентрации

Влияние неонов на общую активность лизосомальных ферментов икры сига на разных стадиях развития (на 1 мг белка)

Фермент	Стадия развития	Контроль	Детергент и его концентрация, мг/л					
			2В-1317			АФ-14		
			0,25	0,5	1,0	0,25	0,5	1,0
КФаза	ПГ	0,07	0,05	0,07	0,07	0,08	0,07	0,04
	НК	0,22	0,31	0,28	0,22	0,26	0,39	0,34
	ПЭ	0,45	0,29	0,38	0,36	0,40	0,37	0,38
	ПВ	0,42	0,42	0,40	0,27	0,38	0,30	0,36
	Л	0,52	0,49	0,53	0,56	0,60	0,51	0,58
ДНКаза	ПГ	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01
	НК	0,00	0,02	0,03	0,02	0,07	0,02	0,02
	ПЭ	0,39	0,22	0,29	0,30	0,29	0,30	0,35
	ПВ	0,33	0,34	0,36	0,23	0,33	0,24	0,32
	Л	0,37	0,36	0,38	0,43	0,38	0,35	0,40
РНКаза	ПГ	0,10	0,08	0,09	0,09	0,10	0,10	0,07
	НК	0,26	0,39	0,33	0,28	0,31	0,52	0,51
	ПЭ	0,74	0,46	0,60	0,60	0,63	0,53	0,62
	ПВ	0,63	0,64	0,63	0,47	0,51	0,46	0,57
	Л	0,33	0,78	0,83	0,88	0,92	0,61	0,88

Стадии развития: ПГ – пигментация глаз, НК – начало кровообращения, ПЭ – подвижный эмбрион, ПВ – перед выклевом, Л – личинки.

1,0 мг/л вызывал снижение удельной активности лизосомальных ферментов на некоторых стадиях эмбрионального развития сига. Особенно чувствительны к действию детергентов эмбрионы перед выклевом из икринки. Используемые в нашей работе неоновы в силу своего химического строения (содержат в составе от 12 до 14 групп оксиэтилена), как установлено другими исследователями, являются среднетоксичными веществами. Кроме того, в примененных нами концентрациях (до 1 мг/л) они не оказывали значительного влияния на выживаемость, развитие и выупление эмбрионов, личинок и сеголеток радужной форели (Лесюк и др., 1984). Более высокие концентрации неонов (1,0–3,5 мг/л) вызывали гибель развивающейся икры, торможение развития зародышей, задержку выклева личинок. Тормозящее влияние даже невысоких концентраций детергентов на активность лизосомальных ферментов в развивающейся икре сига отмечено и в наших опытах.

Одним из основных способов защиты животных от несвойственных организму веществ является их гидроксилирование, способствующее переводу в более растворимую в воде форму и выведению с мочой или желчью. При некоторых заболеваниях, а также под воздействием отдельных ксенобиотиков (фенобарбитал, ксилит и др.) в печени позвоночных многократно усиливается активность ответственных за этот процесс оксигеназ и одновременно может происходить ускорение синтеза желчных кислот и повышение их концентрации в желчном пузыре. Желчные кислоты, как известно, являются “мягкими” детергентами, осуществляющими частичную деструкцию биологических мембран и оказывающими регулирующее влияние на обменные процессы в клетке.

Показано, что детергенты изменяют проницаемость биологических мембран уже при очень низких концентрациях (Kreibich et al., 1973; Helenius, Simons, 1975). При концентрации ниже критической концентрации мицеллообразования молекулы детергентов внедряются в мембрану и изменяют ее проницаемость без нарушения целостности. При увеличении концентрации детергентов в растворе образуются смешанные мицеллы детергентов с молекулами мембранных фосфолипидов, белков, липопротеидных комплексов, что приводит в конечном счете к разрушению мембран. Большинство исследований такого направления проведено на плазматических и микросомальных мембранах, что же касается лизосомальных мембран рыб, то таких работ пока очень мало.

С целью проверки возможности участия желчных кислот в деструкции лизосомальных мембран в подобных ситуациях нами бы-

ло проведено изучение влияния различных концентраций холата и таурохолата натрия на мембраны лизосом, выделенных из печени рыб. Кроме того, сравнивали действие этих природных детергентов на лизосомальные мембраны с механизмом действия синтетического детергента тритона X-100 (Руоколайнен и др., 1985).

Инкубация лизосом с желчными кислотами приводила к заметным изменениям активности лизосомальных ферментов. Эти изменения сложным образом зависели, прежде всего, от концентрации детергента. Вначале при увеличении концентрации таурохолата и холата (примерно до 1 мМ) активность некоторых ферментов снижалась, других возрастала, а мембраносвязанной β-глюкозидазы оставалась неизменной. По мере увеличения уровня соли желчной кислоты до критической концентрации мицеллообразования (примерно 2 мМ) и выше начиналась сольubilизация части мембранных белков и липидов, происходила частичная деструкция последних, увеличивалась их проницаемость, что проявлялось в повышении свободной активности практически всех изученных ферментов у всех видов рыб (табл. 18).

Таблица 18

Влияние различных концентраций желчных кислот на выход ферментов из лизосом печени рыб (на 1 г сырого веса/мин, n = 6–8)

Вариант, концентрация, мМ	КФаза *	Глюкозидаза *	ДНКаза **	РНКаза **
Окунь				
Контроль	1,30	0,057	0,18	0,20
Холат натрия	0,1	1,47	0,077	0,23
	1,0	1,37	0,071	0,25
	5,0	1,37	0,056	0,29
	10,0	0,73	0,006	0,18
Таурохолат	0,1	1,30	0,067	0,22
	1,0	1,20	0,068	0,27
	5,0	1,30	0,081	0,42
	10,0	0,60	0,045	0,25
Судак				
Контроль	1,16	0,102	0,83	0,05
Холат натрия	0,1	1,28	0,100	0,90
	1,0	1,80	0,120	0,78
	5,0	1,18	0,072	0,72
	10,0	0,56	0,014	0,49
Таурохолат	0,1	1,21	0,100	0,71
	1,0	1,16	0,024	0,75
	5,0	1,24	0,082	0,73
	10,0	0,70	0,114	0,60
Форель				
Контроль	2,70	0,236	1,20	0,97
Таурохолат	0,1	2,85	0,226	1,15
	1,0	2,75	0,228	1,03
	5,0	2,35	0,226	1,05
	10,0	1,54	0,215	0,97

Примечание. * – В мкМ п-нитрофенола, ** – в ΔE₂₆₀.

Начиная с концентрации желчных кислот 5 мМ и выше, становилось заметным ингибирующее влияние высоких концентраций на действие лизосомальных ферментов. Для подтверждения этого момента были проведены специальные эксперименты.

С растворами желчных кислот разной концентрации инкубировали ферментный экстракт, полученный с использованием детергента тритона X-100 и методом замораживания-оттаивания с последующей длительной гомогенизацией печени рыб. В этих опытах наблюдалось ингибирующее влияние желчных кислот на

активность лизосомальных ферментов, начиная с концентрации 3–5 мМ (Руоколайнен и др., 1985).

О влиянии желчных кислот на активность молекул ферментов сообщается и другими исследователями. Так, было показано, что небольшие количества этих веществ активируют липазу, а высокие концентрации – ингибируют ее (Bensonana, Densnuella, 1968). Желчные кислоты ингибируют трипсин и холинэстеразу (Мосолов и др., 1967; Gallo-Togres et al., 1969).

Сложность картины, полученной при воздействии солей желчных кислот на лизосомы может быть объяснена также и влиянием сезонных особенностей в реагировании мембран лизосом на детергенты. В наших исследованиях и по данным литературы (Фролов, 1986) была отмечена зависимость активности ферментов лизосом и проницаемости лизосомальных мембран от сезона года. Количество лизосом достигает наибольшей величины в зимне-весенний период, наименьшей – летом, при этом проницаемость лизосомальных мембран, а, следовательно, и повреждаемость их под влиянием различных факторов зимой и весной также наибольшая, летом, как правило, мембраны лизосом более стабильны. Видимо, этим можно объяснить, что зимой меньшие концентрации желчных кислот вызывают выход ферментов из лизосом в печени судака (табл. 18), тогда как летом под воздействием тех же концентраций наблюдается более низкая активность лизосомальных ферментов.

Исследование жирнокислотного состава лизосомальных мембран, подвергшихся воздействию желчных кислот и тритона X-100, показало наличие определенных различий в действии этих детергентов (Высоцкая, Рипатти, 1988). Под воздействием небольших концентраций желчных кислот в первую очередь из мембран сольбилизируются насыщенные и моноеновые жирные кислоты, а также неидентифицированные нами минорные компоненты, не обнаруживаемые в мембранах, но составляющие основную долю сольбилизованных липидов. По мере возрастания концентрации желчной кислоты происходит сольбилизация и полиненасыщенных жирных кислот, но их относительное содержание в растворе остается значительно ниже, чем в лизосомах. При высоких концентрациях мембрана разрушается, однако осаждаемые фрагменты сохраняют жирнокислотный состав, близкий к исходным мембранам. Сравнивая данные по изменению жирнокислотного состава мембран и выходу ферментов из лизосом, можно заключить, что прочно связанный с мембраной фермент – β-глюкозидаза взаимодействует преимущественно с липидами, имеющими высокую степень ненасыщенности. Отметим, что последнее обстоя-

тельство имеет очень большое значение для проявления активности ферментов, особенно у рыб, относящихся к пойкилотермным животным, у которых полиненасыщенные кислоты (и прежде всего докозагексаеновая) выступают в роли температурного стабилизатора липидной матрицы мембранных ферментов (Рипатти и др., 1985; Шульман, Юнева, 1990).

Под воздействием неионного детергента тритона X-100 в концентрации 0,1% мембрана, видимо, сразу разрушается на отдельные фрагменты, так как жирнокислотный состав мембран цельных лизосом и подвергшихся воздействию тритона X-100 весьма сходен. Исходя из того, что при этом в раствор переходит много неидентифицированных компонентов, можно предположить, что разрушение мембран происходит в местах их локализации.

Таким образом, показано, что желчные кислоты селективно солюбилизируют мембранные липиды, содержащие главным образом полиненасыщенные жирные кислоты. Нарушение целостности мембран сопровождается повышенным высвобождением лизосомальных ферментов. Оба эффекта выражены тем сильнее, чем выше доза детергента.

Исследование устойчивости гидробионтов к различным компонентам сточных вод необходимо как для выявления адаптивных возможностей организма к этим веществам, так и для установления предельно допустимых концентраций химических агентов в среде обитания водных животных. Особый интерес представляет изучение реакции ферментной системы лизосом на токсические вещества на первых этапах развития организма. Хорошо известны многообразные функции лизосом (участие в оплодотворении, внутриклеточное переваривание, частичный протеолиз, регуляция синтеза РНК и белка и др.), определяющие их важную роль на ранних этапах онтогенеза рыб.

Нами было изучено влияние *метилизобутилкарбинола* (МИБК), применяющегося в качестве *флоторагента*, на активность некоторых ферментов лизосом и протеолитической системы клетки в процессе развития икры нарвской кумжи и ладожской форели (Высоцкая и др., 2001). Материал для исследований получали на экспериментальной базе СевНИИРХа. В процессе развития рыб на определенных стадиях (от 32 до 150 суток) икра и личинки подвергались воздействию МИБК (концентрация 5 мг/л). Пробы для биохимического анализа брали после гибели 50% особей из оставшихся в живых.

Исследования показали, что МИБК токсичен для развивающейся икры лососевых. Воздействие этого вещества вызывает изменения в уровне активности лизосомальных (табл. 19 и 20) и

протеолитических ферментов в процессе эмбрионального развития рыб. Наиболее чувствительны к МИБК зародыши рыб на ранних этапах эмбриогенеза и перед выклевом личинок: у нарвской кумжи – органогенеза, пигментации глаз и зародыш перед выклевом; у ладожской форели – на стадии функционирования системы кровообращения, закладки первой пары жаберных дуг и образования “пигментной шапочки”. Как правило, МИБК провоцирует активизацию лизосомальных ферментов на более ранних этапах эмбриогенеза, чем это наблюдается в контроле. Кроме того, абсолютные значения “пиков” активности ферментов в опыте часто гораздо выше, чем в контроле.

Такие изменения оказывают отрицательное влияние на функцию лизосом в ходе эмбриогенеза. Как уже отмечалось, лизосомальные ферменты играют важную роль в процессах, сопровождающих оплодотворение и последующее развитие животных (Браше, 1961; Покровский, Тутельян, 1976; Holtzman, 1976).

В процессе эмбрионального развития гидролитические ферменты осуществляют расщепление внутриклеточных запасных веществ, поставляя тем самым необходимые продукты для биосинтеза новых компонентов и энергетических нужд развивающегося организма. На каждом из этапов эмбриогенеза зародыш нуждается в определенных пластических и энергетических материалах. Все это запрограммировано и четко регулируется сложнейшими биохимическими механизмами. Метилизобутилкарбинол, вызывая более раннюю, чем в контроле, активизацию работы ряда гидролитических ферментов в развивающейся икре лососевых нарушает работу этого слаженного механизма и ведет, в конечном счете, к гибели эмбрионов. Под воздействием МИБК в концентрации 5 мг/л развитие на всех этапах останавливается, зародыш деформируется.

Влияние некоторых других органических и неорганических веществ на ферментные системы рыб в раннем онтогенезе. Совместно с сотрудниками Петрозаводского госуниверситета проводили эксперименты по влиянию различных концентраций неорганических и органических веществ на физиолого-биохимические показатели в процессе развития радужной форели (Иванова и др., 1990, 1991). Интерес к этим веществам вызван тем, что они широко применяются в самых разных производствах и часто встречаются в сточных водах предприятий. Так, *хлориды первичных вторалкиламинов* (ГИПХ-3) и *N,N'-диметилмочевина* используются в производстве красителей, лекарственных средств, высокомолекулярных соединений и гербицидов; *сульфит на-*

Таблица 19
Активность лизосомальных ферментов в развивающейся икре ладожской форели при воздействии МИБК (5 мг/л)

Стадия развития*	Фосфатаза		β-глюкозидаза		ДНКаза		РНКаза	
	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт
1. Функционирование системы кровообращения	0,50	2,82	0,48	0,31	2,28	2,93	1,51	2,63
2. Пигментация глаз	3,27	0,84	0,68	0,40	3,37	2,09	2,51	1,24
3. Дифференцировка непарных плавников	1,21	1,52	0,47	0,81	3,02	3,00	2,13	1,98
4. Закладка I пары жаберных дуг	0,48	4,28	0,22	1,49	2,23	7,39	1,30	6,13
5. Скопление мезенхимы в области брюшных плавников	1,62	1,05	1,64	0,36	4,29	2,96	2,41	1,98
6. Закладка II пары жаберных дуг	0,39	0,43	0,21	0,38	2,88	2,66	2,30	2,16
7. Образование "пигментной шапочки"	1,99	3,14	1,18	4,19	5,85	8,44	2,75	4,63
8. Зародыш перед выклевом	2,13	1,70	0,73	1,05	6,58	6,54	1,88	1,79

* - По Л.П. Рыжкову (1976).

Таблица 20
Активность лизосомальных ферментов в развивающейся икре нарвской кумжи при интоксикации МИБК (5 мг/л)

Стадия развития	Фосфатаза		β-глюкозидаза		ДНКаза		РНКаза	
	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт
1. Органогенез	0,29	3,98	0,71	0,96	2,64	3,75	1,64	3,15
2. Дифференцировка хвостовой почки	2,46	1,43	0,80	1,25	2,98	2,23	2,66	1,90
3. Функционирование системы кровообращения	0,81	1,41	0,54	1,52	2,19	4,87	1,98	3,11
4. Пигментация глаз	0,59	2,06	0,23	1,00	1,99	6,08	1,69	7,20
5. Дифференцировка непарных плавников	1,53	1,22	1,00	0,40	6,41	4,16	3,13	2,64
6. Закладка I пары жаберных дуг	0,77	0,99	0,10	0,32	4,41	2,27	3,29	1,56
7. Скопление мезенхимы в области брюшных плавников	2,03	3,01	1,28	1,84	2,03	6,77	1,52	4,09
8. Закладка II пары жаберных дуг	1,80	1,91	1,07	1,18	8,09	7,69	2,05	5,44
9. Зародыш перед выклевом	1,51	2,27	0,68	1,63	5,54	6,02	2,45	3,99

Влияние фосфорнокислого натрия (Na_3PO_4) на свободную активность лизосомальных ферментов личинок радужной форели (на 1 мг белка)

Вариант, концентрация, мг/л	Кфаза	Глюкозидаза	ДНКаза	РНКаза	
	в мкМ п-нитрофенола		в ΔE_{260}		
Контроль	0,16	0,003	0,13	0,12	
Na_3PO_4	0,1	0,21	0,003	0,14	0,06
	0,5	0,27	0,008	0,16	0,09
	1,0	0,06	0,011	0,16	0,11
	5,0	0,14	0,002	0,12	0,06
	10,0	0,35	0,013	0,14	0,08
	50,0	0,19	0,006	0,13	0,07

трия (Na_2SO_3) находит применение в фотографии, химико-фармацевтической промышленности, при производстве искусственного волокна; *фосфат натрия* (Na_3PO_4) применяется как составляющая моющих и водоумягчающих средств, при синтезе органических продуктов, в текстильной, кожевенной, пищевой промышленности, при обогащении руд. Кроме того, интересно было сравнить воздействие на ферментные системы клетки химических веществ, различающихся по степени токсичности для гидробионтов.

В качестве тест-объекта была взята икра радужной форели Крошнозерского рыбозавода на стадии дробления бластодиска. Икру по 50 штук помещали в опытные среды и выдерживали в них при регулярной смене растворов в течение 40–46 суток. Температурные условия для икры поддерживались в диапазоне 7–12°, для выклюнувшихся личинок 12–16 °С. Использовали следующие концентрации веществ: $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ – от 0,1 до 50 мг/л; Na_2SO_3 – от 0,1 до 100 мг/л; диметилмочевина – от 1,0 до 1000 мг/л и ГИПХ-3 – от 0,001 до 0,5 мг/л. Опыты завершали в момент перехода личинок на смешанное питание. Учитывали выживаемость, динамику выклева эмбрионов, линейно-весовые показатели. В конце хронического эксперимента определяли дыхание манометрическим методом в аппарате Варбурга и активность лизосомальных (кислая фосфатаза, β -глюкозидаза, ДНКаза, РНКаза) и цитозольных (альдолаза, щелочная фосфатаза) ферментов.

Результаты показали, что выживаемость личинок радужной форели в опытах с Na_3PO_4 оставалась на уровне контрольной при концентрациях действующего агента 0,1–50 мг/л. Массовая гибель личинок наблюдалась при концентрации ортофосфата 100 мг/л. В других вариантах опыта происходило снижение поглощения кислорода в период массового выклева личинок. Активность ферментов изменялась по-разному. Отмечено некоторое снижение активности большинства лизосомальных ферментов по сравнению с контролем. Активность же альдолазы резко повышалась под влиянием этого вещества. Фосфат натрия оказывал сильное лабилизирующее влияние на лизосомальную мембрану. Об этом можно судить по значительному повышению свободной активности кислой фосфатазы и β -глюкозидазы (табл. 21). Особенно заметное влияние на мембрану оказывал ортофосфат в концентрациях 0,5 и 10,0 мг/л.

Следует отметить, что корреляция между активностью альдолазы и дыханием четко проявлялась при концентрации 0,1–0,5 мг/л ортофосфата натрия, а затем дыхание с увеличением

дозы токсиканта постепенно снижалось, в то время как активность альдолазы сохранялась на высоком уровне. Таким образом, можно заключить, что данное вещество значительно стимулирует гликолиз у подопытных личинок форели.

Большинство ферментов слабо реагировало на увеличивающуюся концентрацию другого вещества – сернистокислого натрия. Исключение составляла β -глюкозидаза, которая при воздействии сульфита натрия более чем в два раза повышала активность при концентрации действующего вещества 1,0 и 50,0 мг/л, а при концентрациях 0,1 и 10,0 мг/л резко снижалась. Солубилизирующего влияния Na_2SO_3 на мембраны не отмечено (табл. 22). Наблюдалась даже некоторая их стабилизация. Изменение активности альдолазы не превышало 30% от контроля.

Характер изменения активности ферментов под воздействием органических веществ несколько отличается от такового под влиянием неорганических солей, что согласуется с данными других исследователей, отмечающих различия в реакциях гидробионтов на химические агенты органического и неорганического ряда (Лукияненко, 1983). В наших опытах диметилмочевина в небольших концентрациях (1,0–10,0 мг/л) не оказывала влияния на большинство ферментов. При концентрации 100 и 500 мг/л это вещество вызывало повышение активности всех лизосомальных ферментов и щелочной фосфатазы. В самой высокой из испытанных концентраций (1000 мг/л) диметилмочевина оказывала ингибирующее влияние на все изученные ферменты, кроме альдолазы. С возрастанием концентрации токсиканта в среде развития снижался уровень газообмена личинок. Свободная актив-

Таблица 22

Влияние сернистокислового натрия (Na_2SO_3) на свободную активность лизосомальных ферментов личинок радужной форели (на 1 мг белка)

Вариант, концентрация, мг/л	КФаза	Глюкозидаза	ДНКаза	РНКаза
	в мкМ п-нитрофенола		в ΔE_{260}	
Контроль	0,39	0,010	0,30	0,23
Na_2SO_3 0,1	0,32	0,001	0,26	0,22
0,5	0,34	0,003	0,26	0,22
1,0	0,37	0,008	0,22	0,20
5,0	0,39	0,004	0,26	0,21
10,0	0,34	0,004	0,19	0,20
50,0	0,33	0,010	0,22	0,18
100,0	0,38	0,003	0,19	0,21

ность лизосомальных ферментов с повышением в среде концентрации диметилмочевины неуклонно снижалась и уже при концентрации действующего вещества 10 мг/л была ниже, чем в контроле, практически во всех вариантах опыта (табл. 23).

Препарат ГИПХ-3 воздействует на активность ферментов похожим образом. При концентрации ГИПХа 0,05 и 0,1 мг/л повышалась активность лизосомальных ферментов. Активность альдолазы во всех вариантах опыта была ниже, чем в контроле, но наибольшее снижение активности этого фермента отмечено при концентрации 0,05 мг/л. С возрастанием количества токсиканта в среде дыхание личинок угнеталось, и составляло 40–50% от контроля при высоких дозах действующего вещества.

Судя по изменению свободной активности лизосомальных ферментов, ГИПХ-3 оказывает стабилизирующее влияние на мембраны лизосом (табл. 24).

Результаты этой серии экспериментов позволяют заключить, что наиболее существенное влияние на метаболизм развивающейся радужной форели, активность изученных ферментных систем и состояние мембранных структур клетки из указанной группы веществ оказывает фосфорнокислый натрий. Таким образом, разные по химической природе агенты оказывают разное по силе влияние на активность ферментных систем. Изученные органические вещества вызывают менее глубокие изменения в обмене веществ рыб. Следует также отметить, что, определяя действие токсиканта только по выживаемости, получают неполную информацию о состоянии подопытных организмов. Комплексные физиолого-биохимические исследования, включающие

Таблица 23

Влияние диметилмочевины на свободную активность лизосомальных ферментов личинок радужной форели (на 1 мг белка)

Вариант, концентрация, мг/л	КФаза	Глюкозидаза	ДНКаза	РНКаза
	в мкМ п-нитрофенола		в ΔE_{260}	
Контроль	0,36	0,011	0,25	0,17
Диметилмочевина 1,0	0,40	0,019	0,26	0,16
10,0	0,33	0,014	0,24	0,18
100,0	0,35	0,0	0,22	0,16
500,0	0,34	0,002	0,26	0,20
1000,0	0,32	0,0	0,21	0,17

Таблица 24

Влияние ГИПХ-3 на свободную активность лизосомальных ферментов личинок радужной форели (на 1 мг белка)

Вариант, концентрация, мг/л	КФаза	Глюкозидаза	ДНКаза	РНКаза
	в мкМ п-нитрофенола		в ΔE_{260}	
Контроль	0,41	0,006	0,23	0,19
ГИПХ-3 0,001	0,37	0,005	0,19	0,17
0,005	0,35	0,001	0,17	0,19
0,010	0,34	0,001	0,19	0,18
0,050	0,43	0,0	0,22	0,15
0,100	0,43	0,014	0,22	0,18
0,500	0,29	0,006	0,16	0,12

ряд показателей, в том числе изучение реакции на токсиканты ферментных систем с различной компартиментализацией в клетке, позволяют раскрыть тонкие механизмы воздействия токсиканта на клеточном и субклеточном уровне.

Воздействие металлов на активность лизосомальных ферментов. Среди многообразия загрязняющих веществ, поступающих в результате антропогенной деятельности в водоемы, одной из наиболее опасных для гидробионтов групп являются соли тяжелых металлов, детали действия которых на отдельные стороны метаболизма рыб и беспозвоночных остаются мало изученными (Брагинский, Щербань, 1978; Щербань, 1979; Андрушайтис, Бойкова, 1982; Карпович, 1987; Гапеева, Цельмович,

1991; Коновец и др., 1994; Шулькин, Чернова, 1994; Дмитриева и др., 2002; Beckman, Zaugg, 1988; Fekhaoui et al., 1986; Gautman, 1989; Radhabrishnaiah, 1988; Sayer et al., 1989). Некоторые из них обладают канцерогенными и мутагенными свойствами (Ильницкий и др., 1993; Линник и др., 1994). Токсичность тяжелых металлов зависит не только от их общего содержания в воде, но и в еще большей степени от соотношения их гидратированных ионов и связанных в комплексы с растворенными органическими веществами или адсорбированными на взвешенных частицах (Линник, Набиванец, 1986; Luoma, 1983; Salomons, Forstner, 1984). Особо эти факторы следует учитывать при исследовании влияния повышенных доз металлов на водную флору и фауну на Европейском Севере, где в водоемах содержится большое количество гуминовых кислот, в частности фульвокислот, образующих с металлами растворимые комплексные соединения, легко усвояемые гидробионтами (Зимаков, Комарова, 1991). Кроме того, в последние десятилетия происходит интенсивная acidификация водоемов многих стран Европы, Северной и Южной Америки. Основная причина возрастания кислотности в водоемах – низкий показатель pH атмосферных осадков, а также сброс в водоемы большого количества отходов горнодобывающей промышленности. Подкисление воды атмосферными осадками и в результате заболачивания водоемов, сочетающееся с низким содержанием в ней кальция и магния пагубным образом сказывается на развитии рыб в таких водоемах. Особенно чувствительны к присутствию даже небольших доз металлов в этих условиях рыбы в раннем онтогенезе. Это проявляется в большом количестве уродливых эмбрионов и личинок, их повышенной смертности (Билько, 1994). Нарушение ультраструктуры хлоридных клеток жабр, снижение концентрации ионов натрия в плазме крови у молоди семги *Salmo salar* наблюдали под влиянием токсических концентраций Al^{3+} (0,1 и 0,25 мг/л) на фоне закисления и низкой минерализации воды В.Е. Матей и В.Т. Комов (1992).

У молоди лосося-тайменя (*Salmo trutta* L.) при перенесении из мягкой воды в подкисленную, содержащую 12 мкМ Al в форме $AlCl_3$, отмечалось повышение величины гематокрита, снижение натрия в плазме крови, а также уровня катионов натрия и калия в целом организме (Sayer et al., 1991). По мнению авторов, указанные изменения являлись следствием перераспределения жидкости между вне- и внутриклеточным пространством. Около половины рыб плохо адаптировались к новой среде и были близки к гибели.

Показано, что многие соединения тяжелых металлов даже в очень малых концентрациях оказывают вредное действие на обитателей водоемов. Большинство гидробионтов проявляют большую чувствительность к токсикантам, чем теплокровные животные и, как подчеркивают многие исследователи, способны накапливать токсические вещества в организме. И.Е. Зимаковым и А.В. Комаровой (1991) выявлено, что в различных органах карпа за сравнительно короткий срок (75 сут) могут накапливаться количества ртути в десятки и сотни раз превышающие фоновый уровень. У рыб от вредного воздействия металлов страдают прежде всего почки, печень, затем жабры, кишечник, мышцы. По данным китайских исследователей (Dai et al., 1991) в тканях карпа тяжелые элементы накапливались в возрастающих концентрациях следующим образом: жабры–скелет–мышцы. При изучении распределения, накопления и выведения кадмия в тканях черноморских мидий установлено, что содержание этого элемента уменьшалось в ряду: пищеварительная железа–жабры–гонады–мантия–аддуктор (Кулебакина, Пивоварова, 1988). Накопление металла сопровождалось возрастанием в тканях фосфора и серы, что позволило авторам высказать предположение о детоксикации кадмия путем связывания его серосодержащими белками. Кроме того, в этой работе отмечается участие в экскреции токсиканта лизосомоподобными везикулами.

При действии кислых значений pH на личинок рыб в их органах и тканях отмечаются многочисленные изменения субклеточных структур (изменение объема митохондрий, дегенерацию их крист, увеличение саркоплазматического ретикулула), свидетельствующие об ацидозе мышечной ткани, приводящем к снижению жизнеспособности развивающегося организма (Билько, 1994).

Приведенные факты говорят о необходимости учитывать повышенную чувствительность гидробионтов к токсикантам, и в частности к тяжелым металлам, в условиях acidификации и низкой минерализации воды в северных регионах нашей страны. Даже небольшое повышение концентрации тяжелых металлов в воде, происходящее в результате сбросов промышленных и сельскохозяйственных стоков в водоемы чревато серьезными негативными последствиями.

Весьма распространенным и токсичным компонентом антропогенного загрязнения водоемов является кадмий. Действие его на гидробионтов довольно хорошо изучено. Кадмий вызывает замедление темпов роста, анемию, нарушение процессов газообмена, ионной и осмотической регуляции у рыб. Исследование ульт-

раструктуры хлоридных, респираторных и слизистых клеток жаберного эпителия мозамбикской тиляпии (*Oreochromis mossambicus* Peters) при длительном воздействии на них кадмия выявило сильную токсичность этого металла для рыб (Матей, 1993). Наиболее чувствительными к токсиканту оказались хлоридные клетки жаберного эпителия. Электронно-микроскопические исследования позволили выявить многочисленные нарушения в структуре клеток под действием кадмия. Количество этих клеток в условиях опыта снижалось наполовину. Наблюдались дегенеративные клетки с набухшими митохондриями. Отмечено накопление в этих клетках большого числа лизосом, представленных первичными, вторичными лизосомами и аутофагосомами. В лизосомах встречались электронно-плотные включения и клеточные органоиды на разных стадиях деградации. В респираторных клетках жаберного эпителия отмечена такая же реакция на кадмий, но она была менее выраженной. В слизистых клетках подобных изменений под воздействием металла не происходило. После замены токсического раствора на чистую проточную воду ультраструктурная картина в хлоридных клетках изменялась: лизосомы исчезали. На основании наблюдавшейся активации лизосомальной системы в эпителиальных клетках жабр под влиянием токсиканта автор делает вывод о том, что кадмий проникает в жабры путем эндоцитоза, накапливается в лизосомах и затем с их помощью элиминирует из эпителия. Нарушения ультраструктуры клеток жаберного эпителия, вызванные кадмием, ухудшали условия обмена ионов и газов. Репарация жаберного эпителия после воздействия токсиканта происходила медленно и полного восстановления его не наступало. Об аналогичной реакции на кадмий сообщается в работе Дж. Хемельрада с соавторами (Hemelraad et al., 1990), исследовавших ультраструктурные изменения в почках *Anodonta cygnea*. В проксимальной части почек моллюсков, содержащихся в воде с концентрацией кадмия 50 мкг/л, обнаружено уменьшение числа и набухание митохондрий, активация лизосомального аппарата и резкое сокращение запасов гликогена, то есть кадмиевая интоксикация вызывает адаптивный всплеск активности лизосомальных ферментов и изменения в функционировании органелл, участвующих в энергетическом обмене почечных клеток.

Под влиянием сублетальных концентраций кадмия (0,5 и 1,25 мг/л) происходят количественные изменения в лизосомальной системе пищеварительных клеток литторины: наблюдается слияние и образование более крупных лизосом (Marigómez et al., 1989). При экспонировании моллюсков *Anodonta anatina* в среде с

CdCl_2 и Cd-ЭДТА выявлен фазовый характер в процессах накопления и выведения кадмия тканями. Интересно отметить, что элиминация кадмия сопровождалась снижением веса органов, богатых гликогеном (Holwerda et al., 1988). Предполагается, что процесс выведения металла был связан с затратами энергии.

Определение содержания кортизола и глюкозы в плазме крови мозамбикской тиляпии *Oreochromis mossambicus*, жившей в среде с концентрацией кадмия 10 мкг/л, на разных сроках экспозиции показало, что реакция рыбы на этот токсикант представляет собой типичный экологический стресс (Pratap, Wendelaar Bonga, 1990). На основании возвращения показателей к норме через 35 дней эксперимента авторы приходят к выводу о возможности тиляпии адаптироваться к низким концентрациям кадмия в среде обитания.

Как видно из изложенного выше, в реакции гидробионтов на присутствие в воде кадмия немаловажную роль играют лизосомы. Это позволило включить их в системы индикации, применяющиеся для оценки уровня загрязнения кадмием среды и влияния его на живые организмы (Marigómez et al., 1990).

В литературе имеются данные о влиянии на некоторые стороны метаболизма живых организмов и других тяжелых металлов. Так, в работе украинских исследователей И.Н. Коновца и др. (1994) подчеркивается существенная роль катаболизма и трансформации азотистых соединений в ответ на действие повышенных концентраций свинца. Проблема является весьма актуальной для региона в связи с накоплением этого, представляющего серьезную угрозу для ихтиофауны металла, в донных отложениях водохранилищ Днепра в результате ликвидации аварии на Чернобыльской АЭС. Показано, что Рb сдвигает азотистый обмен карпов в сторону активации процессов катаболизма, включения адаптивных систем, обеспечивающих выведение его конечных продуктов. В жабрах это происходит благодаря работе глутаминовой системы, а в почках и кишечнике – аланиновой. Токсическое действие свинца усиливается при повышенных и пониженных температурах. Отмечено подавление активности рибонуклеаз в семенниках белых крыс под влиянием свинца (Голубович, Орлеанская, 1975). Также ингибирующее влияние на активность гидролитических ферментов (РНказы, кислой фосфатазы, фитазы, инвертазы, α -амилазы крахмала и кислой протеазы) в прорастающих семенах гороха оказывает хром в форме бихромата калия (Dua, Sawhney, 1991). Под влиянием хлорида кобальта в условиях развивающегося окислительного стресса в субклеточных фракциях печени и в сыворотке крови крыс выявлены изме-

нения липидного и липопротеидного состава (Калиман и др., 1997).

Как правило, воздействие металла на ту или иную реакцию в организме зависит от присутствия в среде других элементов. Это взаимодействие элементов в метаболизме может осуществляться через их реакцию с металлотионеинами, сродство которых к Cu, Zn и Cd, например, различно. Отмечено, что введение Fe повышает всасывание Zn, Pb и Cd в кишечнике, а повышение содержания Mo является причиной недостаточности Cu. Нехватка Se вызывает снижение активности деиодиназы (Brenner, 1991). Установлено, что степень обеспеченности организма цинком существенно влияет на течение хронической кадмиевой интоксикации (болезнь "итай-итай"): тяжесть отравления усугубляется при дефиците цинка в рационе, в то время как включение в рацион оптимальных или немного повышенных доз цинка предотвращает поражение печени, почек и семенников, вызванное кадмием (Волкова и др., 1994).

Известно, что для поддержания оптимальной интенсивности и направленности метаболических процессов живой организм нуждается в определенном количестве названных выше микроэлементов, так как многие из них входят в состав ферментов. Заметим, что основным депонирующим органом для микроэлементов у животных, в том числе и рыб, является печень (Евтушенко, 1994). Дефицит цинка сказывается на росте, развитии организма, воспроизводительной функции и кроветворении (Мецлер, 1980). Важная роль отводится цинку в процессах, связанных с передачей и экспрессией генетической информации. Показано его участие в структуре многих макромолекул, в том числе ферментов, что и определяет его биологическую роль.

Отрицательно сказывается на метаболизме животных как недостаток, так и избыток указанных металлов. Так, высокие дозы цинка снижают жизнеспособность рыб и их резистентность (Алабастр, Ллойд, 1984).

Нами проведено изучение влияния растворов сернокислого цинка, хлористого и азотнокислого свинца и смеси солей сернокислого цинка и хлористого свинца на функционирование лизосомальной и некоторых других, связанных с ней, ферментных систем радужной форели в процессе раннего онтогенеза. Показано, что все изученные соли (концентрации от 0,01 до 5,0 мг/л) токсичны для икры радужной форели. Совместное применение ионов свинца и цинка оказывает более токсичное действие, чем отдельное использование солей этих металлов. Это показывают как результаты по определению активности ферментов, так и

Изменение активности кислой фосфатазы под влиянием солей свинца и цинка у радужной форели в раннем онтогенезе (в мкМ п-нитрофенола на 1 мг белка при 30 °С)

Вариант, концентрация вещества, мг/л	Стадия развития				
	гастрология	органогенез	пигментация глаз	начало выклева	личинки
Контроль	3,67	0,26	0,44	0,80	0,97
ZnSO ₄ 0,01	3,43	–	0,60	0,79	0,71
0,05	3,19	–	0,51	0,86	0,55
0,1	4,24	–	0,73	0,84	0,83
0,5	6,54	–	0,54	0,71	0,57
1,0	4,96	1,83	0,74	0,94	–
5,0	6,23	0,98	–	–	–
PbCl ₂ 0,1	2,80	–	0,78	0,59	0,56
0,5	3,59	–	0,84	0,50	0,89
1,0	4,32	1,39	1,27	1,12	0,72
5,0	2,95	0,74	0,87	–	–
Pb(NO ₃) ₂ 0,1	2,68	–	1,14	0,35	0,66
0,5	1,67	–	0,79	0,46	0,72
1,0	1,68	0,63	0,34	0,68	0,66
5,0	1,37	0,97	0,50	1,24	0,65
PbCl ₂ + ZnSO ₄ 0,1	1,33	–	0,84	0,65	0,70
0,5	2,36	–	0,56	0,43	0,73
1,0	1,64	0,56	–	–	–
5,0	1,65	0,73	–	–	–

данные по выживаемости эмбрионов и личинок. Соли свинца в некоторых концентрациях стимулируют развитие икры, в то время как цинк немного тормозит его.

Об аналогичном действии свинца и цинка на процессы жизнедеятельности водных организмов сообщается и в работах Г.П. Андрушайтиса и Э.Е. Бойковой (1982).

На ранних стадиях эмбриогенеза радужной форели цинк вызывает повышение активности кислой фосфатазы, ДНКазы и β-глюкозидазы, на более поздних – перед выклевом личинок – угнетение большинства лизосомальных ферментов (табл. 25–28). Также реагирует на этот ион и щелочная фосфатаза (табл. 29) – гидролитический фермент, являющийся маркером цитоплазматической мембраны, который наряду с лизосомальной кислой фосфатазой регулирует содержание фосфора в клетке и имеет отношение ко многим фундаментальным процессам в организме

Таблица 26

Изменение активности β -глюкозидазы под влиянием солей свинца и цинка у радужной форели в раннем онтогенезе (в мкМ п-нитрофенола на 1 мг белка при 30 °С)

Вариант, концентрация вещества, мг/л	Стадия развития				
	гастрология	органогенез	пигментация глаз	начало выклева	личинки
Контроль	1,11	0,25	0,08	0,13	0,09
ZnSO ₄	0,01	1,61	–	0,26	0,15
	0,05	1,85	–	0,16	0,04
	0,1	1,80	–	0,20	0,09
	0,5	4,14	–	0,19	0,13
	1,0	2,38	0,41	0,25	0,08
	5,0	4,41	0,24	–	–
PbCl ₂	0,1	1,63	–	0,57	0,04
	0,5	2,55	–	0,33	0,05
	1,0	2,43	0,35	0,70	0,08
	5,0	1,22	0,22	0,36	–
Pb(NO ₃) ₂	0,1	2,10	–	0,22	0,20
	0,5	2,19	–	0,17	0,03
	1,0	3,00	0,19	0,10	0,05
	5,0	2,52	0,30	0,20	0,10
PbCl ₂ + ZnSO ₄	0,1	1,69	–	0,46	0,03
	0,5	2,23	–	0,31	0,06
	1,0	1,30	0,05	–	–
	5,0	3,36	0,27	–	–

(Романенко и др., 1982; Рисник, Гусев, 1987; Пехливанов и др., 1989; Суханова, Раушенбах, 1995). Интересно отметить, что в молекуле щелочной фосфатазы содержится цинк.

У личинок радужной форели под влиянием солей цинка наблюдались более низкие показатели активности изученных ферментов, чем в контроле, особенно заметно это при высоких дозах токсикантов. Ингибирующее действие цинка на активность лизосомальных ферментов было показано нами у эмбрионов поздних стадий развития и личинок сига (Высоцкая и др., 1984; Немова и др., 1984).

Поскольку тяжелые металлы оказывают на рыб стрессирующее воздействие, а в ответной реакции организма одним из существенных моментов является состояние углеводного обмена (Панин, 1983; Браун, Моженко, 1987), и, кроме того, для функционирования самих лизосомальных ферментов необходима энергия,

Таблица 27

Изменение активности кислой ДНКазы под влиянием солей свинца и цинка у радужной форели в раннем онтогенезе (в ΔE_{260} на 1 мг белка)

Вариант, концентрация вещества, мг/л	Стадия развития				
	гастрология	органогенез	пигментация глаз	начало выклева	личинки
Контроль	0,73	0,20	0,28	0,67	0,68
ZnSO ₄	0,01	0,87	–	1,25	0,75
	0,05	2,35	–	0,84	1,23
	0,1	1,95	–	1,28	0,96
	0,5	2,34	–	0,59	0,48
	1,0	2,57	1,08	1,76	0,36
	5,0	1,09	1,20	–	–
PbCl ₂	0,1	0,89	–	1,99	1,16
	0,5	0,79	–	0,96	0,35
	1,0	1,16	1,58	1,29	0,85
	5,0	1,49	0,62	1,13	–
Pb(NO ₃) ₂	0,1	1,47	–	2,06	0,26
	0,5	0,76	–	0,89	0,55
	1,0	1,39	1,98	0,41	0,33
	5,0	1,94	0,94	0,36	0,64
PbCl ₂ + ZnSO ₄	0,1	3,30	–	0,88	1,50
	0,5	5,60	–	0,69	0,79
	1,0	1,23	0,73	–	–
	5,0	1,41	1,20	–	–

параллельно мы исследовали также активность одного из ключевых ферментов гликолиза – альдолазы. В описываемом эксперименте было показано, что при воздействии разных концентраций сернокислого цинка гликолиз активизируется на всех стадиях развития радужной форели, кроме органогенеза (табл. 30).

Характер действия ионов свинца на изученные ферменты подобен влиянию цинка, то есть на стадиях гастрологии, органогенеза и пигментации глаз активируются кислая и щелочная фосфатазы, ДНКазы и β -глюкозидаза. На поздних эмбриональных стадиях и у личинок активность этих ферментов ниже, чем в контроле.

В опытах на развивающейся икре сига *Coregonus lavaretus* было изучено влияние различных концентраций сульфата цинка на активность катепсинов D и B (Немова, Сидоров, 1990). Результаты этих экспериментов показали, что активность кислых протеиназ заметно изменялась под влиянием соли цинка в концентрации 0,1%, в то время как при 0,01% этот показатель отличался от

Изменение активности кислой РНКазы под влиянием солей свинца и цинка у радужной форели в раннем онтогенезе (в ΔE_{260} на 1 мг белка)

Вариант, концентрация вещества, мг/л	Стадия развития				
	гаструла	органо-генез	пигментация глаз	начало выклева	личинки
Контроль	1,00	0,28	0,22	1,17	0,55
ZnSO ₄ 0,01	3,41	—	0,73	0,59	0,33
0,05	0,17	—	1,46	0,49	1,80
0,1	2,92	—	1,22	0,45	0,56
0,5	3,51	—	0,34	0,78	0,49
1,0	0,21	0,41	0,98	0,70	—
5,0	2,84	0,65	—	—	—
PbCl ₂ 0,1	0,84	—	2,87	0,77	0,47
0,5	0,03	—	3,32	1,30	0,82
1,0	0,26	0,25	0,48	1,13	0,70
5,0	2,73	0,12	0,23	—	—
Pb(NO ₃) ₂ 0,1	0,47	—	0,85	0,38	0,62
0,5	0,23	—	3,63	0,61	0,70
1,0	1,99	0,0	0,22	0,81	0,69
5,0	4,27	0,38	0,32	0,56	0,40
PbCl ₂ + ZnSO ₄ 0,1	0,07	—	0,35	1,07	0,81
0,5	0,24	—	0,37	0,50	0,88
1,0	2,76	0,34	—	—	—
5,0	1,22	1,13	—	—	—

нормы незначительно. И эти опыты подтвердили, что наиболее чувствительными к токсиканту являются стадии раннего дробления, бластулы, гастрюляции, пигментации глаз, т.е. ранние этапы развития, когда формируются зародышевые листки и закладываются органы. Это период, характеризующийся бурными морфогенетическими процессами, сопровождающийся интенсивным метаболизмом (Токин, 1977).

Известно, что катионы оказывают более сильное влияние на рыб, чем анионы (Никольский, 1963). Однако природа аниона, входящего в состав соли, имеет также большое значение в проявлении степени токсичности вещества, что показано и в наших опытах. Так, ингибирующий эффект иона свинца в сочетании с нитрат-ионом был выражен ярче, чем при воздействии хлорида свинца.

Изменение активности щелочной фосфатазы под влиянием солей свинца и цинка у радужной форели в раннем онтогенезе (в мкМ п-нитрофенола на 1 мг белка)

Вариант, концентрация вещества, мг/л	Стадия развития				
	гаструла	органо-генез	пигментация глаз	начало выклева	личинки
Контроль	2,27	0,35	0,36	1,57	0,16
ZnSO ₄ 0,01	3,11	—	0,22	1,08	0,10
0,05	3,15	—	0,55	2,98	0,12
0,1	0,67	—	0,18	0,03	0,22
0,5	3,91	—	0,50	0,15	0,11
1,0	4,56	0,35	0,60	0,30	—
5,0	4,75	1,32	—	—	—
PbCl ₂ 0,1	2,27	—	1,65	0,34	0,20
0,5	3,41	—	0,85	0,21	0,21
1,0	3,45	0,44	1,56	0,31	0,17
5,0	2,35	1,15	0,68	—	—
Pb(NO ₃) ₂ 0,1	2,91	—	1,48	0,05	0,16
0,5	4,01	—	0,15	0,26	0,20
1,0	5,02	0,87	0,06	0,19	0,10
5,0	3,97	0,84	0,40	0,09	0,18
ZnSO ₄ + PbCl ₂ 0,1	3,20	—	0,10	0,33	0,16
0,5	3,68	—	0,41	0,42	0,27
1,0	2,17	0,42	—	—	—
5,0	4,66	1,52	—	—	—

Та же закономерность была обнаружена и при изучении состояния циклазных систем у радужной форели в данном эксперименте (Высоцкая, Михкиева, 1990). Активность аденилатциклазы под влиянием цинка и свинца заметно повышалась к середине опыта, одновременно уровень фосфодиэстеразы циклического аденозинмонофосфата снижался, в результате к этому моменту резко повышалось содержание цАМФ, являющегося важнейшим внутриклеточным посредником в ответной реакции клетки на внешние и внутренние воздействия. Значительное возрастание активности гуанилатциклазы в начальный период эксперимента отмечалось при комбинированном действии тяжелых металлов.

Адаптация к наличию в среде солей свинца способствует более интенсивному обмену углеводов, о чем свидетельствует более высокий уровень альдолазы, а также лизосомальной гликозидазы- β -глюкозидазы.

Изменение активности альдолазы под влиянием солей свинца и цинка у радужной форели в раннем онтогенезе (в ΔE_{535} на 1 г сырого веса)

Вариант, концентрация вещества, мг/л	Стадия развития				
	гаструла	органо-генез	пигментация глаз	начало выклева	личинки
Контроль	0,74	2,24	0,97	0,63	1,47
ZnSO ₄	0,01	1,92	2,99	0,84	1,34
	0,05	1,52	–	0,89	2,61
	0,1	1,57	–	1,03	2,02
	0,5	1,43	–	1,50	2,34
	1,0	1,09	1,30	1,36	–
	5,0	1,44	1,63	–	–
PbCl ₂	0,1	1,39	–	1,13	1,78
	0,5	1,67	–	1,12	2,32
	1,0	1,47	1,67	1,91	2,19
	5,0	1,52	1,05	1,08	–
Pb(NO ₃) ₂	0,1	1,60	–	1,15	2,58
	0,5	1,62	–	2,58	2,02
	1,0	2,22	1,45	1,06	2,88
	5,0	2,27	1,45	1,98	0,83
ZnSO ₄ + PbCl ₂	0,1	1,92	–	0,92	2,30
	0,5	2,27	–	0,70	2,26
	1,0	2,10	7,16	–	–
	5,0	2,17	2,32	–	–

Таким образом, под воздействием солей тяжелых металлов в развивающейся икре радужной форели происходят адаптивные изменения активности лизосомальной, циклазной и других ферментных систем, осуществляющих важнейшие функции по защите организма от неблагоприятных факторов среды, в обеспечении его необходимыми структурными и энергетическими материалами, в регуляции метаболизма. Изменение активности ферментов имело стадийноспецифический характер: для ранних стадий эмбриогенеза характерно ее повышение, а для поздних и личинок – угнетение. Адаптация к наличию в среде указанных токсикантов способствует более интенсивному обмену углеводов, о чем свидетельствует высокий уровень β -глюкозидазы и альдолазы.

Сравнительное изучение влияния таких важных микроэлементов как цинк, кобальт и никель на лизосомальный аппарат

развивающейся икры семги показал, что небольшие дозы (0,005 мг/л) сернокислых солей этих металлов способствуют стабилизации лизосомальных мембран практически на всех стадиях эмбриона (от гастролы до однодневной личинки). Этим можно объяснить снижение активности лизосомальных ферментов при более высоких концентрациях цинка в среде развития рыб (Высоцкая, 1989). Так как цинк является одним из важнейших микроэлементов для живых организмов, входит в состав ряда ферментов и влияет на рост, развитие, воспроизводительную функцию, кроветворение (Карменский, 1980), неудивительно, что присутствие даже небольших доз этого металла в воде сказывается на функционировании ферментных систем, в том числе лизосомальной. Ион цинка обнаруживает тенденцию к образованию прочных связей внутри металлоферментов, влияет на каталитическую функцию ряда ферментов, участвующих в обмене нуклеиновых кислот, белков, углеводов (Медлер, 1980). Отмеченная в наших опытах чувствительность фосфатазы, нуклеаз, β -глюкозидазы к повышенной концентрации в среде данного металла подтверждает его важную роль в осуществлении ферментативных реакций.

Ингибирующее влияние кобальта на активность лизосомальных ферментов икры семги выражено еще больше. Особенно чувствительны к этому элементу личинки. Тонкое реагирование ферментов лизосом на этот металл, объясняется тем, что это такой же жизненно важный элемент, как железо и медь, вместе с которыми он входит в азотсодержащие структуры – гем и витамин В₁₂. При недостаточности кобальта развивается один из видов анемии. Он входит в состав ферментов, осуществляющих перенос водорода, метильных групп, карбоксила. Все эти многообразные функции металла особенно существенны на ранних стадиях развития, когда в организме происходит закладка и формирование всех ферментных систем, отлаживается их функционирование.

Активность кислой фосфатазы под воздействием никеля в обеих из испытанных концентраций снижалась на всех стадиях развития семги, кроме стадии пигментации глаз. Возможно, именно на этой стадии организм нуждается в повышенных количествах фосфора, возрастают его энергетические траты, так как одной из предполагаемых функций фосфатаз является регуляция фосфора в клетке.

Существенно отличался от контрольного уровень активности β -глюкозидазы при действии никеля. В концентрации 0,005 мг/л он снижал ее на всех стадиях эмбриогенеза, а при концентрации

0,01 мг/л резко снижал активность на стадиях гаструлы и значительно повышал перед выклевом личинок. Эта стадия и личиночная очень чувствительны к воздействиям внешней среды, что неоднократно подчеркивалось выше.

Никель необходим животным, он входит в состав фермента уреазы, как цинк и кобальт, обладает способностью образовывать комплексы с белками и другими биополимерами, чем определяется его биохимическое значение. Никель считается мало токсичным элементом, так как в живых организмах существуют специфические механизмы, регулирующие его концентрацию. Однако в последнее время появились работы, сообщающие о случаях острого никелевого отравления (Alcon et al., 1991). При введении различных доз хлористого никеля крысам наблюдалось увеличение содержания глюкозы в крови, резко возрастало содержание меди и цинка в плазме крови, печени и почках, наблюдалась экскреция железа с мочой. Указанные нарушения в гомеостазе металлов и глюкозы в крови под действием никеля существенно отличались у самок и самцов. У самцов показатели довольно быстро возвращались к норме, тогда как у самок они сохранялись на максимальном уровне длительное время. В монографии А.П. Ильницкого с соавторами (1993) никель и его соединения отнесены к группе химических веществ, которые, несомненно, канцерогенны для человека. Все сказанное выше, а также имеющиеся данные о влиянии никеля на функционирование других мембранных структур (Мецлер, 1980) позволяют говорить о его токсичности для живых организмов в избыточных количествах.

Очень важным в жизни животных элементом является медь. Ионы этого металла входят в состав активных центров ферментов, осуществляющих окислительно-восстановительные реакции, таких как цитохромоксидаза, аминоксидаза, уратоксидаза и др. Одно- и двухвалентные ионы меди входят в состав молекулы церулоплазмينا – главного медьсодержащего белка крови, регулирующего содержание меди в организме. Вместе с цинком, марганцем и железом медь входит в состав супероксиддисмутаз – группы белков, катализирующих реакции окисления и восстановления с перекисными радикалами. В регуляции содержания меди и других металлов в тканях животных участвуют особые цитоплазматические белки – металлотионеины.

Однако, несмотря на наличие механизмов, регулирующих содержание элемента в организме, медь очень часто является причиной отравления животных. Для пресноводных рыб медь является одним из самых сильных токсикантов (Карпович, 1987; Гапеева, Цельмович, 1991; Radhabrishnaiah, 1988). В органах пресно-

водной рыбы *Zabeo rohita* (Hamilton) при летальной концентрации меди (1,2 мг/л) накопление идет по убывающей в ряду жабры > мозг > мышцы > печень; при сублетальной (0,24 мг/л) – жабры > печень > мышцы > мозг. Повышенное содержание меди в жабрах автор (Radhabrishnaiah, 1988) объясняет нарушением проницаемости клеточной поверхности. В опытах на радужной форели показано, что наибольшее количество этого металла аккумулируется в жабрах, несколько меньшее – в печени. При высокой жесткости воды часть меди осаждается в виде карбоната, что сказывается на степени ее токсичности для рыб (Fekhaoui et al., 1986). О влиянии концентрации кальция и рН воды на токсичность меди, свинца и цинка для личинок кумжи сообщается в работе Sayer M.D.J. с соавторами (1989). В хронических экспериментах на азиатском змееголове *Channa functatus* (Bl.) продемонстрировано, что накопление металла в жабрах, печени и почках рыб, выживших при сублетальных концентрациях (27, 53 и 104 мкг/л), возрастает при увеличении концентрации меди и времени экспозиции (Gautam, 1989).

Изучение механизмов накопления меди было проведено на рыбе *Morone americana* (Burton, Frazier, 1989), в печени которой с помощью электронного микроскопа были обнаружены гепатоциты с гигантскими лизосомами, повышенным числом аутофагических вакуолей, очагами распада цитоплазмы. В части лизосом наблюдались липидные включения. Содержание меди в печени этих рыб составляло 1195–4880 мкг/г сырой массы.

Высокочувствительными к загрязнению водных бассейнов и эффективными накопителями тяжелых металлов, в частности меди и кадмия, являются пресноводные моллюски. А.О. Шпаков и К.В. Деркач (1994) исследовали влияние катионов меди и кадмия на аденилатциклазную систему и фермент 5'-нуклеотидазу гепатопанкреаса и кишки пресноводных двустворчатых (*Anodonta cygnea*) и брюхоногих (*Coretus corneus*) моллюсков. Аденилатциклазная система реализует действие катехоламинов и других гормонов в тканях, а связанная с плазматической мембраной 5'-нуклеотидаза дает представление о функциональном состоянии клетки и, следовательно, эти биохимические показатели могут быть использованы для оценки повреждающего действия различных факторов, в том числе и тяжелых металлов. *In vivo* и *in vitro* выявлены ингибирующие эффекты меди и кадмия на активность аденилатциклазы моллюсков. Исходя из известного положения о взаимодействии иона Cu^{2+} с SH-группами белков, авторы предполагают, что в результате такой блокировки нарушается третичная структура белков аденилатциклазного комплекса и,

как следствие, снижается его полноценная активность, понижается реактивность гормончувствительной системы к катехоламинам. Показано также ингибирующее влияние этих катионов и на активность 5'-нуклеотидазы при хроническом воздействии на ткани моллюсков.

Воздействие меди и сульфат-иона на активность лизосомальных ферментов было изучено нами на икре радужной форели, которую закладывали в опыт на III этапе гастрюляции (стадия краевого узелка). Продолжительность опыта составляла 98 суток (Высоцкая и др., 1993). В качестве источника меди использовали растворы сернокислой меди (концентрации 0,01 и 0,05 мг/л в пересчете на ион металла), а сульфат-иона – сернокислый натрий (концентрации 25, 100, 250 и 500 мг/л в пересчете на SO_4^{2-}). Испытывались всевозможные варианты смесей этих ионов. Влияние ионов меди, сульфата и их смесей на лизосомальные ферменты развивающейся икры радужной форели характеризовалось сложной зависимостью как от концентрации действующего агента, так и стадии развития эмбриона. Наибольший эффект наблюдался на стадии эмбриона перед выклевом личинок. В небольших концентрациях медь оказывала стимулирующее влияние на кислые гидролазы, особенно заметно это сказывалось на кислой фосфатазе и β -глюкозидазе. Более высокие концентрации меди ингибировали изученные ферменты.

На личинках онежской палии в течение 25 суток испытывалось влияние молибдена, сульфатов, хлоридов и их смесей. Использовали реагенты: натрий молибденовокислый (концентрации 0,1, 1,0 и 10 мг/л в пересчете на Mo^{6+}), натрий сернокислый (концентрации 25, 100, 250 и 500 мг/л SO_4^{2-}) и натрий хлористый (концентрации 20, 90, 210 и 440 мг/л Cl^-). Результаты этого опыта показали, что молибден в испытанных концентрациях менее токсичен для рыб на ранних этапах развития, чем медь. Несколько отличается влияние этого металла и на активность лизосомальных ферментов: если β -глюкозидаза, РНКазы и ДНКазы изменялись как и у личинок радужной форели под влиянием меди, то кислая фосфатаза во всех вариантах опыта с Mo и сопутствующими анионами возрастала в несколько раз (Высоцкая и др., 1993). Эти выводы подтверждают и данные по выживаемости и динамике развития. При повышении концентрации меди в среде развития радужной форели значительно увеличивался отход икры и личинок, отмечались изменения морфологических показателей, тогда как молибден таких эффектов у личинок онежской палии не вызывал.

Таким образом, изучение влияния солей тяжелых металлов на активность лизосомальных ферментов в эмбриогенезе рыб показало, что цинк, кобальт, никель, медь оказывают существенное воздействие на лизосомальный аппарат развивающейся икры. Реакция зависела от концентрации металла и стадии развития. Низкие концентрации, как правило, стимулируют активность большинства кислых гидролаз, а высокие ингибируют. Ионы цинка, кобальта и никеля оказывают стабилизирующее влияние на мембраны лизосом. Наиболее чувствительны к воздействию тяжелых металлов у лососевых рыб стадии гастрюлы и личиночная. Результаты экспериментов показали также, что на токсичности ионов тяжелых металлов может сказываться как присутствие в среде повышенного количества других металлов, так и анионов. Например, токсичность свинца усиливается в сочетании с нитрат-ионом, то же самое, видимо, можно сказать в отношении меди и сульфат-иона.

Как правило, когда говорят о токсичности ионов металлов, прежде всего, имеют в виду тяжелые металлы, что, безусловно, справедливо. Однако иногда встречаются ситуации, когда минеральное загрязнение обусловлено повышенной концентрацией легких металлов. Так, техногенная вода Костомукшского горно-обогатительного комбината (ГОК), расположенного на северо-западе Карелии, отличается высоким содержанием лития (до 50 мкг/л) и калия (до 140 мг/л), что значительно превышает ПДК (Кухарев и др., 1998; Лозовик, 1998). Загрязнение отходами ГОКа пресных слабоминерализованных водоемов системы реки Кенти существенно сказалось на состоянии биоты (Калинкина и др., 2003; Рябинкин, 2003). Учитывая сказанное, при комплексном изучении влияния стоков этого горнорудного предприятия нами были проведены специальные исследования по влиянию различных солей калия на рыб в процессе эмбриогенеза.

Известно, что калий является основным внутриклеточным катионом у большинства живых существ, тогда как во внеклеточных жидкостях преобладает натрий. Большинство аэробных клеток поддерживает относительно высокую и постоянную внутриклеточную концентрацию калия: от 200 мМ у *E. coli* и 150 мМ в мышцах млекопитающих до 30 мМ у двусторчатых моллюсков и некоторых простейших (Мецлер, 1980). Катионы натрия и калия выполняют важнейшую функцию во многих проявлениях жизнедеятельности организма, обеспечивая осмотический и электрохимический потенциал клетки, участвуя в регуляции водного обмена. Относительно высокие внутриклеточные концентрации калия необходимы для процессов синтеза белка рибосома-

ми, калий входит в состав нескольких десятков ферментов, играющих ключевую роль во многих метаболических реакциях (Мелехов, Анев, 1992).

Поддержание постоянного ионного состава в клетке осуществляется с помощью активного переноса ионов K^+ в клетку и откачивания из нее ионов Na^+ . При этом используется энергия АТФ. К настоящему времени показано, что основным инструментом осмотической регуляции жидкостей в организме и поддержания необходимого ионного состава внутри и вне клетки является встроенный в клеточную мембрану фермент Na^+ , K^+ -АТФаза, ингибируемая уабаином (Horisberger et al., 1991). Функционированию этого фермента в норме и при различных патологиях посвящено достаточно большое число публикаций (Болдырев, 1977, 1992; Борисов и др., 1994; Hochachka et al., 1991; Cornelius, Skou, 1991; Kenyon et al., 1991).

Вопросы, касающиеся обмена воды и электролитов у высших позвоночных животных, изучены достаточно глубоко (Физиология водно-солевого обмена и почки, 1993), меньше исследованы проблемы, касающиеся метаболизма калия и натрия у пресноводных рыб, их паразитов и других гидробионтов (Наточин и др., 1991, 1994; Романенко, 1994; Pagliarani et al., 1991; Morgan et al., 1994).

В отличие от высших позвоночных у рыб активное участие в регуляции обмена калия отводится жаберному аппарату. Как сообщается в обзорной работе В.Д. Романенко (1994), основное количество этого элемента поступает в организм пресноводных рыб с пищей, выведение же может осуществляться не только почками, но и экстраренальным путем – с помощью пищеварительной системы и железистого аппарата жабр. Интенсивность выведения калия жабрами находится в зависимости от направленности обменных процессов в организме. Например, зимой жаберная экскреция калия заметно снижается.

Несмотря на наличие у животных эффективно работающих систем регуляции баланса калия известны случаи нарушения гомеостаза этого элемента. Такое возможно при ацидозе и алкалозе внеклеточной жидкости, повышении рН вне клетки, воздействии разнообразных стрессирующих факторов. Существенное влияние на баланс калия в клетке оказывают гормоны: инсулин, минералокортикоиды (альдостерон), катехоламины. Было показано, что калиевая нагрузка повышала экскрецию с мочой простагландинов (Rathaus et al., 1992), специфически ингибировала действие Na^+ , K^+ - и Mg^{2+} -АТФазы (Cornelius, Skou, 1991; Truong et al., 1992).

Эффективность действия системы регуляции баланса калия и экскреторных органов у молодых организмов значительно меньше, чем у взрослых. При изучении адаптивных перестроек жаберного эпителия молоди горбуши к морской воде в ультраструктуре хлоридных клеток жабр были отмечены картины разных стадий физиологической гибели клеток. Выявлено наличие в них лизосом, аутофагических вакуолей, признаки некроза, выражающиеся в клеточной вакуолизации, частичном разрыве мембран и пикнозе ядра (Максимович, Серков, 1994). Аналогичные изменения наблюдались в клетках жаберного эпителия других рыб при интоксикации их тяжелыми металлами (Матей, 1993).

Изучение влияния различных солей калия на рыб проводили на радужной форели. Икру закладывали в опыт на стадии крупной морулы, завершали эксперимент в момент выклева личинок. Использовали соли KNO_3 , K_2SO_4 , KCl , K_2CO_3 , $KHCO_3$ в концентрациях 10, 50, 100, 500 и 1000 мг/л. Пробы для биохимического анализа брали на 12-е, 26-е, 46-е и 62-е сутки опыта. Определяли активность лизосомальных ферментов (кислой фосфатазы, β -глюкозидазы, РНКазы, ДНКазы), щелочной фосфатазы и альдолазы. Как и в других экспериментах по влиянию различных химических веществ на развивающуюся икру рыб была выявлена наибольшая чувствительность к солям калия у эмбрионов первых стадий развития и у личинок. На стадии гастрюлы наблюдалось снижение активности всех изученных ферментов под влиянием KNO_3 , K_2SO_4 и K_2CO_3 . Под воздействием же KCl направленность изменения активности ферментов на этой стадии развития была прямо противоположной: активность кислой фосфатазы, β -глюкозидазы, РНКазы, щелочной фосфатазы и альдолазы повышалась по сравнению с контролем. Бикарбонат калия вызывал разнонаправленные изменения активности как лизосомальных, так и других ферментов в течение всего эмбриогенеза. Наиболее значительные отклонения от контрольных величин и в этом варианте опыта наблюдались на стадии гастрюлы.

У личинок уровень кислой фосфатазы и β -глюкозидазы был повышен в вариантах с повышенным содержанием почти всех испытанных калийных солей. РНКазы же имела более низкую активность на этой стадии в опытных вариантах. Щелочная фосфатаза активировалась под влиянием KNO_3 и K_2CO_3 , но снижалась при воздействии K_2SO_4 . Активность альдолазы зависела от дозы действующего вещества, при малых концентрациях повышалась, затем по мере повышения концентрации действующего вещества снижалась и при больших дозах в вариантах с KNO_3 , KCl и K_2CO_3 опускалась ниже контрольного уровня.

Выявленная картина изменения активности изученных ферментов свидетельствует о том, что повышенные концентрации калийных солей в среде обитания создают неблагоприятную обстановку для развивающейся икры форели. Метаболизм эмбрионов в этих условиях осуществляется в состоянии напряжения, а в качестве стрессирующего фактора выступают соли калия. Выше мы отмечали чрезвычайно большое значение иона калия для нормального функционирования клетки. Недостаток или избыток этого элемента вызывает аномалии в протекании физиолого-биохимических процессов. В частности, под влиянием стрессов у рыб наблюдается нарушение калиевого гомеостаза, приводящее в итоге к их гибели (Запруднова, 1989; Sayer et al., 1991). Различные по природе стресс-факторы усиливают выход K^+ из органов и тканей рыб и способствуют увеличению этого иона в плазме крови (Мартемьянов, Запруднова, 1982; Мартемьянов и др., 1987; Мартемьянов, 2002).

Согласно гипотезе Е.И. Мелехова и В.Н. Анева (1992), в ответ на неблагоприятные воздействия, в том числе и аномально высокие концентрации ионов калия в окружающей среде, открываются калиевые каналы растительной клетки. Поскольку калий участвует практически во всех стадиях синтеза белка и нуклеиновых кислот, снижение его концентрации в цитозоле в результате вытекания по калиевым каналам приводит к переключению метаболизма с активного функционирования на торможение процессов биосинтеза. Это защитное торможение метаболизма направлено на снижение скоростей реакций, обуславливающих развитие повреждения, и тем самым обеспечивает состояние повышенной резистентности клетки к стрессовым воздействиям, вероятность выживания организма в неблагоприятных условиях.

Нарушения в синтезе белка и нуклеиновых кислот при обеднении клеток калием показаны и на многих типах клеток животных. При этом установлено, что разбалансировка соотношений катионов натрия и калия приводит к активации одних генных локусов и репрессии других, то есть наряду с торможением синтеза белка и мРНК, изменяется природа синтезируемых белков. Повидимому, обсуждаемые механизмы могут объяснить обнаруженное нами понижение уровня лизосомальных нуклеаз и других ферментов у эмбрионов радужной форели в некоторых вариантах опыта.

Как следует из данных других исследователей и наших, приведенных выше, одной из ранних неспецифических реакций на действие токсикантов являются изменения в функционировании лизосомального аппарата клетки. В зависимости от природы то-

ксиканта и времени его воздействия наблюдается активизация или угнетение лизосомальных гидролаз. Интересно отметить, что однотипно с лизосомальной кислой фосфатазой реагирует на присутствие калийных солей в среде развития форели щелочная фосфатаза – гидролитический фермент, являющийся маркером цитоплазматической мембраны и участвующий в регуляции многих обменных процессов в организме. Как показал эксперимент, интенсивный гидролиз фосфорных соединений, являющийся характерным признаком неспецифического адаптационного синдрома, происходил под влиянием калийных солей у личинок радужной форели.

В условиях негативного воздействия солей калия на разных стадиях развития организма включаются различные компенсаторные механизмы поддержания биоэнергетики тканей. В целом, на первых стадиях эмбриогенеза, когда основные запасы энергетических материалов икры еще не израсходованы, не наблюдается заметной активации ферментов, участвующих в альтернативном энергообеспечении развивающегося организма. Лишь на стадии личинки в опыте возрастает роль фосфатаз, лизосомальных гликозидаз и альдолазы. Включение адаптивных механизмов метаболизма свидетельствует о наличии экстремальной ситуации, так как известно и это мы уже неоднократно подчеркивали, что воздействие на рыб неблагоприятных условий приводит к преобладанию в их тканях гликолитических процессов.

Тот факт, что под влиянием одних калийных солей (нитраты, карбонаты и сульфаты) происходит угнетение активности лизосомальных ферментов, а под влиянием других (хлориды) на одной стадии развития икры их активизация, позволяет заключить, что действующим началом являлись не только катионы калия, но также и анионы использованных солей: нитрат-, сульфат-, хлорид-, карбонат- и бикарбонат-ионы. Возможно, выявленная реакция со стороны изученных ферментных систем есть результат совместного воздействия ионов металла и анионов.

Нитраты, как и другие азотные соединения, усиливают токсичность. Ранее мы уже отмечали усиливающее влияние нитрат-иона на эффект, вызываемый тяжелыми металлами.

Проблема повышенного содержания соединений азота (нитратов, нитритов, ионов аммония) в воде и продуктах питания является общепризнанной (Велдре, Карлова, 1991; Ильницкий и др., 1993; Коваленко, Клоченко, 1994; Sando et al., 1979).

Здесь, наверное, уместно заметить, что нитраты являются естественным компонентом биосферы и до последних лет, пока в результате антропогенной деятельности не был нарушен баланс

азота, эти соединения не представляли собой угрозы для живых существ. В организме нитраты претерпевают превращения в нитриты и далее в нитрозамины. Вредное действие нитратов и нитритов на человека и животных объясняется их способностью переводить оксигемоглобин в метгемоглобин, а также нарушением функций ряда ферментных систем. Кроме того, нитрозосоединения обладают канцерогенной и мутагенной активностью. При повышенных концентрациях соединений азота развивается гипоксия органов и тканей, нарушается иммунный статус организма, деятельность эндокринной и центральной нервной систем, наблюдаются многочисленные отклонения в обмене веществ. Установлено, что нитраты воды в 1,5 раза токсичнее нитратов, содержащихся в овощах (Ильницкий и др., 1993).

В экспериментах на икре радужной форели нами было показано, что даже небольшие концентрации соединений азота, близкие к содержанию этих ионов в поверхностных водах (NO_2^- от 0,02 до 5,0; NO_3^- от 2,5 до 250; NO_4^- от 0,025 до 3,0 мг/л), оказывали определенное воздействие на метаболизм развивающегося организма (Высоцкая и др., 1992). В этих опытах, как и в рассматриваемом здесь по влиянию нитрата калия, отмечено более раннее развитие икры по сравнению с контролем. Ускоренное развитие под влиянием токсикантов описано и другими исследователями.

Предположение о том, что анионы, входящие в состав использованных солей калия, могли оказать влияние на метаболические реакции эмбрионов радужной форели основываются на том, что большинство из них играют важнейшую роль в создании внутри- и внеклеточной осмоляльности. Так, хлориды и бикарбонаты являются преобладающими анионами внеклеточной жидкостной среды, а внутри клетки наряду с ионами калия и магния в высокой концентрации содержатся сульфаты и фосфаты (Физиология водно-солевого обмена и почки, 1993). О высоком стимулирующем эффекте ионов сульфата и хлорида на активность лизосомальных ферментов у радужной форели и онежской палии мы уже говорили выше. Имеются исследования, показывающие, что бикарбонат может выступать в качестве катализатора активности ряда ферментов, а также является субстратом для многих ключевых метаболических реакций (Иващенко, 1982).

Таким образом, выявленные изменения в активности ферментов, а также ускоренное развитие в варианте с нитратом калия и наблюдавшиеся токсикологами под воздействием карбоната калия патологические изменения морфологии являются ско-

рее всего результатом совместного влияния повышенных концентраций катионов калия и сопутствующих анионов на развивающуюся икру рыбы. Наиболее чувствительны к наличию в воде испытанных ионов ранние эмбрионы и личинки радужной форели – очень требовательного к качеству воды вида.

Очень интересные данные получены в совместных с ИБВВ РАН (п. Борок) исследованиях биохимических эффектов накопления ртути в рыбах, но это отдельный большой вопрос, которому мы планируем посвятить следующую монографию.

Влияние металлоидов на активность лизосомальных ферментов. Учитывая взаимовлияние элементов, а также их необходимость для реакций метаболизма мы изучали влияние на лизосомальную ферментную систему не только тяжелых металлов, но и других элементов, таких, например, как селен и теллур. Это металлоиды из группы серы, подгруппы селена. Повышенное содержание селена в почвах может привести к частичному замещению им серы в белковых молекулах растений, в результате развиваются болезни, как у самих растений, так и у поедающих их животных: у скота выпадает шерсть, размягчаются копыта. Присутствие селена в воде представляет опасность в связи с его возможной биоаккумуляцией через пищевую цепь и возникновением в дальнейшем репродуктивных нарушений у рыб и водных птиц (Lemly, 1995). При приеме внутрь селен действует как мышьяк. После отравления соединениями селена появляется очень неприятный запах от всего тела и выдыхаемого воздуха. При попадании на кожу его соединения вызывают сыпь и воспаления. Интересно, что очень маленькие дозы селенитов (~3 мкг на 100 г пищи) предотвращают заболевания некротического характера. Соединения теллура значительно менее ядовиты. При лечении селеновых и теллурических отравлений рекомендуется принимать в больших количествах аскорбиновую кислоту (Некрасов, 1969). Биологическая роль селена определяется его участием в активном центре селенэнзимов, в частности глутатиопероксидазы. Селен необходим в детоксикации перекисей, биотрансформации и иммунном ответе организма (Néve, 1991).

Учитывая важную роль этих элементов в обменных реакциях и в то же время чрезвычайно высокую их токсичность, мы изучали влияние различных концентраций селенита натрия и теллуриата калия на лизосомальные ферменты личинок лосося и годовиков радужной форели. На активность лизосомальных ферментов селен и теллур в составе испытанных солей заметного влия-

Таблица 31

Влияние селена и теллура на активность лизосомальных ферментов у личинок лосося (на 1 г сырого веса)

Вариант, концентрация, мг/л	КФаза	Глюкозидаза	ДНКаза	РНКаза	
	в мкМ п-нитрофенола		в ΔЕ ₂₆₀		
Контроль	0,92	0,032	0,98	0,71	
Te	0,0004	0,93	0,040	1,08	0,90
	0,002	1,20	0,042	1,22	1,07
	0,05	1,02	0,040	1,03	0,97
	0,625	1,04	0,042	1,07	0,98
	6,25	1,06	0,036	0,98	0,87
31,25	0,83	0,031	0,83	0,68	
Se	0,00004	1,16	0,040	1,17	0,99
	0,0002	0,82	0,027	0,82	0,73
	0,025	1,58	0,052	1,70	1,38
	0,125	1,10	0,031	0,98	0,88

ния не оказывали. Теллур только при концентрации 31, 25 мг/л несколько угнетал активность кислой фосфатазы и ДНКазы у личинок лосося (табл. 31). Селен в концентрации 0,025 мг/л повышал уровень фосфатазы и нуклеаз.

Такая же картина наблюдалась и при анализе мышц и печени годовиков радужной форели, живших в течение 7 суток в воде с различными концентрациями селенита и теллуриата (табл. 32). Небольшое повышение как свободной, так и общей активности кислой фосфатазы отмечалось (при высокой концентрации селена) в мышцах и печени и нуклеаз в печени рыб.

Соли селена и теллура не оказывали заметного влияния и на уровень протеолитической активности в мышцах годовиков радужной форели. В печени же активность кислых протеиназ под воздействием вышеуказанных солей изменялась значительно. Происходило снижение активности катепсина D в 6 раз под влиянием теллуриата и в 2 раза – селенита. По нашим данным, активность лизосомальной протеиназы в печени форели изменялась при концентрации селена, даже более низкой, чем принятая для рыбохозяйственных ПДК (0,0016 мг/л). Влияние теллура выявлялось при концентрации более высокой, чем принятые ПДК (0,0028 мг/л) (Немова, 1992; 1996).

Таким образом, показано, что Se и Te оказывают гораздо меньшее воздействие на активность лизосомальных ферментов,

Таблица 32

Влияние селена и теллура на активность лизосомальных ферментов в мышцах (свободную и общую) и печени (общую) у годовиков радужной форели (на 1 мг белка)

Вариант, концентрация, мг/л	Мышцы						
	КФаза		Глюкозидаза		ДНКаза		
	своб.	общая	своб.	общая	своб.	общая	
Контроль	0,40	0,30	0,0	0,006	0,13	0,41	
Se	0,0005	0,30	0,30	0,0	0,003	0,13	0,34
	0,005	0,36	0,33	0,0	0,002	0,13	0,38
	0,05	0,38	0,32	0,0	0,004	0,13	0,38
	0,5	0,45	0,32	0,0	0,0	0,12	0,44
Te	0,01	0,46	0,31	0,0	0,0	0,11	0,39
	0,1	0,53	0,40	0,0	0,0	0,10	0,49
	1,0	0,53	0,36	0,0	0,0	0,11	0,41
	10,0	0,58	0,41	0,0	0,0	0,13	0,42

Вариант, концентрация, мг/л	Мышцы		Печень				
	РНКаза		КФаза	Глюкозидаза	ДНКаза	РНКаза	
	своб.	общая					
Контроль	0,18	0,36	0,85	0,013	0,17	0,19	
Se	0,0005	0,11	0,32	0,71	0,013	0,16	0,20
	0,005	0,13	0,38	0,76	0,017	0,31	0,23
	0,05	0,15	0,35	0,72	–	0,19	–
	0,5	0,12	0,39	0,97	0,017	0,23	0,30
Te	0,01	0,15	0,33	0,95	0,013	0,27	0,32
	0,1	0,18	0,45	0,94	0,016	0,18	0,40
	1,0	0,15	0,42	1,30	0,014	0,33	0,48
	10,0	0,19	0,46	0,99	–	0,29	–

чем, например, тяжелые металлы и ортофосфат или соединения азота. О влиянии нитратов и нитритов речь шла выше, здесь мы приведем еще результаты изучения реакции ферментных систем лизосом в разных органах карпов на присутствие в среде обитания различных концентраций углекислого аммония.

Влияние солей аммония на активность лизосомальных ферментов. Изменения, вызываемые аммонием, зависели как от спе-

Влияние углекислого аммония на активность лизосомальных ферментов в разных органах карпов (на 1 г сырого веса)

Орган	Вариант, мг/л	КФаза	Глюкозидаза	ДНКаза	РНКаза
		в мкМ п-нитрофенола		в ΔE_{260}	
Печень	Контроль	8,67	0,078	1,94	3,01
	15	9,34	0,110	2,28	2,90
	50	8,39	0,047	1,95	3,01
Мышцы	Контроль	0,51	0,025	0,41	0,72
	15	1,28	0,0	0,43	0,60
	50	0,87	0,018	0,47	0,97
Жабры	Контроль	3,65	0,068	2,89	2,87
	15	3,13	0,047	2,62	2,26
	50	3,31	0,064	2,13	2,67
Почки	Контроль	5,19	0,095	4,66	3,16
	15	9,39	0,195	2,43	3,10
	50	8,26	0,092	4,33	3,66
Головной мозг	Контроль	1,28	0,076	5,08	1,05
	15	1,93	0,131	5,00	0,95
	50	1,77	0,063	5,06	1,36

цифики функций каждого органа, так и от концентрации действующего химического агента. Наблюдалось заметное, более чем в 2 раза, повышение активности кислой фосфатазы в мышцах, почках и головном мозге. Активность β -глюкозидазы значительно повышалась в печени, почках, головном мозге при концентрации аммония в воде 15 мг/л, при увеличении концентрации соли до 50 мг/л происходило снижение активности этого фермента (табл. 33).

Заметный подъем уровня активности лизосомальных ферментов у карпов свидетельствует о том, что углекислый аммоний вызывает нарушения в нормальном течении процессов обмена веществ и является для этих рыб токсическим веществом.

В жабрах активность всех лизосомальных ферментов снижалась при обеих концентрациях токсиканта. Возможно, это явление объясняется локальным сдвигом pH в щелочную сторону (Sando et al., 1979; Gonzales-Noriega et al, 1980) в клетках данного органа. Из изученных в данном эксперименте органов именно жабры в первую очередь соприкасаются с растворенными в воде

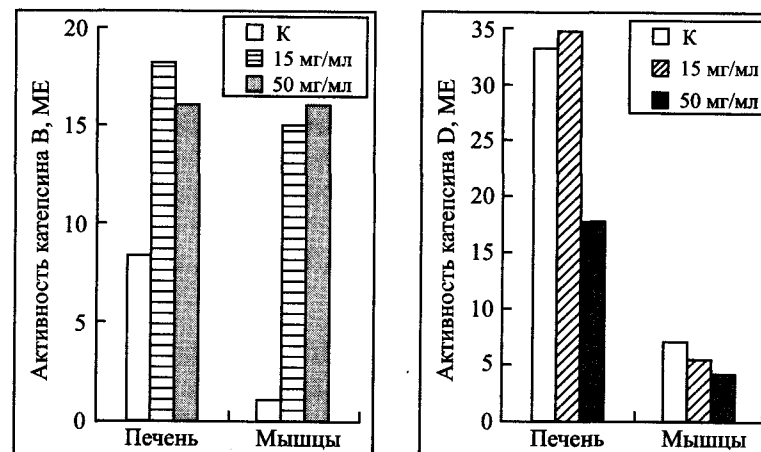


Рис. 7. Изменение активности лизосомальных протеиназ в тканях карпа под влиянием соли аммония $(NH_4)_2SO_4$ (сборные пробы из 11 рыб)

веществами, легко проникаемы для последних (Шмидт-Ниельсен, 1982). Очевидно, тот же механизм лежит в основе отмеченного снижения активности лизосомальных ферментов в двух других органах при увеличении концентрации соли аммония в среде обитания карпов.

На рис. 7 представлены данные по влиянию различных концентраций соли аммония на активность катепсинов в органах карпа. Хорошо видно, что активность катепсина В в печени, мышцах и жабрах возрастает, а в почках и головном мозге – снижается, причем наиболее значительно при концентрации соли аммония 50 мг/л. Активность катепсина D в печени и мышцах снижается при концентрации углекислого аммония 50 мг/л, а в других органах при той же концентрации – возрастает, в почках до 220% по сравнению с контролем. Влияние этого токсиканта на активность лизосомальных протеиназ также следует, видимо, связать с нейтрализацией среды ионом аммония (Немова, Сидоров, 1990).

Известно, что рыбы относятся к группе аммонителических животных, у которых конечным продуктом белкового обмена является аммиак. В нормальных условиях высокотоксичный для живой клетки аммиак, образующийся в различных органах, обезвреживается с помощью глутаминовой кислоты (Лукьяненко, 1983). При повышенном содержании в среде обитания рыб ионов аммония в организме накапливается этот яд, возникают наруше-

ния в метаболизме, о чем можно судить по сдвигам в активности лизосомальных ферментов.

Таким образом, изменения в активности лизосомального аппарата, возникающие под влиянием токсических веществ, зависели от химической природы действующего агента, его концентрации, вида и стадии развития рыбы, специфики функций исследуемого органа. Кроме того, выявлена индивидуальная чувствительность к токсикантам отдельных ферментных систем лизосом.

2.4. УЧАСТИЕ ЛИЗОСОМАЛЬНОГО АППАРАТА В ПРОЦЕССАХ ПИТАНИЯ

Важнейшим фактором среды, играющим первостепенную роль в биохимической, морфологической и экологической адаптации видов является пища (Никольский, 1963; Сорвачев, 1982; Одум, 1986). В то же время, такие основные функции организма, как питание, дыхание и размножение взаимосвязаны и взаимобусловлены 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, звероводства и рыбоводства.

Составляющие ингредиенты пищи трансформируются в энергию биохимических процессов и структурные элементы организма. Важный момент – количество и качество пищи, которая должна быть сбалансированной и достаточной, так как только при выполнении этих условий обеспечивается нормальный рост и развитие организма. При несбалансированном питании (белковая недостаточность, избыточное поступление липидов и углеводов), частичном или полном голодании включаются различные механизмы физиолого-биохимической адаптации, регулирующие интенсивность и направленность метаболизма на тканевом и клеточном уровнях (Покровский, 1974). При этом следует учитывать, что на успешность процессов питания, пищеварения и усвоения пищи оказывают влияние сразу многие внешние и внутренние факторы.

Согласно современной концепции питания усвоение пищи происходит с помощью трех основных: внеклеточного, внутриклеточного и мембранного, и двух дополнительных: индуциро-

ванного и симбионтного типов пищеварения (Уголев, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993). В большинстве из названных типов больший или меньший вклад в процессы расщепления компонентов пищи вносит ферментативный аппарат лизосом.

Внутриклеточное пищеварение является основной функцией лизосом. У простейших и беспозвоночных животных этот механизм ассимиляции пищи является основным. У позвоночных, в том числе и рыб, он имеет большое значение на ранних этапах развития, а также в те периоды жизненного цикла, когда обеспечение организма веществом и энергией осуществляется за счет эндогенного питания (Васильев, 1979; Кузьмина, Гельман, 1998).

Активность лизосомальных ферментов в ходе онтогенетического развития животных подвержена значительным колебаниям (Sellinger, Nordrum, 1969; Парина, Калиман, 1978; Olea et al., 1991). Выяснилось, что возраст животных оказывает влияние как на энзиматический состав лизосом, уровень ферментативной активности, так и на устойчивость лизосомальных мембран. Как показано Ю.К. Кярнером (1983), при изучении развивающихся и дефинитивных тканей многие внеклеточные регуляторные факторы контролируют клеточный метаболизм через лизосомальный аппарат. Деградации подвергаются компоненты клетки с подавленной функциональной активностью.

Влияние экологических факторов на функционирование лизосомального аппарата в онтогенезе у рыб можно проследить с самого первого момента – этапа зарождения организма, созревания полноценной икринки. Известно, что у многих рыб при неблагоприятных условиях наблюдается процесс резорбции зрелой или близкой к зрелости икры (Володин и др., 1974). В фагоцитозе и резорбции желтка и жировых включений икры активное участие принимают лизосомы фолликулярного эпителия. О важной функции лизосомальных гидролаз в процессах оплодотворения, на всех этапах эмбрионального развития и вылупления зародыша было сказано выше. Здесь мы хотим подчеркнуть, что в личиночный период, пока не сформировался окончательно пищеварительный тракт, основной вклад в обеспечение организма необходимыми веществами вносят лизосомальные ферменты.

По мере становления пищеварительной функции, с постепенным переходом личинок на смешанное, а затем на экзогенное питание эта роль лизосомальных гидролаз ослабевает (Плотников, Проскуряков, 1984; Кузьмина, Гельман, 1998). При этом возрастает их роль в адаптивных реакциях организма к меняющимся условиям среды, в выполнении специфических функций отдельны-

ми органами и тканями, но всегда остается и при необходимости (голодание, несбалансированное питание и т.п.) включается главная функция – внутриклеточное пищеварение). Все сказанное справедливо для большинства видов, имеющих желудок. У тех же рыб, которые не имеют желудка, на стадии предличинки и личинки переваривание белковой пищи осуществляется в средней и задней частях кишки посредством внутриклеточного протеолиза (Кузьмина, Гельман, 1998; Watanabe, 1982; Govoni et al., 1986).

Как было показано недавно (Шивокене, 1989), важная роль в процессах пищеварения у рыб, других гидробионтов, а также у насекомых принадлежит симбионтному пищеварению. Многочисленные микроорганизмы (составляющие до 1/4 содержимого кишечника), населяющие пищеварительный тракт макроорганизма, потребляя некоторое количество нутриентов, преобразуют их во вторичные нутриенты и используют их для своего роста и развития. В то же время они продуцируют ферменты, не синтезируемые позвоночными животными, такие как целлюлаза, хитиназа, хитобиаза, что позволяет рыбе использовать недоступные ей субстраты. Являясь поставщиками ферментов, аминокислот (главным образом незаменимых), витаминов и других веществ, микроорганизмы кишечника в то же время и сами представляют собой ценные пищевые объекты. В зависимости от возраста и периода годового цикла макроорганизма, экологических особенностей водоема численность симбионтов подвержена значительным колебаниям, но всегда, даже при зимнем голодании рыб и голодании, вызванном высокой температурой (в частности, у взрослых лососей при температуре выше 20 °С), содержимое кишечника включает в себя сотни миллиардов бактерий.

Другой дополнительный тип пищеварения, при котором используются ферменты (среди них и кислые гидролазы) кормовых объектов – индуцированный аутолиз. Многочисленными исследованиями (в том числе и нашими) было показано, что многие виды беспозвоночных и рыб, являющиеся компонентами пищи других животных, содержат разнообразные ферменты (протеазы, фосфатазы, гликозидазы, нуклеазы и др.). Попадая в условия, оптимальные для их действия (для лизосомальных гидролаз это кислая среда в пищеварительном тракте хищника), ферменты жертвы производят аутолитическое расщепление макромолекулярных компонентов своих тканей. Возможность такого явления была доказана в экспериментах В.В. Кузьминой (1993), в которых при длительной экспозиции деструктурированных объектов питания рыб в кислой среде (рН 3,0–5,0) при отсутствии экзогенных субстратов наблюдалось значительное увеличение активно-

сти карбогидраз и протеаз, а также концентрации продуктов соответствующих реакций – гексоз и аминокислот.

Таким образом, на разных стадиях онтогенеза и годового цикла гидробионтов в процессы питания, осуществляющихся с помощью разных сменяющихся и дополняющих друг друга механизмов, вовлекаются лизосомальные гидролазы.

Активность ферментов у молоди лосося при разных вариантах кормления. Рост является результирующей всех жизненно важных процессов, протекающих в молодом организме (Чмилевский, 1998). Главными факторами, определяющими рост, развитие и выживаемость рыб как в естественных, так и в искусственных условиях являются корм и температура воды. Поэтому очень большое внимание на рыболовных заводах уделяется подбору кормов и особенно на самых ранних стадиях развития рыб (Остроумова, 1964; Шустов, 1983). Наиболее полноценными и сбалансированными принято считать сухие гранулированные корма, приготовленные на специальных предприятиях.

На Кемском лососевом рыбозаводе по биохимическим показателям мы оценивали состояние молоди, содержащейся на комбинированном рационе (кормление через раз гранулированным кормом и пастообразной кормосмесью на основе рыбного фарша) и на пастообразном корме. В другом случае сравнивали показатели у молоди, получавшей общезаводской (контроль) и “улучшенный” корм. В состав контрольного корма входили: рыба (мойва), рыбная мука, икра трески, гидролизные дрожжи, фосфатиды и в очень небольшом количестве селезенка и кровяная мука. Улучшенный рацион отличался более высоким содержанием двух последних компонентов.

Сравнительное изучение активности кислой фосфатазы и веса тела сеголеток, находившихся на разных рационах, показало, что поиск в этом направлении может дать положительный результат. В первом случае заметных отличий по весу тела рыб не было обнаружено, но как свободная, так и общая активность кислой фосфатазы была выше у молоди, получавшей пастообразный корм (табл. 34), что свидетельствует о высоком уровне катаболических процессов в ее организме.

Во втором случае также не получено достоверных различий между сравниваемыми вариантами (табл. 35). В то же время больший вес сеголеток, находившихся на улучшенном корме, говорит о предпочтительном его использовании при выращивании рыбы на заводе.

Таблица 34

Активность кислой фосфатазы (мкМ п-нитрофенола/1 г сырого веса/мин)
и вес тела сеголетков лосося, получавших разные корма

Вариант	Активность фермента	$M \pm m$	n	Вес, г
Комбинированный рацион	Свободная	0,813±0,003	24	1,168±0,133
	Общая	0,963±0,031	24	
Пастобразный корм	Свободная	1,197±0,044	24	1,134±0,186
	Общая	1,238±0,021	24	

Таблица 35

Активность кислой фосфатазы (мкМ п-нитрофенола/1 г сырого веса/мин)
и вес тела сеголетков лосося, получавших разные корма

Вариант корма	Активность фермента	$M \pm m$	n	Вес, г
Общезаводской	Свободная	0,935±0,071	10	1,238±0,320
	Общая	1,248±0,087	10	
Улучшенный	Свободная	1,112±0,098	10	1,446±0,381
	Общая	1,196±0,057	10	

Результаты этих исследований показывают, что молодь семги тонко реагирует на характер кормления. При улучшении рационов в организме повышается активность лизосомальных ферментов, ответственных за катаболическую часть обмена веществ, что в конечном счете способствует формированию жизнестойкой крепкой молоди.

Активность ферментов у рыб при разных формах голодания. Большинство показателей метаболизма у рыб, как и у других животных, характеризуется изменчивостью в соответствии с сезонными физиологическими ритмами, обусловленными влиянием эндогенных и экзогенных факторов (Шульман, 1972; Баранникова, 1975; Шатуновский, 1980; Сидоров, 1983; Delahunty et al., 1980; Fernandez, Planas, 1980). Выявлена определенная специфика физиолого-биохимических характеристик годовых циклов рыб в зависимости от видовых особенностей, стадии онтогенеза, принадлежности к той или иной экологической группе (Шатуновский, 1980; Беляев и др., 1983).

Рыбы, в отличие от большинства высших позвоночных, обладают феноменальной способностью в определенные периоды го-

дового цикла обходиться без экзогенно 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, хорошо изучены и охарактеризованы (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 1994). Меньше сведений о роли ферментных систем лизосом, осуществляющих внутриклеточное пищеварение у голодающих по тем или иным причинам рыб (Сорвачев, 1982; Крупнова, 1986).

Нами было проведено сравнительное изучение активности лизосомальных ферментов у рыб при генетически закрепленных формах голодания – нерестовых миграциях у лосося (*Salmo salar* L.), зимовке у леща (*Abramis brama* L.) и карпа (*Cyprinus carpio* L.). Кроме того, учитывая, что полное голодание является хорошей моделью, позволяющей изучать тонкие механизмы ферментных адаптаций, проводили исследование биохимических показателей при вынужденном голодании у радужной форели (*Salmo gairdneri* R.), карася (*Carassius carassius* L.) и других животных (кур, кроликов, норок). Кроме активности кислых гидролаз определяли содержание гликогена, а также двух плазматических ферментов (альдолазы и щелочной фосфатазы) энергетического обмена, также имеющего важное значение при эндогенном питании (Максимович, 1988).

Было показано, что одним из проявлений адаптаций к голоданию на уровне клетки у рыб, как и у других видов является значительная активация ферментов лизосом и нарушение стабильности их мембран (табл. 36, 37). Последнее объясняется появлением большого количества крупных аутофаголизосом с “хрупкой” мембраной, легко разрушающейся при гомогенизации тканей. Сравнительное изучение этих механизмов у высших и низших позвоночных выявило, что у птиц и млекопитающих, не приспособленных к длительному голоданию, активация лизосомальных ферментов происходит быстрее и на большую величину, чем у рыб (Васильев, Звягина, 1978; Высоцкая и др., 1989; Высоцкая и др., 2001).

Различная картина изменений ферментативной активности у карасей и кроликов объясняется тем, что адаптивные перестройки метаболизма при голодании происходят в три стадии (Сорвачев, 1982; Панин, 1983; Black, Love, 1986). На первой стадии довольно быстро используются запасы гликогена и одновременно активизируются процессы глюконеогенеза, что вызвано необходимостью поддерживать на минимальном уровне запасы глюкозы и гликогена для стабильной работы головного мозга и сердца.

Таблица 36

Изменение активности ферментов (на 1 мг белка) и содержания белка в мышцах караса в норме и при голодании (более 12 мес.)

Показатели	Варианты		
	Контроль	Опыт	
		активные	ослабленные
КФаза	0,12	0,19	0,32
ЩФаза	0,06	0,09	0,13
Глюкозидаза	0,017	0,023	0,038
Альдолаза	41,50	32,60	23,20
ДНКаза	0,10	0,13	0,20
РНКаза	0,20	0,28	0,44
Белок, мг/г	45,50	30,80	18,50

Таблица 37

Изменение активности ферментов (на 1 мг белка) в тканях кроликов при голодании (4 дня)

Фермент	Вариант	Орган		
		мышцы	печень	сыв. крови
Кислая фосфатаза	Контроль	0,31	0,61	0,068
	Опыт	0,21	0,30	0,029
Щелочная фосфатаза	Контроль	0,042	0,22	0,061
	Опыт	0,051	0,18	0,042
β -глюкозидаза	Контроль	0,0	0,13	0,021
	Опыт	0,0	0,08	0,006
Альдолаза	Контроль	69,5	5,80	0,32
	Опыт	47,2	2,50	0,42
ДНКаза	Контроль	0,14	0,09	0,0
	Опыт	0,08	0,05	0,0
РНКаза	Контроль	0,12	0,16	0,058
	Опыт	0,11	0,11	0,054

На второй стадии происходит переключение на расщепление липидов, включаются ферменты, окисляющие жирные кислоты и, наконец, на третьей стадии, характеризующейся полным истощением энергетических ресурсов, резко усиливается катаболизм белков, использующихся как источник энергии, активизируется лизосомальный аппарат клеток. Исследованные нами караси, голодавшие более года, находились на второй стадии адаптивных перестроек метаболизма, вызванных голоданием (ослабленные

рыбы испытывали более глубокий стресс). Кролики, не получавшие пищи в течение четырех дней, прошли первую стадию голодания, активность лизосомальных ферментов еще понижена, и гликолиз снижен, следовательно, углеводные запасы исчерпаны. Об этом же говорит и определение содержания гликогена в тканях голодавших кроликов. В печени запасы гликогена уменьшаются в шесть раз по сравнению с контролем, в крови также несколько уменьшаются, а в мышцах не изменяются. О том, что при голодании в первую очередь расходуется гликоген печени, свидетельствует и результат по определению содержания этого полисахарида в печени голодавших в течение четырех суток кур, у них уровень гликогена снижался втрое по сравнению с контролем. Как видим, у рыб наблюдается растянутость адаптивных процессов во времени.

Выявлены определенные отличия в лизосомальной реакции на отсутствие экзогенной пищи у рыб при разных формах голодания. В экспериментах на радужной форели показано, что при вынужденном голодании в течение одного месяца активность всех лизосомальных гидролаз в печени значительно возрастала по сравнению с контролем (Крупнова и др., 1985). Такая же картина наблюдалась в почках и селезенке, исключение составляла ДНКаза, которая в селезенке несколько снижалась. В жабрах, как и в других органах, был 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, повышался 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. Показана зависимость характера изменения их активности от сезона года. Радужная 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 караса, голодав-

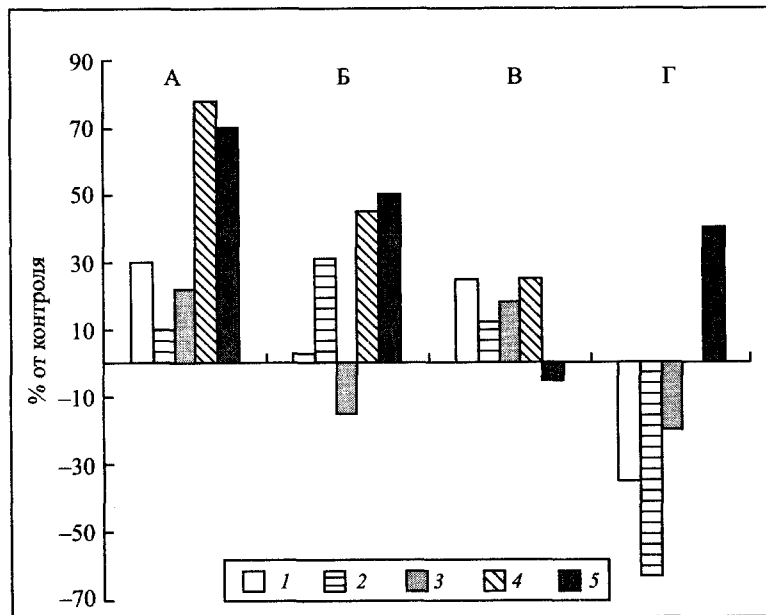


Рис. 8. Изменение активности лизосомальных ферментов в органах леща за время зимовки (в % к уровню в предзимовальный период).

А – селезенка, Б – печень, В – жабры, Г – мышцы

1 – кислая фосфатаза, 2 – β-глюкозидаза, 3 – β-галактозидаза, 4 – РНКаза, 5 – ДНКаза

шего 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 активности кислой фосфатазы, β-глюкозидазы, обеих нуклеаз (при расчете на один мг белка) (табл. 36).

При генетически закрепленном голодании (нерестовые миграции лососевых, зимовка карповых) также выявлено своеобразие изменчивости биохимических показателей в зависимости от вида, физиологического состояния и других особенностей рыбы. Ниже мы более подробно остановимся на адаптивных перестройках, происходящих в организме леща в ходе зимовки. У лосося во время нерестовой миграции за счет эндогенного питания происходит обеспечение энергией на движение, и одновременно усиливаются процессы катаболизма, направленные на перераспределение веществ для образования генеративных продуктов. В этот период во всех тканях резко возрастает активность лизосомальных нуклеаз, гликозидаз, кислой фосфатазы и катепсина D (рис. 8), в то же время значи-

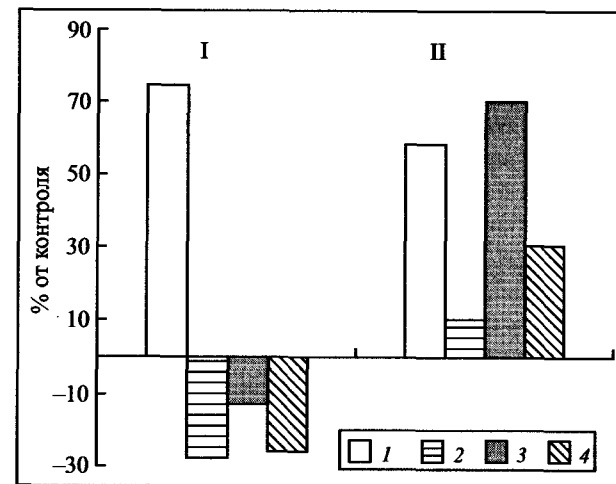


Рис. 9. Изменение активности щелочной фосфатазы (I) и альдолазы (II) в органах леща за время зимовки.

1 – селезенка, 2 – печень, 3 – жабры, 4 – мышцы

тельно снижается содержание белка в мышцах (Немова и др., 1980).

Активация лизосомального аппарата в тканях сеголеток карпа отмечена в начале зимовального периода, на его протяжении наблюдались максимумы активности отдельных ферментов на разных сроках зимовки. То же самое можно сказать и о проявлении минимальной активности кислых гидролаз в ходе зимовки молоди карпа. Так, для катепсина D – это февраль, для кислой фосфатазы и нуклеаз – март, а для β-глюкозидазы – май (Крупнова, 1986; Высоцкая и др., 1998). Все это можно расценивать 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 предзимовальным периодом (рис. 8). В мышцах к этому времени сохраняется высокая активность нуклеаз, но достоверно угнетена активность кислой фосфатазы и β-глюкозидазы. Также снижается за время зимовки активность щелочной фосфатазы в мышцах и печени, но значительно возрастает в селезенке, органе ответственном за иммунобиологические и защитные функции организма (рис. 9, I). Повышен уровень активности одного из ферментов гликолиза – альдолазы (рис. 9, II) во всех тканях вы-

Изменение активности ферментов в тканях леща за время зимовки
(на 1 г сырого веса ткани, $n = 7-10$)

Орган	Дата	КФаза, мкг Р/мин	РНКаза, $\Delta E_{260}/\text{мин}$	Альдолаза, $\Delta E_{336}/\text{мин}$
Селезенка	29.10	9,39±0,34	1,72±0,12	1,22±0,06
	15.03	7,88±0,58	1,83±0,01	1,12±0,08
Печень	29.10	9,05±0,53	1,00±0,06	11,04±0,90
	15.03	8,83±0,30	1,30±0,09*	12,05±0,97
Жабры	29.10	6,05±0,35	1,27±0,09	0,78±0,05
	15.03	5,00±0,04*	1,23±0,18	0,89±0,07
Мышцы	29.10	3,79±0,25	0,34±0,06	84,05±1,87
	15.03	2,18±0,015*	0,39±0,03	95,45±3,02

Примечание. * – Различия достоверны при $p \leq 0,05$.

ходящего с зимовки леща. Это свидетельствует о важной роли процессов гликолиза в обеспечении организма энергией в этот период годового цикла.

Представленный внутриклеточный энзиматический статус выявляется при расчете активности ферментов на один мг белка. Учитывая значительное обводнение тканей у рыб при голодании, мы производили расчет активности ферментов и на один г сырого веса ткани (табл. 38). В целом, сохраняется та же направленность в изменении активности ферментов в мышцах, жабрах и печени, однако активность кислой фосфатазы и глюкозидазы при таком расчете оказываются более низкими у выходящих с зимовки лещей, чем у рыб перед зимовкой. И особенно заметны эти отличия в селезенке.

В целом, судя по амплитуде изменения активности изученных ферментов, метаболизм карпа и леща, обеспечиваемый во время зимовки главным образом за счет активной работы внутриклеточных ферментных 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 (Селье, 1972; Покровский, 1974), и рыбы в этом смысле не являются исключением. В частности, наряду с резким падением активности большинства ферментных систем и особенно снижением секреции и активности ферментов пищеварительного тракта у них значительно активируются ферментные системы, ответственные за мобилизацию тканевых ресурсов и за синтез гормонов

коры надпочечников. В исследованиях В.В. Кузьминой показано, что у леща активность некоторых пищеварительных гидролаз летом (в июле) в период наиболее интенсивного питания в 240–490 раз выше, чем зимой (Уголев, Кузьмина, 1993). Как следует из наших данных, противоположная картина наблюдается в активности внутриклеточных лизосомальных гидролаз.

При изучении сезонных особенностей в питании леща из Сямозера установлено, что половозрелые лещи, как и молодь, активно питаются в летний период. При средней температуре 16,5 °С средний индекс наполнения кишечника равняется 84,5‰. С понижением температуры воды в озере ослабляется активность леща и резко снижается поступление пищи. В сентябре при температуре 10,3 °С индекс наполнения кишечника составляет 43,5‰, а в октябре при температуре 2,5 °С соответственно 7,5‰. Зимой взрослый лещ обитает на глубинных участках, питается очень мало, индекс наполнения кишечника колеблется от 5 до 10‰, в течение подледного периода интенсивность питания остается весьма слабой (Потапова, Соколова, 1962; Решетников и др., 1982; Стерлигова и др., 1991).

Внешние факторы, такие как фотопериодизм, температура, обеспеченность пищей оказывают влияние на нейро-гормональный статус организма, который, в свою очередь, регулирует поведение рыб и определенные стороны метаболизма, обеспечивающие нормальное функционирование всех систем на уровне, соответствующем переживаемому периоду годового цикла и стадии онтогенеза (Шульман, 1972; Баранникова, 1975; Свирский, Голованов, 1991; Ивлева, Шульман, 1991). Резкое снижение температуры и связанные с ним изменения в состоянии кормовой базы, а к концу зимовки и снижение количества кислорода в местах зимовки лещей – основные неблагоприятные факторы, вызывающие обнаруженные нами сдвиги в активности внутриклеточных ферментных систем.

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. 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 (4,5 мес.) запасы гликогена в значительной степени уже истощены, также

как и липидов, выступающих в качестве основного энергетического источника при зимовке у малоподвижных рыб (Шульман, 1972; Беляев и др., 1983). В исследованиях на лещах из оз. Выртсъярви было показано, что за время зимнего голодания у самок происходило расщепление накопленных запасных веществ, выразившееся в значительном снижении (а иногда и полном исчезновении) полостного жира и липидов (главным образом, фракции триацилглицеринов) в печени и мышцах рыб (Загорских, Сидоров, 1989). Предполагается, что основная часть липидов из печени и мышц поступает на формирование половых продуктов. Эти процессы, хоть и не столь интенсивно, как у голодающих перед нерестом лососей, происходят и у леща, который нерестится в мае (Стерлигова и др., 1991). У самок в мышцах и печени к концу зимы содержалось меньше триацилглицеринов, а в последних шел более интенсивный, чем у самцов, гидролиз с отщеплением полиеновых жирных кислот. Показано, что при стрессе, в том числе вызванном голоданием, в плазме крови рыб происходит увеличение концентрации катехоламинов (Mazeaud et al., 1977), гормонов, запускающих катаболические реакции, и среди прочих с участием различных лизосомальных липаз. Дополнительным аргументом в пользу высказанных предположений служит появление в печени и крови рыб большого количества жирных кислот при снижении температуры среды.

Большой набор разнообразных гидролаз позволяет организму в неблагоприятные периоды использовать все менее значимые для него в данный момент вещества и структуры для энергетического и пластического обмена. Кроме гликогена, триацилглицеринов и других запасных веществ при зимнем голодании используются различные гликолипиды, гликопротеины и другие углеводсодержащие вещества, о чем можно судить по высокой активности лизосомальных гликозидаз. Наряду с этим используется значительная часть резервных белков (Сорвачев, 1982; Black, Love, 1986). По нашим данным, к концу зимовки леща в мышцах содержание белка сократилось на 12%, а в жабрах и селезенке более, чем на 30% по сравнению с предзимовальным периодом (Высоцкая и др., 1998). Мало уменьшался этот показатель в печени, что, видимо, связано с активной функцией данного органа по синтезу разнообразных веществ, необходимых для поддержания жизнедеятельности организма в период зимовки. О том, что процессы биосинтеза в тканях зимующих рыб по сравнению с предзимовальным периодом не ослабевают, косвенно свидетельствует довольно высокий уровень нуклеаз, особенно во внутренних органах – печени и селезенке.

Высокая метаболическая нагрузка проявляется повышенным уровнем не только лизосомальных, но и других ферментов. Так, в селезенке также значительно повышен уровень активности щелочной фосфатазы – фермента, выполняющего многообразные и важные функции в организме, в том числе по регуляции углеводного и липидного обмена, вместе с кислой фосфатазой регулирующей уровень фосфора в клетке. По уровню активности щелочной фосфатазы в чешуе судят об интенсивности роста рыб (Шульман, 1972). Падение ее активности после зимовки во всех органах, кроме селезенки, соответствует пониженному уровню обмена веществ у лещей в этот период.

Значительная доля в обеспечении организма энергией при зимнем голодании падает на гликолиз, в чем убеждает повышенная активность альдолазы в тканях выходящего с зимовки леща. Это понятно, принимая во внимание низкую температуру и ухудшение кислородных условий у дна к концу зимовки, в связи с чем лещи вынуждены к этому времени подниматься в верхние слои воды (Решетников и др., 1982). Как отмечалось выше, у длительно голодающих рыб значительно повышается скорость образования глюкозы из эндогенных субстратов, образующихся в результате катаболизма белков, глицерина липидов и других веществ (Seibert, 1985; Максимович, 1988). Основным источником углерода при глюконеогенезе является лактат (Renaud, Moon, 1980). В итоге работа энергетических ферментных систем оказывается теснейшим образом связанной с функционированием лизосомального комплекса. Продукты осуществляемых им катаболических реакций используются как для производства энергии, так и для самых необходимых синтезов. Об удовлетворении минимальных энергетических потребностей во время зимовки рыб за счет процессов гликолиза сообщается в работе В.Д. Романенко с соавторами (1991).

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 (Руоколайнен, 1985; Высоцкая и др., 1998). Изучение множественных форм кислой фосфатазы с помощью ионообменной хроматографии на колон-

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

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

2.5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ В ТКАНЯХ РЫБ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ В ВОДОЕМЕ

Изложенные выше материалы показали, что такие факторы среды, как температура, наличие кислорода, содержание в воде солей, условия питания, антропогенные загрязнения оказывают существенное влияние на активность лизосомальных ферментов, участвующих в приспособительных реакциях клетки, а также ряда цитоплазматических ферментов, связанных с энергетическим обменом и регуляцией метаболизма. Это позволяет думать, что названные биохимические показатели могут быть использованы в качестве дополнительных тестов при оценке состояния организма и, в целом, экологической ситуации в водоеме.

На этом основании, нами совместно с лабораторией экологической токсикологии СевНИИРХа были проведены комплексные исследования качества воды в двух водоемах Карелии на акватории форелеводства. В этих исследованиях наряду с гидробиологическими, токсикологическими и гидрохимическими использовались биохимические показатели: определение активности лизосомальных ферментов, альдолазы и щелочной фосфатазы.

Биотестирование качества воды озер Крошнозера и Вохтозера для целей форелеводства проводилось двумя способами: в натуральных и лабораторных экспериментах. В первом случае тест-объектами были годовики радужной форели с Сямозерского рыбозавода. Молодь рыбы помещали в садки объемом около 8 л по 10 штук в каждом. Садки размещали в водоемах на глубину 3–4 м и выдерживали в таких условиях в течение месяца – с июля по август. Вода в Крошнозере исследовалась в центре озера (р-н д. Котчура); в южной оконечности озера (р-н стоянки садковых форелевых линий рыбозавода) и в районе водозабора рыбозавода. В Вохтозере – в южном плесе озера, в 30–50 метрах от новой садковой форелевой линии.

Лабораторные эксперименты были проведены на икре радужной форели в мае–июле в аквариальной СевНИИРХа. Развитие икры происходило в воде, доставленной из четырех указанных выше точек озер Крошнозеро и Вохтозеро. Для контрольного варианта использовалась вода из Онежского озера. По окончании опытов при натурном и лабораторном опытах годовиков и личинок радужной форели брали на биохимический анализ.

Полученные в садковых и аквариальных опытах результаты (снижение активности большинства лизосомальных ферментов и значительное повышение активности альдолазы) свидетельствуют о низком качестве воды акватории Крошнозера в районе садковой линии и водозабора рыбозавода (табл. 39, 40, см. также табл. 13). Эти данные согласуются с результатами гидрохимических исследований указанных акваторий, согласно которым вода как в Крошнозере, так и в Вохтозере относится к загрязненным и грязным. В весенне-летний период вода из Крошнозера (около д. Котчура) относилась к β -мезосапробному классу, а из озера Вохтозеро к ксеносапробному и, что особенно важно отметить, имела пониженное содержание кислорода. В сложившихся условиях в организме рыб происходит перестройка в системах энергообеспечения, включающая компенсаторные механизмы производства энергии. Большая нагрузка падает на гликолиз, с чем и связано заметное повышение активности альдолазы.

О явно неблагоприятном воздействии на рыб воды в исследованных акваториях говорит низкий уровень активности лизосомальных ферментов в печени годовиков форели, особенно это касается кислой фосфатазы. Уровень ее в мышцах даже выше, чем в печени. Печень, как известно, является детоксикационным барьером в организме и, как показали наши исследования, у рыб в норме в этом органе активность лизосомальных ферментов всегда намного выше, чем в мышцах.

Таблица 39

Активность ферментов в печени годовиков радужной форели под влиянием воды из различных акваторий озер Крошнозеро и Вохтозеро (садковый опыт, $n = 10$; расчет активности на 1 мг белка)

Фермент	Сязозеро, рыбо- завод	Вохтозеро, южный плес	Крошнозеро, р-н во- дозабора
ДНКаза	0,66±0,07	0,45±0,03	0,65±0,08
РНКаза	0,34±0,07	0,37±0,02	0,48±0,03
β-глюкозидаза	0,040±0,006	0,041±0,005	0,025±0,003
Альдолаза	0,88±0,12	5,08±0,65	6,00±0,44
ЩФаза	0,47±0,03	0,44±0,03	0,65±0,07

Низкий уровень лизосомальных ферментов является показателем ослабления защитных сил организма. На этом основании можно сказать, что более-менее благополучно происходит развитие икры в воде из района садковой линии озера Крошнозеро (табл. 40), хотя повышенный уровень кислой фосфатазы и небольшое снижение активности щелочной фосфатазы и альдолазы позволяют предположить, наличие негативных факторов, таких, например, как антропогенное загрязнение. Так же как и у годовиков в садковом эксперименте у личинок форели, развивавшихся в крошнозерской воде, взятой в районе водозабора, отмечается патологически низкий уровень кислой фосфатазы. Активность щелочной фосфатазы понижена у личинок, выращенных в крошнозерской и в вохтозерской воде. Низкая активность ферментов фосфорного обмена свидетельствует о падении уровня фосфора в клетках организма, а, следовательно, создается ситуация, когда лимитируются реакции синтеза богатых энергией соединений.

Таким образом, полученные в садковых и аквариальных опытах биохимические показатели подтверждают выводы гидробиологических и гидрохимических исследований о низком качестве воды акватории Крошнозера в районе садковой линии и водозабора рыбозавода.

Несколько лучше кондиции воды из Вохтозера и из Крошнозера в районе д. Котчура, но существующее там равновесие очень легко нарушается. Подтверждают эту мысль данные экспериментов, приведенные в табл. 41. Здесь показано, изменение биохимических показателей у личинок форели, выращенных в фоновых средах из различающихся по трофности водоемов, под

Таблица 40

Активность ферментов у личинок радужной форели под влиянием воды из разных акваторий озер Крошнозеро и Вохтозеро (аквариальный опыт, расчет активности ферментов на 1 мг белка)

Фермент	Онежское озеро	Крошнозеро			Вохтозеро
		р-н Котчу- ры	садковая линия	р-н водоза- бора	
КФаза	0,11	0,09	0,17	0,03	0,11
ДНКаза	0,73	0,72	0,60	0,84	0,75
РНКаза	0,53	0,46	0,44	0,57	0,84
Глюкозидаза	0,100	0,047	0,093	0,079	0,042
Альдолаза	3,33	5,45	2,56	3,40	3,40
ЩФаза	0,43	0,28	0,34	0,26	0,22

Таблица 41

Активность ферментов у личинок радужной форели под влиянием прометрина в разных фоновых средах (на 1 мг белка/ мин)

Фермент	Крошнозеро			Урозеро		
	контроль	прометрин, мг/л		контроль	прометрин, мг/л	
		0,1	1,0		0,1	1,0
КФаза	0,13	0,06	0,08	0,20	0,08	0,13
ДНКаза	0,46	0,68	0,48	1,06	0,77	0,76
РНКаза	0,37	0,47	0,41	0,58	0,60	0,46
Глюкозидаза	0,071	0,051	0,057	0,086	0,049	0,072
Альдолаза	3,79	9,25	3,11	4,88	4,00	4,53
ЩФаза	0,34	0,08	0,29	0,28	0,34	0,23

влиянием широко применявшегося в Карелии гербицида – прометрина. Хорошо видно, что отрицательное воздействие гербицида наиболее заметно выражено в опытах с водой из Крошнозера. Активность почти всех изученных ферментов у контрольных личинок в урозерской воде выше, чем у развивавшихся в крошнозерской воде. К если у “урозерских” личинок под влиянием небольшой концентрации прометрина наблюдалось падение активности ферментов, то у более слабых “крошнозерских” происходил адаптивный всплеск активности нуклеаз и почти в 2,5 раза возрастала активность альдолазы. На повышенную концентрацию гербицида реакция ферментных систем рыб в обоих вариантах была меньшая.

Известно, что реакция гидробионтов на действие токсикантов существенно зависит от условий окружающей среды (Лукьяненко, 1987). На основании полученных нами данных можно сделать предположение, что условия жизни для обитателей водоема более благоприятны в Урозере, чем в Крошнозере. Приведенные результаты опытов убедительно продемонстрировали, что определение активности исследованных ферментных систем можно с успехом применять для оценки качества воды. Полученные биохимические показатели хорошо дополняют гидробиологические и гидрохимические данные и позволяют сделать полные и аргументированные выводы об экологической ситуации в водоеме.

2.6. АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ РАЗНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Обмен веществ в организме представляет собой сложнейшую систему взаимосвязанных и взаимообусловленных ферментативных реакций. Скорость и направленность этих реакций может существенно изменяться под влиянием специальных регуляторных механизмов, благодаря которым живые организмы поддерживают гомеостаз и обладают способностью приспосабливаться к неблагоприятным воздействиям. Показано, что местом приложения повреждающих факторов в клетке являются белковые рецепторы и в качестве главнейшего регулятора адаптивных реакций выступает аденилатциклазная система (Браун, Моженок, 1987). Циклические нуклеотиды и другие вторичные мессенджеры стимулируют деятельность многих ферментативных систем в клетке, включая тем самым разнообразные пути метаболической активности.

Определить степень воздействия на организм какого-то одного раздражителя из огромного множества внешних и внутренних факторов задача чрезвычайно сложная, тем более, что ответная реакция на влияние различных по природе экстремальных и субэкстремальных факторов, как правило, однотипна, то есть неспецифична. Состояние клетки, характеризующееся определенными физико-химическими и биохимическими изменениями под влиянием повреждающих агентов, обозначается как неспецифический адаптационный синдром клеточной системы (Панин, 1983; Браун, Моженок, 1987).

Углубленное изучение механизмов стрессовой реакции показало, что наряду с гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и

симпатико-адреналовой системами, занимающими ключевые позиции в развитии этой защитно-приспособительной реакции у высокоорганизованных живых организмов, в нее вовлекаются и другие эндокринные и ферментные системы. Учитывая, что стресс может развиваться не только при блокировке нервной проводимости у экспериментальных позвоночных, но также у низших животных и даже у растений, не имеющих нервной системы, автором концепции был уточнен и углублен смысл самого понятия. Г. Селье было предложено следующее определение: "Стрессом называется неспецифическая реакция организма на любое предъявляемое к нему требование" (Селье, 1977).

К настоящему времени сложилось представление, что стресс – это способ приобретения организмом резистентности при действии на него повреждающего фактора. Неспецифические реакции в ответ на повреждающие эффекты раздражителей расцениваются как сформировавшийся в ходе эволюции инструмент, обеспечивающий надежность адаптивного поведения организма в меняющихся условиях существования (Панин, 1983).

Опосредованно через циклические нуклеотиды гормоны действуют на энергетический обмен, и, как показано в предыдущих главах, одними из первых среди других ультраструктур клетки на действие повреждающих факторов отвечают лизосомы. Имеется достаточно сообщений об участии лизосом в стресс-реакции клетки, при различных патологиях (Зотиков, Пинчук, 1969; Афанасьев, Ноздрин, 1976; Покровский, Тутельян, 1976; Коровкин, 1982; Панин, 1983; Weissman, 1969, 1976 и др.).

Учитывая вышесказанное, при изучении особенностей биохимических изменений в процессе развития патологических состояний у различных видов живых организмов наряду с исследованием активности лизосомального аппарата уделяли внимание связанным с его функционированием ферментам энергетического обмена, а также циклазным системам.

Как подчеркивалось выше, большинство проведенных в данном направлении работ посвящено высшим позвоночным и человеку, а исследований, касающихся биохимических механизмов развития патологий у рыб, значительно меньше. Хотя известно, что у рыб, как и у других животных, существуют разнообразные способы защиты от инфекций и чужеродных веществ, в том числе показано наличие в органах и тканях активно фагоцитирующих клеток – макрофагов и гранулоцитов (Кирпичников, 1987). Лишь в последние годы появились публикации, посвященные стрессу у рыб (Pickering, 1998). В качестве основных причин, вызывающих развитие патологии, могут выступать самые разные

по природе факторы. Приведенные в предыдущих разделах главы сведения убеждают, что стрессорами могут быть повышенная и пониженная температура, различные токсиканты, голод и т.д. В этой части главы обсудим изменение биохимических показателей при паразитарных инфекциях, некрозе плавников и других патологических состояниях.

Активность лизосомальных гидролаз и некоторых ферментов энергетического обмена у рыб при травме и физической нагрузке. Выращиваемая в прудовых хозяйствах и на рыбоводных заводах молодь рыб подвергается таким стрессирующим воздействиям, как пересаживание, транспортировка, травмирование, поэтому мы изучали и влияние такого рода факторов на биохимические механизмы адаптации. Эксперименты проводили с карасем *Carassius carassius*. Травму наносили отрезанием спинного плавника. На биохимический анализ карасей брали через четверо суток после травмирования. Учитывая, что как при долговременном голодании, которое рассматривается как состояние длительного стресса, так и в рассматриваемой ситуации происходит активизация ферментов, отвечающих за процессы биосинтеза гормонов надпочечников (Покровский, Тутельян, 1976), можно было бы ожидать аналогичную описанной выше картину изменений ферментного профиля у рыб при травме. Однако в реальности нами обнаружена совершенно иная реакция организма. Оказалось, что при травматическом стрессе у карасей на четвертые сутки наблюдается снижение активности лизосомальных ферментов и щелочной фосфатазы, в среднем на 40% по сравнению с контролем. Активность гликолиза сохраняется на уровне нормы и даже имеет тенденцию к повышению. У травмированных рыб содержание белка в мышцах было немного меньше, чем у контрольных.

Обнаруженные нами адаптивные изменения в функционировании как энергетической, так и лизосомальной ферментной систем при разных стрессовых состояниях позволяют говорить о наличии очень широких возможностей организма приспосабливаться в зависимости от природы стресса. Если в первом случае (голодание) угнетение гликолиза объясняется истощением углеводных субстратов, то во втором таковые имеются в достаточном количестве, и организм может их использовать для энергетических нужд. Показано, что энергетический обмен в процессе развития стрессовой реакции носит фазовый характер: в фазу тревоги под влиянием катехоламинов, глюкокортикоидов и инсулина усиливается обмен углеводов, затем в фазу резистентности

происходит переключение энергетического обмена с углеводного на липидный и в фазу истощения снова – усиление углеводного обмена. Мы предполагаем, что в нашем опыте караси, взятые на анализ на четвертые сутки после нанесения травмы, находились на стадии истощения стрессовой реакции, у них наблюдалось усиление активности гликолитического фермента – альдолазы.

Изучение активности протеолитических ферментов у молоди карпов при механическом травмировании (статическая нагрузка) выявило незначительное повышение уровня общей активности катепсинов в мышцах, в то время как в печени активность катепсина В возрастала в 2 раза, а катепсина D – в 1,5 (Немова, 1987). Активацию протеолитических систем клетки в этом случае следует связать, на наш взгляд, с реализацией защитной функции лизосом, участием в освобождении от дефектных (поврежденных) структур.

В условиях стресса, как уже упоминалось, при действии на организм чрезвычайных раздражителей активность лизосомальных ферментов, выполняющих ведущую роль в развитии катаболической стадии патологического процесса, а также одного из компенсаторных механизмов поддержания биоэнергетики тканей (Покровский, Тутельян, 1968; Varute, Patil, 1972), как правило, повышается. Однако, как следует из нашего эксперимента, это не всегда однозначно.

В работах Л.Н. Кобылянского (1982, 1983) показано, что по мере развития стрессовой реакции, вызванной сдавливанием мягких тканей задних конечностей у крыс, происходит неравномерное повышение активности большинства лизосомальных ферментов и нарушение стабильности мембран лизосом. Однако с нарастанием тяжести шокового процесса активность РНКазы снижается и уже к 2 часам с момента травмы составляет 66 % от контроля.

Детально механизмы активизации катаболических ферментов при стрессе еще не выяснены. Существует мнение, что стероидные гормоны, продукция которых при стрессе увеличивается, в высоких концентрациях стабилизируют лизосомальную мембрану и снижают активность лизосомальных ферментов (Weissman, 1969).

Мы предполагаем, что выявленное нами угнетение активности ферментов у травмированных рыб к четвертым суткам отражает одну из фаз изменений метаболизма в процессе развития стресса. Кроме того, на динамику развития метаболических реакций стресса накладывается фазовый характер функционирова-

ния и самого лизосомального аппарата (Афанасьев, Ноздрин, 1976), поэтому считаем, что в дальнейшем было бы целесообразно изучить изменения в функционировании ферментных систем в динамике развития стрессовой реакции.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что характер адаптивных метаболических изменений отражает динамику развития стресса, а также фазовый характер действия самих ферментных систем лизосом. Определенный отпечаток накладывает природа стрессирующего фактора.

Важное значение при прогнозировании компенсаторных возможностей организма имеет его изначальное состояние в момент воздействия раздражителя. В этом смысле весьма показательны результаты экспериментов, проведенные на молоди зимующих карпов, которых в течение месяца выдерживали в потоке воды, понуждая их к активному движению (табл. 42). Под влиянием физической нагрузки у рыб наблюдалось резкое повышение активности лизосомальных ферментов в мышцах, несколько меньшее их возрастание в печени, а в сердце происходило снижение активности кислой фосфатазы и ДНКазы.

Плавание рыб является следствием мышечных сокращений, при которых расходуется энергия и вещество. Наибольшая нагрузка приходится на мышцы, поэтому в этом органе и наблюдается самое значительное повышение активности лизосомальных ферментов.

При мышечной работе расходуются богатые энергией вещества: АТФ, углеводы, липиды, белки. Полученные в опытах данные еще раз подтверждают эти представления: повышается активность фермента углеводного обмена – β -глюкозидазы и фермента, участвующего в регуляции обмена фосфора – кислой фосфатазы.

Известно, что энерготраты на плавание рыб зависят от их экологии, естественной подвижности, стадии жизненного цикла. Эксперименты с карпами проводились в феврале, то есть в период зимовки и наименьшей активности их метаболизма. В это время активность лизосомальных ферментов, как было сказано выше, начинает снижаться. Это один из физиолого-биохимических механизмов, позволяющих рыбам экономно и эффективно использовать внутренние резервы. Физическая нагрузка вызывает всплеск активности ферментных систем лизосом.

Таким образом, опыты по экспериментальной мышечной нагрузке показали, что в работающей ткани возрастают катаболические процессы, о чем свидетельствует повышение в ней активности лизосомальных ферментов и связано это с обеспечением

Активность лизосомальных ферментов у карпа в норме и под влиянием физической нагрузки (на 1 мг белка)

Орган	Вариант	КФаза	Глюкозидаза	ДНКазы	РНКазы
Печень	Контроль	6,72±0,54	0,016±0,002	2,70±0,08	1,33±0,04
	Опыт	7,49±0,77	0,028±0,003	2,42±0,06	1,46±0,06
Мышцы	Контроль	0,17±0,02	0,010±0,002	0,0	0,21±0,02
	Опыт	0,69±0,04	0,027±0,004	0,22±0,01	0,69±0,06
Сердце	Контроль	2,36±0,09	–	2,49±0,09	–
	Опыт	1,36±0,10	0,038±0,004	1,40±0,05	1,37±0,09

энергетических затрат организма. Иными словами, организм зимующих карпов обладает достаточными энергетическими ресурсами, которые позволят ему при необходимости адаптироваться к неблагоприятным внешним воздействиям.

Следует сказать, что оценка физиологического состояния выращиваемой в искусственных условиях рыбы, имеет очень большое значение для разработки мероприятий по оптимизации условий содержания и получения жизнестойкой молоди (Остроумова, 1979). Молодь карпов, истощенная после зимовки, в силу еще неустановившейся регуляции физиологических процессов подвержена заболеваниям, часто в этот период наступает ее гибель. В связи с этим мы проводили определение ряда биохимических показателей, в том числе уровня активности лизосомальных ферментов в разных органах годовиков карпов по-разному перенесших зимовку. Материал для исследований брали из прудов в апреле. Рыба различалась по своим качествам, по подвижности; по этим признакам были выделены три группы молоди: сильные, средние и слабые. Для биохимического анализа брали печень, мышцы, жабры и головной мозг.

У годовиков карпа, вышедших из зимовки в разном состоянии, наблюдается различный уровень активности изученных ферментов (табл. 43). Обращает на себя внимание повышенная активность большинства ферментов у рыб среднего качества и ослабленных после зимовки карпов.

Более низкие значения активности β -глюкозидазы у средне и плохо перезимовавших карпов во всех органах, кроме печени, могут быть результатом угнетения углеводного обмена, полного истощения энергетических резервов в организме рыб. Понижение уровня РНКазы объясняется снижением биосинтетических процессов у плохо перенесших зиму годовиков.

Активность лизосомальных ферментов в разных органах карпов после зимовки (на 1 г сырого веса/ мин, $n = 12$)

Орган	Вариант (качество молодки)	КФаза	Глюкозидаза	ДНКаза	РНКаза
		мкМ п-нитрофенола	ΔE ₂₆₀		
Мышцы	сильные	0,31	0,010	0,34	0,48
	средние	0,39	0,006	0,37	0,51
	слабые	0,49*	0,0	0,34	0,44
Печень	сильные	3,93	0,084	1,39	1,77
	средние	9,01*	0,102	2,41*	1,90
	слабые	10,19*	0,111	2,07	1,66
Жабры	сильные	2,57	0,089	1,77	1,81
	средние	3,57*	0,062	2,47	1,94
	слабые	6,98*	0,072	1,96	1,72
Головной мозг	сильные	1,87	0,081	2,26	0,87
	средние	1,74	0,076	3,03	0,93
	слабые	1,58	0,077	2,70	0,67

Примечание. * – Различия между вариантами достоверны при $p < 0,05$.

Выявленная картина неодинакового изменения уровней активности ферментов в разных органах может быть отражением изменения соотношения количества отдельных компонентов в органах рыб трех сравниваемых групп; в процессе зимовки с разной интенсивностью в разных органах использовались запасные энергетические ресурсы и белки.

Как обсуждалось выше, важная роль в процессе эндогенного питания во время зимовки карпа принадлежит лизосомальному аппарату, осуществляющему катаболизм клеточных ресурсов. Можно предположить, что лучше переносят зимовку те рыбы, у которых наиболее тонко регулируется экономное перераспределение внутриклеточных резервов. Плохо, если во время зимовки у рыб отмечается слишком высокий уровень лизосомальных ферментов, в таком случае организм быстро исчерпает все запасы. Молодь, лишенная энергетического и пластического материала, выходит из зимовки слабой, с плохой сопротивляемостью болезням, со слабыми адаптивными возможностями.

Таким образом, эти исследования позволяют заключить, что условия выращивания карпов существенно влияют на уровень активности лизосомальных ферментов в начальный период зимовки. Если эти условия неблагоприятны, то возрастает, как правило, активность указанного ферментного комплекса. Последнее

приводит, в конечном счете, к ослаблению молоди на завершающем этапе зимовки.

Активность лизосомальных и некоторых других ферментов у рыб при ихтиофтириозе. При решении проблем повышения рыбопродуктивности водоемов весьма актуальными являются вопросы охраны рыб от вредителей и различных заболеваний, в том числе паразитарных. Большое внимание в последние годы стало уделяться биохимическим аспектам этих патологий. При неблагоприятных условиях выращивания рыбы подвержены такому заболеванию как ихтиофтириоз. Это – опасное протозойное заболевание многих пресноводных рыб, широко распространенное в прудовых, нерестово-выростных хозяйствах и рыбоводных заводах. Паразит – сравнительно крупный (0,5–0,8 мм длиной) одноклеточный организм, равноресничная инфузория *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet – развивается под эпителием кожи и в соединительной ткани между респираторными складками на жабрах, вызывая их воспаление (Догель, 1932; Быховская-Павловская, 1969). Ихтиофтириус не обнаруживает особого предпочтения к какому-либо виду рыб, способен заражать карповых, лососевых, щуку и др. Молодые паразиты вбуравливаются в кожу рыбы, обрастают эпителием хозяина и образуют на его теле маленькие округлые пустулы – белые бугорки. Сильно зараженные рыбы кажутся посыпанными белым порошком (Кох и др., 1980). Ихтиофтириус при массовом заражении вызывает некроз пораженных частей тела (кожа, жабры, глаза). Патологический процесс захватывает и внутренние органы, особенно печень и селезенку, что свидетельствует о токсическом воздействии простейшего на своего хозяина (Бауер и др., 1977). Вероятно, степень поражения органа, и как следствие изменение разнообразных биохимических параметров (активность ферментов, количественный и качественный состав белков, липидов, углеводов и др.) зависит от уровня токсического воздействия, иными словами от интенсивности инвазии. Однако вопросы изменчивости биохимических показателей в органах рыб при ихтиофтириозе различной тяжести, а также на разных сроках заражения остаются практически невыясненными.

Нами проведено изучение активности ряда ферментов у карпа и карася при экспериментальном ихтиофтириозе.

Материал по карпам получали на базе ВНПО по рыбоводству (п. Рыбное Московской обл.). Заражение проводили путем совместного выдерживания здоровых рыб с носителями инвазии в течение недели. Интенсивность инвазии составляла от нескольких десятков до нескольких сотен трофонтов на рыбу.

Активность лизосомальных ферментов в печени и мышцах карпа при заболевании ихтиофтириозом (на 1 г сырого веса ткани)

Фермент	Печень (n = 8)		Мышцы (n = 5)	
	контроль	больные	контроль	больные
Фосфатаза	8,44	5,34	0,32	0,50
ДНКаза	2,79	1,23	0,43	0,32
РНКаза	1,88	1,06	0,59	0,44
β -глюкозидаза	0,11	0,03	0,0	0,0
Катепсин D	0,63	0,34	0,04	0,03

Результаты исследований показали, что инвазия вызывает снижение активности большинства кислых гидролаз (табл. 44).

В этих экспериментах было также выявлено, что изменение активности лизосомальных ферментов у пораженных ихтиофтириусом рыб существенно зависело от условий эксперимента. Так, в печени больных особей, живших в условиях с недостатком кислорода, несколько повышалась активность кислой фосфатазы и, особенно заметно, возрастал уровень протеолитического фермента – катепсина D (Высоцкая и др., 1985). Снижение активности большинства ферментов в органах больных карпов можно объяснить волнообразным характером функционирования лизосомального аппарата. Возможно, исследуемый материал был взят на анализ в тот момент, когда большинство лизосом было уже “израсходовано” в защитных реакциях организма, а новые еще не образовались в достаточном количестве. Следует учитывать, что некоторые токсины, выделяемые паразитами, оказывают ингибирующее влияние на биосинтез белков, в том числе и лизосомальных ферментов (Покровский, Тутельян, 1976). Возможно, токсины ихтиофтириуса обладают таким влиянием на ферменты карпа. Кроме того, можно предположить, что у пораженных рыб синтезируются лизосомы с другим набором ферментов, чем у здоровых. Об этом свидетельствует и повышение в отдельных случаях активности кислой фосфатазы и катепсина D, осуществляющего гидролиз белков у зараженных ихтиофтириусом рыб. Эту мысль подтверждают результаты изучения белкового состава больных и здоровых карпов, полученные Л.П. Смирновым, показавшие, что при ихтиофтириозе снижается уровень гемоглобина в печени и увеличивается фракция других белков, слабо представленная у здоровых рыб (Высоцкая и др., 1985).

Динамика активности ряда биохимических показателей в ходе развития заболевания изучалась нами в опытах с пойманными в природе карасями *Carassius carassius* L. Работы выполнялись совместно с сотрудниками лаборатории паразитологии Института биологии КарНЦ.

Рыб предварительно акклимировали в течение 2-х недель к условиям лаборатории при температуре 17 °С, а затем заражали ихтиофтириусом путем подсадки зрелых трофонтов. На 2-, 6-, 8- и 10-й день после заражения отбирали материал для анализов.

Результаты эксперимента показали, что активность изученных ферментных систем в процессе развития заболевания подвержена определенным колебаниям. Так, активность кислой фосфатазы к 6-м суткам эксперимента несколько повышается, затем снижается на 8-е сутки и снова возрастает к концу опыта. Такой же характер изменения активности и другого лизосомального фермента – РНКазы: отмечается два пика активности – на 6-е и на 10-е сутки. Активность кислой ДНКазы имеет один ярко выраженный пик активности – на 8-е сутки эксперимента.

Понижение активности ферментов нуклеинового обмена является косвенным указанием на ослабление биосинтетических и репарационных процессов в организме ослабленных болезнью рыб.

Как видно, обнаруженные колебания в активности ферментов подобны тем, что были выявлены у карпов. Изменения активности лизосомальных гидролаз при заражении ихтиофтириусом свидетельствуют о значительной их вовлеченности в развитие патологического процесса. Активация лизосомального аппарата может быть объяснена тем, что в защите клетки от внешних воздействий этим органеллам принадлежит важная роль, в частности, по захвату и обезвреживанию чужеродных частиц и токсинов (Машанский, 1965; Гуткин и др., 1984).

При поражении ихтиофтириусом происходят изменения и в углеводном обмене. Об этом свидетельствует снижение активности β -глюкозидазы и альдолазы к 6-му дню опыта, повышение к 8-му и опять снижение к 10-му. Интересно, что изменение уровня этих двух ферментов носит синхронный характер, хотя β -глюкозидаза локализована в лизосомах, а альдолаза является цитоплазматическим ферментом (Иешко и др., 1991).

Активация ферментов углеводного обмена происходит в начальный период заболевания, затем снижается и снова возрастает – к 8-м суткам от начала эксперимента. Такие колебания в интенсивности гликолиза отмечались и другими исследователями как ответная реакция на повреждающие факторы среды (Панин, 1978, 1983; Меерсон, 1981).

Следует обратить внимание на изменение активности фосфатаз в мышцах карасей в процессе патогенеза. Активность кислой фосфатазы растет в начальный период, а щелочной – вплоть до 8-х суток эксперимента падает. Одной из возможных причин, объясняющих этот факт, является увеличение содержания молочной кислоты в мышцах рыб, образующейся в результате активации гликолиза на первых этапах действия неблагоприятного фактора, в качестве которого в данном случае выступает возбудитель заболевания. Накапливающаяся молочная кислота вызывает сдвиг рН в кислую сторону, что создает благоприятную среду для действия кислых гидролаз, в том числе и кислой фосфатазы. В заключительный период эксперимента происходит резкий подъем активности как кислой, так и щелочной фосфатаз, то есть наблюдается активный гидролиз фосфорных соединений.

Сопоставляя динамику активности ферментов с фазами заражения и состояния паразита можно отметить, что выраженные адаптивные изменения биохимических показателей у зараженных рыб, по сравнению с незараженным контролем, происходили в начальный момент заражения и в период интенсивного роста паразита (Иешко и др., 1991). В начальный период активность некоторых ферментов подавлялась. Однако последующий рост прикрепившихся трофантов сопровождался нарастанием активности нуклеаз и фосфатазы. Именно в этот период в крови карпов при экспериментальном ихтиофтириозе отмечалось увеличение доли нейтрофилов, содержащих большое количество лизосомальных ферментов. Организм хозяина активно сопротивляется заражению.

Заметим, что уровень ответа рыб на заражение зависел от температуры среды. В проведенных опытах было установлено, что при сходных дозах заражения, средняя интенсивность инвазии рыб и размеры паразитов были выше при температуре 15°, чем при 20 °С.

Выявленный в данных экспериментах фазный характер изменения в функционировании ферментных систем (лизосомальной, энергетического и минерального обмена) совпадает с кривой изменения функций при стрессовых реакциях. Подобная картина метаболических изменений выявлена нами, как отмечено выше, и при воздействии таких повреждающих факторов, как экстремальные температуры, токсиканты и др. Полученные данные позволяют рассматривать реакцию хозяина на заражение паразитом как общий адаптивный синдром, при котором в качестве стрессора выступает паразитарный фактор. Аналогичной точки зрения придерживается Л.Я. Куровская (1998), изучавшая изменение биохимиче-

ских показателей у канального сома при заражении ихтиофтириусом. В этих исследованиях было показано, что глубина стрессовой реакции зависела от интенсивности инвазии.

Таким образом, ихтиофтириоз вызывает существенные сдвиги в метаболизме рыбы. Наблюдаются колебания защитных реакций лизосомального аппарата, снижение уровня гемоглобина, гидролиз фосфорных соединений, активация гликолиза на определенных этапах заболевания, все эти изменения являются характерными составляющими симптомокомплекса при неспецифическом адаптивном синдроме клетки (Браун, Моженок, 1987). Все сказанное позволяет заключить, что выявленные изменения биохимических показателей носят адаптивный характер, являются неспецифическим ответом организма рыбы на инвазию ихтиофтириуса. Приспособительные возможности хозяина, напряженность его иммунитета зависят как от индивидуальных особенностей рыбы, так и от условий окружающей среды.

Активность лизосомальных ферментов у карпа при аэромонозе. Большой ущерб в прудовых хозяйствах, выращивающих карпа, наносит инфекционное заболевание, возбудителем которого является бактерия *Aeromonas hydrophila* (Лукьяненко, 1989). Наиболее чувствительна к воздействию этого патогенного фактора молодь карповых после зимовки, именно в этот период наблюдается ее массовый отход.

Эксперимент по бактериальному заражению сеголетков карпа был поставлен на базе ВНПО по рыбоводству. Карпам внутримышечно вводили культуру *Aeromonas hydrophila* по 0,05 мл. Производили слабое (25 млн/мл) и сильное (250 млн/мл) заражение. Контрольным рыбам вводили по 0,05 мл бульона, на котором разводили культуру. Через 17 часов после начала эксперимента рыба начинала погибать, в этот момент живые экземпляры из каждого варианта были взяты на биохимический анализ. Для исследований брали печень, жабры, головной мозг, мышцы (со стороны, противоположной месту инъекции).

Прежде всего, следует отметить, что у карпов, подвергшихся бактериальному заражению, наблюдались внешние признаки заболевания: в месте инъекции – покраснение и припухлость, при слабом заражении все органы у рыб были покрыты кровавой слизью, а при сильном заражении отмечалось разложение внутренних органов.

Результаты изучения активности лизосомальных ферментов в разных органах сеголетков карпа при слабом и сильном заражении *Aeromonas hydrophila* выявили следующее. В основном, ак-

тивность большинства ферментов при бактериальном заражении повышается. Причем, чем сильнее заражение, тем выше уровень активности гидролаз. Особенно это выражено для основной лизосомальной протеиназы – катепсина D и ДНКазы. Та же тенденция прослеживается и в изменении фермента углеводного обмена- β -глюкозидазы, хотя повышение его активности не столь высокое, как названных выше энзимов. Активность кислой фосфатазы при слабом заражении мало отличается от контроля, а при сильном также повышается. Активность катепсина В у рыб в опыте в мышцах, жабрах и головном мозге немного снижается по сравнению с контролем, а РНКазная активность во всех органах зараженных карпов заметно угнетена (Высоцкая, Немова и др., 1985).

Изменение активности лизосомальных гидролаз при заражении культурой *Aeromonas* свидетельствует об активном участии их в развитии патологического процесса. Наблюдающийся в разных тканях зараженных карпов процесс лизиса происходит на фоне изменения активности исследуемых ферментов лизосом. Активация отдельных ферментов может быть объяснена тем, что этим органеллам принадлежит важная роль в защите клетки от внешних воздействий (Панченко, Эфрон, 1974; Askerman, Beele, 1974; Reynolds, Wills, 1974). Попавшие в организм бактерии захватываются лизосомами, в которых происходит их обезвреживание. Повышение активности протеолитического фермента лизосом-катепсина D, у зараженных карпов подтверждает их участие в этом процессе. Заметную активацию катепсина D при отсутствии таковой для катепсина В можно, по-видимому, объяснить тем, что именно катепсин D участвует в усилении спонтанной трансформации лимфоцитов в иммунном ответе, тогда как другие протеиназы не обладают подобными функциями (Баранова и др., 1980).

Следствием активизации лизосомального аппарата при воспалительных процессах может быть повышение уровня некоторых биологически активных веществ, таких, например, как простагландины (Anderson et al., 1971) и других медиаторов воспаления (гистамин, брадикинин, интерлейкины и др.) (Маянский А.Н., Маянский Д.Н., 1989; Абелев, 1996). Эти вещества в свою очередь оказывают регулирующее воздействие на развитие процесса, в том числе на миграцию в очаг воспаления большого числа новых моноцитов и нейтрофилов, а также активацию этих фагоцитирующих клеток.

Следует отметить, что бактерии *Aeromonas* обладают мощным литическим воздействием и довольно быстро размножают-

ся. Выявленный высокий уровень активности изученных гидролаз у зараженных карпов может быть отчасти объяснен и вкладом собственно бактерий.

Понижение уровня активности кислой РНКазы при бактериальном заражении служит косвенным доказательством снижения процессов биосинтеза белка. Особенно заметно падает уровень РНКазной активности в мышцах. Нарушение биосинтеза белка влечет за собой ослабление защитных сил организма и, в конечном счете, ведет к гибели рыбы.

Таким образом, проведенные эксперименты продемонстрировали, что при заражении молоди карпов бактериальной культурой *Aeromonas hydrophila* происходит резкая активация лизосомального аппарата, лизис и деградация всех структур не только в мышцах, но и в других органах.

Изменение некоторых биохимических показателей у молоди атлантического лосося при некрозе плавников. Заболевание молоди атлантического лосося (*Salmo salar* L.), называемое некрозом плавников, или плавниковой гнилью или язвенным некрозом кожи (ulcerative dermal necrosis, UDN) известно давно и встречается на рыбоводных заводах различных стран (Johansen, 1977; Richards, 1983; Burke, Grischkowsky, 1984). Заметим, что не все исследователи считают названные выше патологии лососевых вариантами проявления одной и той же болезни.

Причины заболевания не установлены, однако к возможным этиологическим факторам относят скученность рыбы в бассейнах, неполноценность искусственных кормов, низкое качество и несоответствующую температуру воды, а также стрессирующие воздействия, о которых мы уже говорили выше: транспортировка, пересаживание и т.п. (Ведемейер и др., 1981; Johansen, 1977; Schneider, Nicholson, 1980; Went, 1980; Johansen et al., 1982).

Основной симптомокомплекс заболевания характеризуется некротическим распадом плавников с последующим их отмиранием, образованием вокруг распадающихся плавников некротических язв, вторичным инфицированием перифокальной зоны и самой зоны распада вирусами, бактериями, грибами. Деструкция плавников приводит к резкому ухудшению жизнестойкости молоди, делает ее легкой добычей хищников после выпуска в реки. Несмотря на то, что на “воле” некроз практически полностью прекращается и отмечается даже некоторая регенерация разрушенных плавников, заболевание, в целом, приводит к резкому снижению возврата промыслового лосося. Все это указывает на важность исследования этиопатогенеза заболевания, однако его

Активность лизосомальных ферментов у молоди лосося при заболевании плавниковым некрозом (на 1 мг белка)

Орган	Вариант	КФаза	Глюкозидаза	ДНКаза	РНКаза	Катепсины	
						D	B
Мышцы	Контроль	0,43	0,032	0,12	0,22	0,18	0,04
	Некроз	0,47	0,034	0,14	0,25	0,18	0,05
Печень	Контроль	0,87	0,039	0,59	0,35	0,47	0,0
	Некроз	0,98	0,032	0,53	0,40	0,55	0,0
Селезенка	Контроль	0,67	0,063	0,36	0,20	0,01	0,11
	Некроз	0,79	0,063	0,40	0,23	0,18	0,03
Ости СП	Контроль	0,87	0,034	1,54	0,92	0,36	0,11
	Некроз	0,94	0,019	0,72	0,46	0,10	0,11
Опорный АСП	Контроль	0,55	0,220	0,52	0,17	0,0	0,15
	Некроз	0,77	0,320	0,61	0,29	0,0	0,15

Примечания. Сокращения: СП – спинные плавники, АСП – аппарат спинных плавников.

биохимические механизмы остаются практически неисследованными.

Нами изучена активность лизосомальных ферментов в различных органах, ферментов обмена циклических нуклеотидов в эритроцитах, альдолазы, фракционный состав гемоглобина у здоровых и больных плавниковым некрозом двух- и трехгодовиков лосося.

В печени и мышцах здоровых и больных рыб не обнаружено значительных различий по активности изученных ферментов лизосом. В селезенке пораженных рыб обращает на себя внимание резкое повышение уровня основной лизосомальной протеиназы – катепсина D, в то время как активность катепсина B в этом органе снижалась (табл. 45).

Непосредственно в пораженных болезнью спинных плавниках отмечена повышенная по сравнению с нормой активность фермента минерального обмена – фосфатазы – как в остях, так и в опорном аппарате плавников. Активность же других ферментов в остях плавников у больных рыб была ниже, а в опорном аппарате выше, чем у здоровых.

Исследование свободной и общей активности кислой фосфатазы в печени здоровых и больных плавниковым некрозом трехлеток лососей выявило значительное ее снижение у больных рыб (табл. 46).

Активность кислой фосфатазы в печени здоровых и больных плавниковым некрозом трехлеток лосося (на 1 г сырого веса ткани)

Вариант	Активность фермента	M±m	n
Контроль	Свободная	3,347±0,143	12
	Общая	3,515±0,075	11
Больные	Свободная	2,538±0,103	12
	Общая	2,918±0,015	11

Таким образом, приведенные результаты показали, что лизосомы, которым принадлежит важная роль в уничтожении болезнетворных микроорганизмов (Гуткин и др., 1984; Фрейдлин, 1996), наиболее активны в очаге патологического процесса – спинных плавниках и в органе, ответственном за иммунобиологические реакции – селезенке.

Учитывая существующее представление о генерализованных однонаправленных изменениях клеточных мембран при различных патологиях, проводили исследование мембраностроенных ферментов, таких как аденилатциклаза и гуанилатциклаза (при одновременном определении активности ферментов деградации циклических нуклеотидов – соответствующих фосфодиэстераз) в эритроцитах лососей при некрозе плавников, предполагая, что подобной будет реакция и других мембранных структур клетки на данную патологию.

Так как известно, что при различного рода повреждающих и токсических воздействиях изменяются физико-химические свойства многих белков, в том числе изоферментный спектр и формы гемоглобина (Лукьяненко и др., 1991; Грубинко и др., 1995), в дополнение к сказанному представляло интерес изучить фракционный состав гемоглобина.

Работа выполнена совместно с сотрудником Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова А.В. Третьяковым. Объектом исследования были двухгодовики лосося, выращенные на Шуйском, Кемском и Выгском рыбозаводах Карелии.

Усредненные результаты опытов по изучению активности циклазных систем при некрозе плавников приведены в табл. 47.

Как следует из представленных данных, при заболевании отмечается выраженное изменение активности ферментов синтеза и распада циклонуклеотидов. При этом наблюдалась корреляция между выраженностью заболевания и степенью изменения ак-

Таблица 47

Активность ферментов обмена цАМФ в эритроцитах здоровых и больных некрозом плавников лососей (пмоль превращенного радиоактивного субстрата/1 мг белка/1 мин)

Объект исследования	Ферменты		n
	Аденилатциклаза	Фосфодиэстераза цАМФ	
Здоровые рыбы	0,05	2,5	76
Больные рыбы	0,25*	1,2*	74

Примечание *. – Различия достоверны для $p \leq 0,05$.

тивности некоторых изучавшихся ферментов. Если в ряду рыбо-заводов Шуйский – Кемский – Выгский степень поражения плавников убывала, то в этом же направлении уменьшалась активность фосфодиэстеразы цАМФ. Активность же аденилатциклазы была увеличена у больной молодежи лосося на всех трех заводах в одинаковых пределах. Несколько меньше, но также возрастала активность гуанилатциклазы и соответствующей фосфодиэстеразы.

Интенсивность гликолиза снижалась, о чем свидетельствовало падение альдолазной активности, вызванное, вероятно, снижением уровня глюкозы в крови больных рыб.

При изучении фракционного состава гемоглобина здоровой и больной рыбы были выявлены значительные различия. Однонаправленные данные при этом были получены двумя независимыми методами: электрофорезом и ионообменной хроматографией (Третьяков и др., 1988). На электрофореграммах гемолизатов выявляются четыре основные фракции, отличающиеся анодной подвижностью. Основное различие между двумя сравниваемыми группами – перераспределение белка между тремя медленными фракциями (II, III, IV) – с одной стороны, и быстрой (I) – с другой. В гемоглобине больных рыб относительное количество медленных фракций уменьшено, а количество белка в наиболее подвижной фракции увеличено по сравнению с контролем. По данным ионообменной хроматографии гемоглобина у больных лососей при увеличении доли катионных фракций гемоглобина (0,005 M NaCl) возрастает содержание фракции белка, смываемого с колонки 0,5 M раствором NaCl. Таким образом, при помощи двух методов получены доказательства, что у больных рыб физико-химические свойства гемоглобина изменены. Однако вопрос о том, чем обусловлены выявленные изменения, – сменой популя-

ции эритроцитов, модификацией гемоглобина в эритроцитах циркулирующей крови или другими причинами, требует дальнейшего изучения.

Сравнивая полученные данные с имеющимися в литературе, можно заключить, что подобные изменения происходят у животных под влиянием многих других альтерирующих воздействий, таких, например, как гамма-облучение и гепатотропные яды, поэтому некроз плавников следует признать генерализованным заболеванием, при котором имеет место глубокая перестройка жизненно важных биохимических систем, выполняющих защитные и регуляторные функции.

Изменение активности некоторых ферментов у заводской молодежи семги при заболевании катарактой. У выращиваемой на рыбоводных заводах молодежи семги возникает такое мало изученное заболевание, как катаракта (помутнение хрусталика, “белоглазка”). Болезнь так же, как некроз плавников, ведет к ослаблению и гибели рыб.

Причины развития заболевания у рыб до сих пор детально не выяснены. Предполагается, что основным фактором, вызывающим патологию, является алиментарный. Известно, что катаракта у высших млекопитающих и человека может возникать в результате неполноценного питания, нарушений в углеводном обмене (сахарный диабет, галактоземия), отдельных гормональных недостаточностях, при отравлениях некоторыми лекарственными препаратами и токсикантами, воздействии ионизирующего облучения и т.д. (Уайт и др., 1981; Формазюк, 1993).

Учитывая важное значение лизосом для нормального функционирования таких специализированных тканей глаза, как сетчатка, роговица и хрусталик (Касавина и др., 1972; Покровский, Тутельян, 1976), а также особенности энергетического обеспечения метаболизма в хрусталике, для которого характерен в первую очередь гликолиз, именно этим двум ферментным системам – лизосомальной и энергетической – мы уделяли внимание в нашей работе.

Материал для исследований брали весной и осенью на Кемском и Сосновецком рыбозаводах. Для биохимического анализа использовали мышцы, печень и хрусталик глаза от здоровых и больных двухгодовалых семги.

У больной молодежи рыб в печени и мышцах активность лизосомальных ферментов, как правило, была несколько ниже, чем у здоровой (табл. 48). В печени отмечен более низкий уровень и других изученных ферментов. На основании получен-

Активность некоторых ферментов у молоди семги при заболевании катарактой (на 1 мг белка)

Фермент	Мышцы		Печень		Хрусталик	
	Здоровые	Больные	Здоровые	Больные	Здоровые	Больные
КФаза	0,08	0,06	0,09	0,07	0,012	0,013
ЩФаза	0,05	0,03	0,05	0,03	0,003	0,011
ДНКаза	0,16	0,18	0,22	0,15	0,012	0,010
РНКаза	0,24	0,25	0,39	0,26	0,03	0,12
Глюкозидаза	0,014	0,009	0,027	0,016	0,002	0,004
Альдолаза	21,58	23,67	1,56	0,99	0,55	0,38

ных данных можно сделать вывод об угнетении у больной семги в печени и мышцах фосфорного обмена. То же самое можно сказать о нуклеиновом и углеводном обмене в этом органе. В мышцах выявленные изменения активности катаболических ферментов имели ту же направленность, но были выражены не так ярко. Несколько иная картина была характерна для метаболизма в тканях глаза – органа, пораженного при данной патологии. В хрусталике больной молоди отмечалось заметное снижение активности гликолитического фермента – альдолазы, в то время как катаболические ферменты все были более активны, чем у здоровых рыб.

Так как характер питания оказывает существенное влияние на метаболизм организма и может быть причиной возникновения патологий, проводилось его сравнительное изучение при разных вариантах кормления. В табл. 49 представлены результаты этих исследований по трем вариантам: I и II – здоровая молодь семги, получавшая разные корма. В I варианте – улучшенный корм, содержащий печень, селезенку, рыбий жир, снетки, рыбную муку; во II варианте – гранулированный корм. В III варианте – больная молодь, получавшая гранулированный корм.

Анализ полученных данных говорит о том, что различия между здоровыми рыбами, находившимися на разных рационах, часто более значительны, чем между здоровыми и больными, получавшими одинаковый корм. В целом, осенью у больной молоди семги, как и весной (см. табл. 48) в печени наблюдался пониженный уровень гидролитических ферментов, а в хрусталике повышалась активность кислой фосфатазы, нуклеаз и гиалуронидазы. Следует указать, что активность последнего фермента у больных рыб была повышена и в других изученных органах.

Активность лизосомальных ферментов у здоровой и больной молоди семги при разных вариантах кормления (на 1 мг белка)

Фермент	Мышцы			Печень			Хрусталик		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
КФаза	0,06	0,02	0,09	0,06	0,11	0,04	0,01	0,006	0,017
ДНКаза	0,14	0,08	0,12	0,22	0,19	0,20	–	0,02	0,05
РНКаза	0,22	0,18	0,31	0,44	0,60	0,30	–	0,04	0,10
β-глюкозидаза	0,006	0,002	0,007	0,010	0,029	0,012	0,0	0,0	–
Гиалуронидаза	0,028	0,032	0,048	0,022	0,024	0,034	0,008	0,007	0,011

Примечание. Сравнимые варианты: I – здоровая рыба, улучшенный корм; II – здоровая рыба, гранулированный корм; III – больная рыба, гранулированный корм.

Наблюдающееся при заболевании катарактой снижение активности неспецифических фосфомоноэстераз – кислой и щелочной фосфатаз – ферментов, выполняющих регуляторную функцию в поддержании фосфорного баланса, синтезе богатых энергией соединений (Kuo, Blumenthal, 1961), наряду со снижением активности альдолазы свидетельствует об угнетении энергетического обмена, что, несомненно, является негативным моментом. Дело в том, что в хрусталике глаза, вследствие недостаточного снабжения его кислородом, весьма своеобразен энергетический обмен. В норме обеспечение энергией в этой ткани происходит за счет гликолиза и фосфоглюконатного пути окисления. В хрусталике накапливаются богатые энергией фосфатные соединения, предполагается, что аккумулированная в них энергия необходима для стабилизации структуры. Следовательно, факторы, ведущие к нарушениям углеводного и фосфорного обмена, могут быть причиной, способствующей развитию катаракты.

Так как лизосомальная ферментная система играет важную роль в защите клетки от влияния разнообразных неблагоприятных факторов, пониженный уровень кислых гидролаз в печени и мышцах больных рыб свидетельствует о снижении сопротивляемости всего организма подобного рода воздействиям. Недостаточное количество лизосомальных ферментов, осуществляющих расщепление разнообразных макромолекул в клетке ведет к нарушению сбалансированности процессов анаболизма и катаболизма, в результате чего возникают аномалии метаболизма (такие, например, как накопление избыточных количеств биополимеров в клет-

ке), последние в свою очередь могут явиться причиной заболевания. В частности, в хрусталике глаза содержатся белки α -, β - и γ -кристаллины, на долю γ -кристаллина приходится до 75% суммарного белка (Уайт и др., 1981). В результате изменения активности гидролитических ферментов, в том числе и протеиназ, происходит накопление и агрегация измененных белков, а агрегация кристаллина приводит к развитию помутнения хрусталика.

Особое внимание следует обратить на несколько выделяющееся из общей картины изменение активности одной из кислых гликозидаз, а именно гиалуронидазы. Субстратом этого фермента в природе является гиалуроновая кислота, представляющая собой гетерополисахарид, состоящий из N-ацетил- β -D-глюкозамина и β -D-глюкуроновой кислоты. Данный полисахарид интересен тем, что он составляет важнейшую часть межклеточного вещества таких тканей, как кожа, сухожилия, стекловидное тело глаза, принимает участие в регуляции поступления воды и веществ в клетку, облегчает миграцию клеток во время морфогенеза и регенерации тканей, играет роль смазки в синовиальной (суставной) жидкости (Тооле, 1981; Laurent, Fraser, 1986). Активация гиалуронидазы в тканях больной семги, в том числе и в глазах, ведет к расщеплению гиалуроновой кислоты. Система гиалуронидаза – гиалуроновая кислота весьма чувствительна к действию гормонов, в частности, кортикостероидов (Касавина и др., 1972), содержание которых, как известно, резко изменяется в стрессовых ситуациях. Все вышесказанное позволяет предположить, что одной из возможных причин, вызывающих патологию, может быть нарушение гормонального баланса организма. Дальнейший поиск по обсуждаемому вопросу, думается, надо вести в области взаимосвязей обмена углеводов, протеогликанов и гормональных эффектов.

Таким образом, было выяснено, что при заболевании катарактой у молоди семги понижается уровень активности большинства лизосомальных ферментов в печени и мышцах, что свидетельствует о снижении защитных сил организма. Об этом же говорят наблюдающиеся изменения в системе гиалуронидаза – гиалуроновая кислота. Во всех изученных органах возрастает активность гиалуронидазы, что влечет за собой снижение количества гиалурононовой кислоты, вещества, участвующего в образовании протеогликановых агрегатов, выполняющих роль молекулярных сит.

Наиболее значительные изменения в активности ферментных систем отмечены в хрусталике глаза. В отличие от мышц и печени уровень лизосомальных гидролаз в хрусталике больных рыб был выше, а гликолитических ниже, чем у здоровых.

Изменение активности некоторых ферментов у осетровых при расслоении мышечной ткани. Негативные последствия антропогенного воздействия на природу стали особенно очевидны в последние годы. Одним из ярких примеров, подтверждающих значительное ухудшение условий существования гидробионтов, является обнаруженная в конце 80-х годов у осетровых быстро прогрессирующая патология, характеризующаяся расслоением мышц и уменьшением прочности оболочек икры. Механизмы возникновения этих аномалий неизвестны. В основе наблюдающихся процессов распада мышечных структур может лежать усиление гидролиза различного типа макромолекул, что позволило предположить участие в данных событиях лизосомальных гидролаз, являющихся основными и неизменными участниками каталитических реакций в клетке.

Проведено сравнительное изучение функционального состояния ферментной системы лизосом и некоторых других ферментов у осетров и стерляди в норме и при расслоении мышц. Материал для исследований был получен во время научно-исследовательской экспедиции, организованной Институтом биологии внутренних вод АН СССР, летом 1988–1989 годов. Рыбу отлавливали в районе нижнего бьефа Волгоградской ГЭС и в дельте Волги (тоня Чкаловская). Охлажденные навески тканей (мышцы, печень, селезенка, икра, почки, жабры) от здоровых и больных рыб в термосах с сухим льдом или в сосудах Дьюара с жидким азотом доставляли в лабораторию для дальнейшего биохимического анализа.

Результаты исследований показали, что у рыб с явно выраженными признаками заболевания активность изученных ферментов заметно отличалась от соответствующих показателей у практически здоровых особей. В табл. 50 представлены данные по изменению этих показателей у осетров, полученные летом 1988 года. Обращает на себя внимание тот факт, что в таких органах, как печень, селезенка, почки активность изученных ферментов у больных рыб на 15–25% снижена по сравнению с нормой. Исходя из представлений о том, что лизосомы выполняют существенную роль в механизмах клеточной защиты, можно сделать вывод, что у осетров при данной патологии защитные и приспособительные возможности организма ослаблены.

Как уже упоминалось, внешне при изучаемой патологии наиболее заметны изменения в мышцах и икре. Что же показывают данные биохимического анализа в этих органах? Если активность кислой фосфатазы в мышцах мало отличается от нормы, то в икре и жабрах она значительно повышена. Активность ли-

Активность ферментов в разных органах осетра в норме и при заболевании расслоением мышц
(на 1 мг белка/мин при 30 °С, n = 5-9)

Орган	Вариант	К фаза	Глюкозидаза	ДНКаза	РНКаза	Щ фаза	Альдолаза
Печень	норма	1,39±0,12	0,19±0,02	1,13±0,08	0,62±0,07	0,67±0,04	2,5±0,41
	болезнь ΔА, %	1,06±0,09 -24	0,14±0,01 -26	1,02±0,11 -10	0,53±0,03 -15	0,39±0,03 -42	5,0±0,50 +100
Селезенка	норма	2,68±0,37	0,10±0,02	1,13±0,20	0,78±0,06	0,32±0,05	0,82±0,17
	болезнь ΔА, %	2,00±0,24 -25	0,08±0,02 -20	0,92±0,13 -19	0,60±0,12 -25	0,39±0,10 +22	0,95±0,26 +16
Почки	норма	1,41±0,13	0,08±0,01	1,11±0,12	0,69±0,03	2,23±0,26	1,19±0,20
	болезнь ΔА, %	1,10±0,09 -22	0,06±0,03 -25	0,88±0,07 -21	0,57±0,09 -18	1,67±0,22 -25	0,74±0,14 -38
Икра	норма	0,93±0,12	0,33±0,08	0,61±0,08	0,36±0,09	0,36±0,06	4,47±0,62
	болезнь ΔА, %	1,20±0,12 +29	0,34±0,07 +3	0,48±0,10 -22	0,36±0,05 0	0,62±0,05 +72	1,92±0,20 -57
Мышцы	норма	0,51±0,11	0,17±0,03	0,17±0,04	0,21±0,02	0,15±0,04	52,3±6,8
	болезнь ΔА, %	0,57±0,08 +12	0,11±0,03 -36	0,13±0,03 -24	0,23±0,02 +10	0,13±0,02 -15	38,1±4,1 -27
Жабры	норма	0,48±0,03	0,04±0,00	0,82±0,08	0,39±0,02	0,69±0,04	2,15±0,19
	болезнь ΔА, %	0,80±0,05 +67	0,04±0,01 0	0,65±0,04 -21	0,46±0,07 +18	0,29±0,06 -58	0,72±0,09 -67

Примечание. ΔА – изменение активности фермента при заболевании по сравнению с нормой.

зосомальной β-глюкозидазы, фермента, расщепляющего такие природные субстраты, как гликолипиды (глюкозилцерамид, глюкозилсфингозин, стероидные β-глюкозиды) во всех органах значительно снижена. Нуклеазы также менее активны.

Можно предположить, что наблюдающееся понижение уровня лизосомальных ферментов является следствием активной работы лизосом в предшествующий период.

Следует обратить внимание на повышенный уровень активности обеих фосфатаз: кислой, связанной с лизосомами, и щелочной – цитоплазматического фермента, в икре больных осетров. Эти ферменты отщепляют фосфат от органических эфирных соединений, регулируют уровень фосфора в организме и, как уже подчеркивалось, принимают участие в энергетическом обмене (Диксон, Уэбб, 1982). Полученные результаты свидетельствуют об активном катаболизме фосфорных соединений (таких как креатинфосфат, фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин и др.) в икре и селезенке.

Судя по снижению активности альдолазы, гликолиз практически во всех тканях у больных осетров был угнетен. Небольшая его активация отмечена в селезенке и в печени.

Интересно, что для стерляди, в том же 1988 году, получены несколько отличающиеся результаты (табл. 51), хотя они также подтверждают участие лизосом в патогенезе "расслоения". Как и у осетра, наиболее заметны сдвиги в функционировании изученных ферментных систем в мышцах, печени, икре. Однако у стерляди эти изменения в активности ферментов имеют противоположный знак, то есть там, где у осетра наблюдалось снижение активности, у стерляди зарегистрировано повышение. Так, β-глюкозидаза в мышцах, печени, икре в 2-3 раза превышала контрольный уровень. В других органах она также была более активной. Заметно возрастает при заболевании активность всех изученных ферментов в белых скелетных мышцах. Следует отметить, что здесь нет никакого противоречия. Это как раз подтверждает обсуждавшееся выше положение о фазности функционирования лизосомальной системы. В процессе развития патологии происходит адаптивный всплеск общей активности лизосомальных ферментов. Затем лизосомы вовлекаются в процессы внутриклеточного катаболизма, наблюдается снижение активности кислых гидролаз (Гуткин и др., 1984), наступает стадия истощения.

Сравнение ферментативного профиля двух видов осетровых показывает, что у стерляди в момент взятия проб на анализ лизосомальный аппарат находился в стадии активного функционирования, тогда как у осетра – истощения. Однако и у стерляди про-

Активность ферментов в разных органах стерляди в норме и при заболевании расслоением мышц (на 1 мг белка/мин при 30 °С, n = 6-18)

Орган	Вариант	К фаза	Глюкозидаза	ДНКаза	РНКаза	Щ фаза	Альдолаза
Печень	норма	0,99±0,07	0,12±0,03	0,80±0,08	0,31±0,09	1,41±0,15	3,67±0,21
	болезнь ΔА, %	1,46±0,19 +48	0,36±0,05 +200	0,69±0,04 -14	0,37±0,06 +20	2,18±0,19 +55	4,10±0,80 +12
Селезенка	норма	2,01±0,16	0,06±0,00	0,72±0,08	0,45±0,09	3,26±0,49	0,32±0,06
	болезнь ΔА, %	2,00±0,04 0	0,08±0,01 +33	0,63±0,09 -13	0,45±0,11 0	3,16±0,60 -3	0,64±0,08 +100
Почки	норма	1,23±0,35	0,08±0,02	1,19±0,15	0,89±0,09	4,45±0,68	0,73±0,05
	болезнь ΔА, %	1,11±0,13 -9	0,13±0,01 +63	0,73±0,05 -39	0,43±0,03 -52	4,86±0,41 +9	0,79±0,09 +8
Икра	норма	0,64±0,04	0,32±0,10	0,25±0,02	0,23±0,04	0,65±0,04	1,28±0,08
	болезнь ΔА, %	0,85±0,04 +33	0,69±0,03 +116	0,19±0,01 -24	0,14±0,01 -39	0,95±0,05 +46	1,66±0,14 +30
Мышцы	норма	0,31±0,04	0,11±0,02	0,11±0,02	0,19±0,01	0,18±0,02	28,5±4,3
	болезнь ΔА, %	0,70±0,06 +126	0,31±0,05 +182	0,16±0,03 +46	0,22±0,02 +6	0,38±0,04 +111	31,1±2,8 +9
Жабры	норма	0,55±0,08	0,06±0,01	0,79±0,18	0,45±0,03	2,56±0,69	0,92±0,11
	болезнь ΔА, %	0,45±0,05 -18	0,08±0,01 +33	0,58±0,05 -27	0,30±0,04 -34	2,27±0,35 -11	2,09±0,17 +127

Изменение активности ферментов (ΔА) в разных органах осетра при заболевании расслоением мышц (III стадия болезни, в % к норме; n = 7(19))

Орган	КФаза	Глюкозидаза	ДНКаза	РНКаза	Гиалуронидаза	ЩФаза	Альдолаза
Печень	+190	0	-8	0		+13	+52
Почки	+11	0	+23	+50		+21	-20
Икра	-17	-14	0	0	-29	+8	-30
Мышцы белые	+100	+36	+9	+40	+75	+30	+61
Мышцы красные	0	+25	-16	-25	+1025	0	+39
Жабры	+125	0	+57	+67		+200	+14

цессы синтеза почти во всех тканях больных рыб угнетены, о чем говорит более низкая активность нуклеаз.

Также активно происходит гидролиз фосфорных соединений в мышцах, печени, икре, значительно повышена активность кислот и щелочной фосфатаз в этих органах. Кроме того, у стерляди наблюдалась активация ферментов гликолиза. Этот момент обсудим позже.

Несколько неожиданными, правда, на первый взгляд, оказались нам результаты, полученные для осетров в 1989 году (табл. 52). Наблюдались более сильные различия между нормой и патологией. При более слабом поражении (III стадия болезни) активность многих лизосомальных ферментов в большинстве тканей повышалась, в то время как в 1988 году при более сильном поражении мышц (IV стадия "расслоения") снижалась. Это связано с известной функцией лизосом по нейтрализации альтерирующих воздействий на начальных фазах стрессовой реакции организма.

Особого внимания заслуживают данные по значительному увеличению активности гиалуронидазы в мышцах. Этот фермент участвует в расщеплении гиалуроновой кислоты, входящей в состав протеогликанов, которые в свою очередь являются компонентом, склеивающим мышечные клетки. Предполагается (Сидоров и др., 1990; Субботкина, 1990), что наряду с коллагеном протеогликанов могут быть мишенью гидролаз в процессе развития данной патологии; то есть коллаген, протеогликанов и расщепляющие их гидролазы являются основными действующими веществами в патогенезе заболевания. Эти данные позволяют наметить направление дальнейшего изучения биохимических механизмов развития заболевания и причин его вызывающих.

По сравнению с 1988 годом в 1989-ом у осетров наблюдалась активация ферментов углеводного обмена (β -глюкозидаза, альдолаза). Это также коррелирует с активизацией энергетического обмена на первых фазах стрессовой реакции у животных. Кроме того, известно, что для формирования и функционирования лизосомального аппарата необходима энергия, а мы уже отмечали, что в обсуждаемых ситуациях функции этих органелл активизируются.

Обращает на себя внимание повышенный уровень активности большинства изученных ферментов в жабрах. Интересно, что и активность ферментов нуклеинового обмена в этом органе превышает контрольный уровень. Этот факт объясняется тем, что жабры контактируют с растворенными в воде веществами, легко проницаемы для них. Повышенная активность ферментов в этом органе – ответ на воздействие токсикантов.

Изучение протеолитической активности у осетров показало, изменение ее уровня в разных органах при заболевании было разнонаправленным. Так, активность катепсина В в мышцах практически не изменялась, в других органах несколько увеличивалась. Активность же катепсина D, основной лизосомальной протеиназы, в жаберном эпителии снижалась в 8 раз, а в мышцах возрастала в 2 раза по сравнению со здоровыми осетрами. Наряду с этим, активность Ca^{2+} -зависимых нейтральных протеиназ, являющихся одним из основных ферментов нелизосомального протеолиза, изменялась при данном заболевании осетров весьма существенно. Активность кальпаинов увеличивалась во всех изученных органах у больных рыб. При этом соотношение активности кальпаина I и кальпаина II изменялось в сторону увеличения последнего (Немова, 1992). Возможно, это связано с развитием болезни, так как известно, что первый фермент активен в физиологических условиях, а второй – при патологиях. Увеличение активности кальпаинов в пораженных мышцах следует, видимо, связать с усилением протеолиза миофибриллярных белков. Показано, что при миодистрофии увеличивается содержание внутриклеточного Ca^{2+} , который активирует кальпаины, инициирующие миофибриллярную деградацию (Dayton et al., 1976). Кальпаины разрушают белки миофибрилл на фрагменты, которые поглощаются лизосомами и в них подвергаются дальнейшему расщеплению с участием катепсинов.

Таким образом, выявленные изменения в метаболизме больных рыб, такие как активация, а затем снижение активности лизосомальных ферментов, гидролиз белков и фосфорных эфиров, снижение биосинтетических процессов, увеличение роли глико-

лиза в энергообеспечении представляют собой симптомы неспецифического адаптационного синдрома, то есть указывают на то, что осетровые находятся в стрессированном состоянии.

Характер изменения активности изученных ферментов в таких органах, как жабры, почки, печень позволяют сделать предположение о том, что одной из возможных причин заболевания является загрязнение воды токсикантами. Этот наш вывод находится в полном соответствии с диагнозом, который был поставлен по совокупности биологических, морфологических и биохимических показателей, полученных при изучении данного заболевания осетровых – кумулятивный политоксикоз с многосистемным поражением (Лукьяненко, 1990).

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что практически при всех патологиях реакция организма на раздражитель может быть охарактеризована как общий адаптационный синдром. Следует отметить два момента. Во-первых, лизосомальные и другие исследованные ферменты у животных с различной патологией – это весьма чувствительные биохимические показатели, позволяющие диагностировать состояние предпатологии еще до наступления видимых признаков заболевания. Во-вторых, при всей стереотипности наблюдающейся картины в адаптивных реакциях, вызванных разными стресс-факторами, выявляются тонкие различия, определяемые таксономическим положением рыб, их физиологическим состоянием, силой воздействующего патогена (интенсивностью инвазии), функциональными и метаболическими особенностями страдающего при патологии органа. Иными словами, у каждого стресса – свое лицо. Специфичность реакции отражается в динамике активности отдельных ферментных систем, причем качественные различия могут быть выявлены лишь на начальных фазах лизосомальной реакции. В любом случае лизосомам принадлежит важная роль в ответе организма на повреждающие воздействия. В результате активации лизосомальных ферментов в местах повреждения повышается уровень биологически активных веществ (медиаторов воспаления), оказывающих регулирующее воздействие на развитие процесса, в том числе и на миграцию в очаг воспаления новых фагоцитирующих клеток, содержащих большие количества лизосомальных гидролаз.

Изложенные в данной главе материалы, позволяют заключить, что у рыб, как и у других позвоночных, реакция на различные по природе факторы является неспецифической и характеризуется значительной перестройкой метаболизма, в которую вовлекаются многие ферментные системы, в том числе лизосо-

мальная. Характер адаптивных метаболических изменений отражает динамику приспособительной реакции, а также особенности функционирования самих лизосом. Определенный отпечаток накладывает природа действующего фактора.

Учитывая высокую чувствительность лизосомального аппарата к изменению экологической обстановки, загрязнению окружающей среды, воздействию различных патогенов, предлагается использовать определение активности лизосомальных ферментов в комплексе с другими показателями в системе эколого-биохимического мониторинга и тестирования природных сред, для оценки состояния гидробионтов, при регламентации антропогенной нагрузки на водоемы.

Глава 3

БИОХИМИЧЕСКИЙ ИНТЕГРАЛЬНЫЙ ИНДЕКС – БИИ

При интерпретации разнообразных биохимических данных, полученных при изучении влияния различных экологических факторов, и особенно разного рода химических загрязнений, мы столкнулись с необходимостью суммарной оценки биохимической реакции организма на эти воздействия. Большое разнообразие в характере изменений индивидуальных биохимических показателей в зависимости от действия разных концентраций токсиканта (или другого фактора) и в процессе длительного действия сублетальных концентраций токсиканта (постепенное уменьшение или увеличение, резкое увеличение или уменьшение с последующим возвращением к норме, неоднократное и в разное время и в разной последовательности изменение величины эффекта и т.д.) затрудняет однозначную оценку степени, интенсивности и опасности для организма происходящих процессов. Особенно трудно использовать эти данные при определении ПДК (предельно-допустимых концентраций веществ). Изменение каждого биохимического параметра при разных концентрациях токсикантов контролируется столь многочисленными факторами, в свою очередь варьирующими в разной степени под действием различных веществ, что ожидать прямолинейной зависимости отдельных биохимических компонентов было бы нереальным. Поэтому необходимо было найти какую-то единую интегральную величину, усредняющую наблюдаемое разнообразие ответов организма на уровне индивидуальных биохимических показателей и коррелирующую с дозой токсиканта.

Чтобы решить эту задачу, надо было выбрать для изучения достаточно широкий, связанный с различными типами обмена веществ, набор биохимических показателей, который позволил бы выявить постоянно расширяющийся за счет вновь вовлекаемых в ответную реакцию на действие токсиканта круг биохимических компонентов. Кроме этого, было необходимо

определить для каждого биохимического показателя нормальные пределы вариабельности, за которыми начинается зона патологии.

В результате наших многолетних исследований по вариабельности разнообразных биохимических компонентов под влиянием экологических факторов было показано (Сидоров, 1983; Немова, 1992; 1996; Высоцкая и др., 1994; Высоцкая, 1999; Крепс, 1981; Сидоров и др., 1981; Сидоров, 1983), что по степени изменчивости все показатели условно можно разделить на 2 группы: более изменчивые, адекватно реагирующие на действующие факторы, и менее изменчивые, заметно меняющие свою концентрацию или активность лишь при сильной патологии или экстремальных воздействиях факторов внешней среды. В первую группу входят хорошо изученные нами (в плане экологической вариабельности) лизосомальные ферменты, ТАГ (триацилглицерины) и ЭХ (эфирные холестерина). Ко второй группе относятся: соотношение фосфолипидов в биомембранах и тканях, коллагеновый оксипролин, суммарный белок. Кроме того, мы выделяем еще и некую *промежуточную группу* – жирные кислоты, желчные кислоты, холестерин, ферменты углеводного и энергетического обмена, каталазу, МДА (малоновый диальдегид).

Схема

Распределение биохимических показателей на группы по степени их изменчивости (минимальный набор – 10–15 показателей, оптимальный набор от 35–45 до 150–200 показателей, в 4–7 органах)

I группа –75%--- +150%	Промежуточная группа –50%---- +100%	II группа –15%---- +25%
Лизосомальные ферменты, каталаза, пероксидаза, щелочная фосфатаза, кальпайны, запасные липиды (ТАГ и ЭХ) и др.	МДА, свободные жирные кислоты, производные КоА – запасных и мембранных липидов, ферменты углеводного и энергетического обмена, оксипролин, желчные кислоты и др.	Нуклеиновые кислоты, гистоны, фосфолипидные соотношения, общий белок, соотношение мембранных белков и пептидов и др.

Интересно отметить, что для первой группы веществ характерна и более широкая филогенетическая вариабельность, обнаруживаемая уже при сравнении родов, семейств, а иногда и видов, в то время как для второй группы веществ филогене-

тическая изменчивость становится явной лишь на уровне классов (Сидоров, 1986). Недавно было обнаружено, что и гены, определяющие фенотипическое проявление биохимических признаков первой категории, более изменчивы, чем гены, связанные со второй и третьей группой веществ (Сойфер, 2000). Это соответствует более ранним данным о скоростях изменения аминокислотной последовательности в различных белках в процессе эволюции. Единица эволюционного времени (среднее время, необходимое для того, чтобы в данном белке на каждые 100 аминокислот могла появиться одна приемлемая аминокислотная замена) для фибринопептида составляет 0,7 млн лет, для гемоглобина 5 млн лет, а некоторые белки, определяющие глубинные основы обмена веществ, изменяются в процессе эволюции еще медленнее. Так, единица эволюционного времени для цитохрома “с” составляет 21, а для гистона H4, входящего в нуклеопротеины ядра клетки, – 500 млн лет (Албертс и др., 1994).

Таким образом, основываясь на вышеприведенной оценке степени отклонения от естественных (контрольных) значений вариабельности изученных нами биохимических показателей и признаков во всех экспериментальных вариантах, мы в каждом из них определяли число показателей, близких к крайним границам вариабельности, или даже выходящих за эти границы и выражали это количество в процентах к общему количеству изученных показателей. Эту величину мы назвали Биохимическим интегральным индексом (БИИ) или биохимическим индексом стресса, так как она отражает развитие стресса на биохимическом уровне в организме под влиянием экстремальных факторов (Сидоров и др., 2001; Сидоров и др., 2003).

Вычисление такого индекса оказалось очень полезным при определении ПДК, когда важна суммарная оценка биохимических изменений в организме, а также при выявлении механизмов и степени биохимических адаптационных перестроек при хроническом действии на него негативных факторов. Величина БИИ зависит от вида и возраста рыб, а также от токсичности загрязнителя водоема. Далее, на двух примерах рассмотрим, каким образом мы рассчитывали этот индекс, и какую информацию он позволяет получить при проведении токсикологических исследований.

3.1. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕХНОГЕННЫХ ВОД ГОРНООБОГАТИТЕЛЬНОГО КОМБИНАТА (ГОКа) НА БИОХИМИЧЕСКИЙ СТАТУС ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ

Использование БИИ было продемонстрировано при оценке реакции рыб на химическое загрязнение воды отходами горнообогатительного производства (г. Костомукша, Республика Карелия), характеризующейся сильной минерализацией (в 16 раз выше нормы), увеличением концентрации ионов калия, гидрокарбонатов, сдвигом рН в щелочную сторону (Сидоров и др., 2002). Качество воды Костомукшского хвостохранилища значительно изменилось за последний 21 год (1979–2000 гг.) по сравнению с исходным озером Костомукшским (Дубровина и др., 1995; Кухарев и др., 1995; Калинин и др., 2003). Из ихтиофауны в хвостохранилище были обнаружены только плотва, щука и уклейка. Было показано, что в кислых слабоминерализованных озерах Севера (в том числе и в Карелии) с рН воды, равной 5,0–5,6, встречается практически один речной окунь, а остальные виды рыб погибают (Структура и функционирование..., 1994; Кашулин и др., 1999; Кашулин, 2000). Возможно, в отличие от плотвы и щуки, окунь, устойчивый к среде с низкой кислотностью, не толерантен к водам с более высокими значениями этого показателя (рН 8,4). Как бы там ни было, но исчезновение многих других видов рыб в хвостохранилище, ранее обитавших в озере Костомукшское (ряпушка, сига, окунь, лещ, хариус, язь, налим) требует специального рассмотрения и объяснения на основе проведения соответствующих полевых и аквариальных экспериментов.

В работе использовали личинок сига (*Coregonus lavaretus* L.), личинок, сеголеток и двухгодовиков радужной форели (*Parasalmo mykiss* Walb.), годовиков семги (*Salmo salar* L.), трехгодовиков окуня (*Perca fluviatilis* L.), плотву (*Rutilus rutilus* L.) и щуку (*Esox lucius* L.). Возраст отловленной плотвы – 5–7 лет, это половозрелые особи размером 16–23 см и весом – 100–200 г, стадия зрелости гонад – 2; возраст щук – 4–7 лет, также половозрелые, размерами – 30–60 см и весом – 500–1500 г, стадия зрелости гонад – 2. Отлов щуки и плотвы осуществляли сетями в августе–сентябре. Сигов и радужную форель получали с рыбоводного завода, окуней отлавливали в чистом водоеме Кимасозере. Воду, загрязненную отходами Костомукшского комбината, брали из хвостохранилища, возникшего на месте Костомукшского озера, после перекрытия вытекающей из него реки Кенти в 1979 году. В результате, размер нового водоема к настоящему времени

увеличился в 3 раза, значительная часть исходной гидрофауны погибла из-за появления тонкой взвеси размолотой горной породы, которая препятствовала фотосинтезу. Только в устьях небольших речек, впадающих в это озеро, продолжали обитать отдельные виды рыб, в том числе щука и плотва. Внешний вид последних, их упитанность, вкусовые качества мало отличались от соответствующих характеристик рыб, отловленных из чистых озер. Однако, несомненно, что определенные биохимические и физиологические адаптационные преобразования у этих рыб имели место, так как минерализация воды в хвостохранилище превышала к тому времени фоновые значения в 16 раз, достигая 400 мг/л. Концентрация ионов калия увеличилась от 0,8 до 117 мг/л, гидрокарбонатов – от 10,8 до 177 мг/л, значения рН возросли от 6,5 до 8,4. Содержание органических веществ стало сравнительно низким – 9 мг/л. В небольшом количестве обнаружены цианосодержащие вещества (0,004–0,007 мг/л). Из микроэлементов повышенное количество, по сравнению с фоновыми значениями, отмечается для лития (0,057 мг/л). Наличие тяжелых металлов (Zn, Cu, Ni, Pb, Co, Cd, Cr) – ниже ПДК (Дубровина и др., 1995; Кухарев и др., 1995).

Личинок сигов, форели, сеголеток радужной форели и трехгодовиков окуня использовали в подострых токсикологических экспериментах. Рыб содержали в аквариумах в течение 25–30 дней при ежедневной смене воды, при комнатной температуре, при разных разбавлениях (600, 125, 50, 25, 10, 5, 0) техногенной воды из Костомукшского водохранилища. В каждом аквариуме содержали по 20–25 сеголеток радужной форели или трехгодовиков окуня, и по 100 личинок радужной форели и сига. Для изучения биохимических изменений у рыб в течение длительной адаптации к условиям повышенной минерализации и рН в Костомукшском хвостохранилище был поставлен садковый эксперимент с радужной форелью и отловлены обитающие в этом водоеме плотва и щука. Для эксперимента использовали садок, размером 1 × 1 × 2 м, представляющий собой деревянный каркас, который покрывался мелкой ячейистой сеткой. Садок с помощью грузил был размещен в районе обитания щук и плотвы в хвостохранилище на глубине около 2 м. Радужная форель (двухгодовики, весом около 200 г, полученные из форелевого хозяйства горнообогатительного комбината) выдерживалась в садке в течение 2,5 месяца без подкормки с начала сентября до середины ноября.

Из только что отловленных рыб выделяли органы (почки, печень, селезенку, внутренний жир, жабры, сердце, вырезали участки мышц в области спинного плавника), которые замора-

живали жидким азотом в сосуде Дьюара. Личинок сига и форели использовали в анализах целиком. Доставленные в лабораторию пробы размораживали и готовили из них индивидуальные или сборные (при малой навеске) 10% гомогенаты в 0,25 М растворе сахарозы. Для осаждения крупных клеточных остатков гомогенаты подвергали центрифугированию при 10 000 g на центрифуге с охлаждением (К-24) в течение 30 минут. Полученные осветленные гомогенаты использовали для определения в них активности различных лизосомальных ферментов (катепсинов В и D, эластазы, β -галактозидазы и β -глюкозидазы, кислой фосфатазы, ДНКазы и РНКазы), ферментов углеводного и энергетического обменов (альдозазы, цитохромоксидазы, изоферментов лактат- и малатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, НАДФН-цитохромоксидазы). Кроме того, в пробах определяли содержание различных липидов – суммарных, общих фосфолипидов, триацилглицерин, эфиров холестерина, индивидуальных фосфолипидов (лизолецитина, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидной кислоты, сфингомиелина, кардиолипина, неидентифицированного фосфолипид, по-видимому, являющегося фосфатидилинозитолом), состав жирных кислот в суммарных липидах, триацилглицеринах, суммарных фосфолипидах.

Биохимический анализ проводили современными методами с использованием спектрофотометрии, тонкослойной и газожидкостной хроматографии и дискэлектрофореза. Описание этих методов и ссылки на них приведены в наших публикациях (Сидоров и др., 1981; Немова, Сидоров, 1990; Биохимические методы..., 1993). Активность каталазы определяли по методу А.Н. Баха и А.И. Опарина (Филиппович и др., 1982). Единицы, в которых выражали активность ферментов или содержание веществ, приведенные ниже, даются только для тех показателей, которые упоминаются в таблицах настоящей книги (Активность каталазы выражали в мг H_2O_2 /1 г сырого веса ткани/час, катепсина В – в ΔE_{525} /1 г ткани/30 мин, катепсина D – в ΔE_{280} /1 г ткани/час, ДНКазы и РНКазы в – ΔE_{260} /1 г сырой ткани/мин, β -глюкозидазы и β -галактозидазы – в мкМ п-нитрофенола/1 г сырой ткани/мин, изоферментов лактатдегидрогеназы – в условных единицах (количество образовавшегося диформаза в гелях/единицу сырого веса ткани/мин), суммарные липиды (мкг/1 г сырой ткани или в % от сырого или сухого веса ткани, фосфолипиды, триацилглицерины, холестерин и эфиры холестерина – в % к общей сумме липидов, фосфолипиды – в % к общей сумме фосфолипидов, жирные кислоты – в % к общей сумме жирных кислот).

Кроме того, в отдельных случаях использовали достаточно трудоемкие и уникальные для нашей лаборатории методы. В частности, в некоторых тканях радужной форели определяли ацилпроизводные КоА (то есть жирные кислоты, связанные с КоА) по методам, описанным в работе П.О. Рипатти и др. (1993), в мышцах и печени щуки определяли водорастворимые белки, поглощающие свет при 250 нм, полипептиды, поглощающие свет при 280 нм и серусодержащие пептиды (Смирнов, Кирилук, 1994), в мышцах и печени плотвы определяли содержание тяжелых металлов методом атомно-абсорбционной спектрометрии на спектрофотометре ААС-10. В желчи щуки и форели определяли соотношение (в процентах к общей сумме) холестерина и желчных кислот (Зекина и др., 1987). Содержание жирных кислот во фракции ацил- производных КоА и отдельных белков в каждой белковой фракции также выражали в процентах к общей сумме белков в этой фракции (то есть в относительных значениях), а содержание тяжелых металлов во фракции белков-ферментов, белков-металлотионеинов и фракции коллагенопротеогликанов выражали в мкг/мл. Кроме того, иногда определяли содержание оксипролина – свободного и коллагенового, активность щелочной фосфатазы и кальпаинов.

Следует сказать, что мы разделяем такие понятия как “биохимический показатель” и “биохимический признак”. Под последним подразумевается тот или иной биохимический показатель (например, содержание холестерина или активность фермента) в какой-нибудь отдельной ткани (печени, почках или жабрах). Этому имеется и определенное обоснование. Дело в том, что содержание одного и того же метаболита (или фермента) в разных тканях может иметь разные механизмы регуляции, а многие ферменты в отдельных тканях состоят из разных соотношений изоферментов или даже представлены специфичными, свойственными только этим тканям изоформами. Поэтому один и тот же биохимический показатель в различных тканях может реагировать на воздействие экологических или антропогенных факторов по-разному, проявляя некоторую тканевую специфичность, то есть ведет себя как самостоятельный биохимический признак. Это хорошо видно и из данных, представленных ниже.

Результаты, которые были получены в этих исследованиях составляют большое число перегруженных цифрами таблиц, они приведены в наших многочисленных публикациях и в итоговом отчете по выполненной в рамках хозяйственного договора работе (Разработка теоретических..., 2001). Поэтому в этой главе мы ограничимся только данными итоговых, обобщающих таблиц. Основные обобщенные результаты приведены в табл. 53.

Таблица 53

Относительная доля биохимических признаков,
заметно* или очень сильно** отличающихся у рыб от нормы***

Категории биохимических признаков	Вид рыбы		
	Радужная форель	Плотва	Щука
Общее число изученных признаков	215	166	145
Число признаков, заметно* отклоняющихся от нормы*** (%)	28	28	30
Число признаков, сильно** отклоняющихся от нормы*** (%)	7	11	10
Лизосомальные ферменты**** (% отклоняющихся от нормы***)	45	30	20
Ферменты углеводного обмена**** (% отклоняющихся от нормы***)	26	30	37
Липидные показатели**** (% отклоняющихся от нормы***)	24	33	31
Фосфолипиды**** (% отклоняющихся от нормы***)	25	37	69
Примечания:			
* – от – 60 до + 100 для лизосомальных ферментов, от – 40 до + 75 для ферментов углеводного обмена, от – 30 до + 50 для липидов, от – 25 до + 30 для фосфолипидов;			
** – от – 75 до + 200 для лизосомальных ферментов, от – 60 до + 150 для ферментов углеводного обмена, от – 50 до + 100 для липидов, от – 50 до + 75 для фосфолипидов;			
*** – в% от общей нормы;			
**** – в% к числу изученных признаков			

Хорошо видно, что число биохимических признаков, находящихся на крайних границах нормальной вариабельности у адаптированной к новым условиям жизни в течение 2,5 месяцев радужной форели у местных рыб: щуки и плотвы практически не отличалось друг от друга, составляя 28–30% от общего числа изученных в каждом варианте достоверных признаков. Число признаков, значительно отличающихся от нормы (в 2–3 раза), у сравниваемых рыб было также очень близким (7–11%). Необходимо отметить, что поведение рыб, их активность, внешний вид слабо отличались от контроля.

Более существенные различия наблюдаются между рыбами при сравнении более узких и тонких в биохимическом отношении признаков. Особенно четко это проявляется в группе лизосо-

мальных ферментов и фосфолипидов (табл. 53). Так, относительная доля лизосомальных признаков (в % к их общему числу) достаточно сильно отличающихся от нормы (в пределах крайних значений нормы) у радужной форели равно 45%, у плотвы – 30%, у щуки всего – 20%. В то же время процент таких “аномальных” признаков в группе фосфолипидов у радужной форели всего 25%, у плотвы он возрстал почти до 40% (37) и у щуки до 70% (69). Эти данные хорошо увязываются с высокой адаптивной изменчивостью лизосомальных ферментов и относительно слабой адаптивной изменчивостью фосфолипидных соотношений, на которую неоднократно указывали разные авторы (Покровский, Тутельян, 1976; Крепс, 1981; Кравченко и др, 1983; Сидоров, 1983; Немова, 1992; 1996; Высоцкая, 1996; 1999). В частности, высокий процент заметно отклоняющихся от нормы “лизосомальных признаков” у радужной форели можно объяснить тем, что активный период адаптации к новым условиям среды (повышенной минерализации и рН воды) у радужной форели и после 2,5 месяцев еще полностью не был завершен. Тем более, что это происходило у нее в условиях голодания. Хотя, возможно, и неполного, так как не исключено присутствие незначительных количеств каких-то пищевых объектов в садках для рыбы. Как известно, и при голодании и при стрессах активность лизосомальных ферментов увеличивается (Высоцкая и др., 1989; 1998; 1999; 2000; Крупнова, 1986). Другое дело фосфолипиды – их соотношение заметно изменяется или при очень сильных воздействиях среды (близких к патогенным), чего мы не наблюдали в Костомукшском хвостохранилище, или при длительном воздействии каких-то способствующих изменению состава биомембран факторов. Своеобразное изменение ионного состава воды этого водоема (16-кратное увеличение карбонатных солей калия с соответствующим повышением рН) могло способствовать заметному изменению концентрации мембранных фосфолипидов, от состава которых зависит проницаемость биомембран. Естественно, что для этого потребовалось значительное время, так как соотношение мембранных фосфолипидов, как известно из литературных данных, генетически консервативный признак. У радужной форели для этого времени было мало, поэтому у нее, по сравнению со щукой и плотвой, и наблюдалась меньшая изменчивость фосфолипидных признаков, хотя и у нее, как мы это видим, всего за 2,5 месяца адаптации к новому качеству воды достаточно заметно изменилось до 25% фосфолипидных признаков. Естественно, что для плотвы и щуки было достаточно времени, чтобы даже в процессе индивидуального развития изменить фосфолипидный

Содержание ацил-производных КоА в различных тканях радужной форели, содержащейся в течение 2,5 месяцев в Костомукшском хвостохранилище (I, мг/г сырого веса ткани, II, $\pm\Delta$ в %)

Показатель Σ жирных кислот	Ткань							
	Мышцы		Почки		Внутр. жир		Жабры	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Ненасыщенные	101	-27	377	-43	322	-30	174	-30
Моноеновые	106	-62	332	-88	515	-29	93	-39
Полиеновые	87	-55	424	-86	358	-19	81	-12
$\omega 6$ полиеновые	18	0	74	-50	50	-42	22	-18
$\omega 3$ полиеновые	66	-76	307	-15	340	-94	57	-10
Σ всех жир. к-т	294	-48	1133	-72	1195	-26	349	-44

состав биомембран соответственно новым условиям жизни. Необходимо еще отметить, что при этом мог происходить и отбор среди предшествующих пойманым рыбам поколений на разных этапах онтогенеза (особенно на эмбриональном и личиночном). Если учесть, что полового созревания плотва достигает к 3–5 году жизни, а щука – к 4–6 году, то плотве, использованной в нашей работе, за 21 год существования Костомукшского хвостохранилища предшествовало 3–5 поколений, а у щуки всего 2 поколения. Трудно оценить вклад в изменение биохимического статуса обитающих в настоящее время рыб в Костомукшском хвостохранилище предшествующих поколений, но, несомненно, он существует. Однако представляется (учитывая те заметные изменения, которые наблюдаются у радужной форели всего через 2,5 месяца адаптации к новым условиям), что роль адаптационных процессов, происходящих в период индивидуальной жизни каждой рыбы, здесь превалирует. В пользу этого говорят и данные по более высокой адаптивной изменчивости фосфолипидного пула у щуки (около 70%), по сравнению с плотвой (40%); у первой длительность индивидуальной жизни была в два раза больше, а число предшествующих поколений – в два раза меньше, чем у плотвы.

Интересно отметить, что и у радужной форели при этом происходили определенные изменения в липидном обмене. Так, из данных табл. 54 хорошо видно, что абсолютное содержание ацил-КоА почти для всех жирнокислотных групп у адаптированной радужной форели во всех тканях (мышцы, почки, внутренний жир, жабры) резко уменьшалось, по сравнению с нормой и особенно сильно в почках. Уменьшалось содержание моноеновых жирных кислот, связанных с КоА, на 88%, полиеновых на 86%, в целом всех жирных кислот – на 72%. Синхронно с этим наблюдалось значительное (на одну треть) увеличение запасных триацилглицеринов в мышцах и печени, при соответствующем не очень значительном (на 15%) уменьшении общей доли фосфолипидов в суммарных липидах мышц, печени, почек и жабр. К сожалению, мы не определяли при этом содержание триацилглицеринов в почках и жабрах, поэтому пока еще рано трактовать полученные результаты. Скорее всего, резкая убыль в клетках фракции свободных ацил-производных жирных кислот, являющихся исходными продуктами для биосинтеза сложных липидов или, наоборот, следствием их гидролиза, при одновременном увеличении абсолютного содержания запасных липидов – триацилглицеринов – в печени и мышцах, свидетельствует в пользу усиления жиронакопления у адаптирующейся радужной форели. Этому соответствует значительное накопление триацилглицеринов

в печени плотвы (на 183%). Следует заметить, что в мышцах щуки и плотвы такого явления не наблюдалось.

Очень резкое уменьшение ацил-производных КоА в почках, видимо, объясняется какими-то перестройками жирнокислотного спектра биомембран этого органа, связанными с нагрузкой на него по удалению неестественного для этих рыб избытка неорганических солей. Главным в этих экспериментах было то, что впервые для изучения адаптаций рыб к солености были применены очень тонкие и достаточно трудные для выполнения методы определения абсолютного содержания свободных жирных кислот, связанных с КоА. Именно через эту фракцию идет синтез и распад, как жирных кислот, так и сложных липидов. Эти данные представляют несомненный интерес, хотя для однозначной интерпретации требуется определенное методическое усложнение (одновременное определение других фракций липидов, ацетил-КоА и малонил-КоА). Определенные и достаточно четкие различия наблюдались у сравниваемых рыб в их реакции на увеличение минерализации среды и в характере направленности изменений биохимических показателей – в сторону увеличения или уменьшения, по сравнению с контролем. В табл. 55 приведены данные, из которых видно, что каждая группа биохимических признаков у разных видов ведет себя по-своему.

В этой таблице все изученные биохимические признаки были разделены на три группы: увеличивающиеся, по сравнению с нормой, уменьшающиеся, по сравнению с нормой, не изменяющиеся, по сравнению с нормой. При этом учитывалась разница

Таблица 55

Относительная доля признаков разных биохимических категорий, увеличивающихся (+), уменьшающихся (–) или не изменяющихся (0) у плотвы и щуки, обитающих в Костомукшском хвостохранилище и радужной форели, помещенной в водоем на короткое время (2,5 мес.)

Вид рыбы	+/-	Категории биохимического признака			
		Ферменты лизосом	Ферменты углеводного обмена	Липиды	Фосфолипиды
Радужная форель	+	55	23	26	17
	–	34	57	25	25
	0	11	20	39	58
Плотва	+	8	26	40	37
	–	72	61	33	50
	0	10	13	27	13
Щука	+	44	43	43	47
	–	28	32	37	40
	0	28	25	20	13

Примечание: учитываются показатели, отклоняющиеся от нормы на $\pm 5\%$.

между опытом и нормой всего в ± 5 . Это сделано потому, что в среднем ошибка определения большинства биохимических показателей не превышала величины в $\pm 5\%$. Различия в таблице 55 указывают на тенденцию возможных изменений в организме. Мы видим, что у еще слабо адаптированной к новым условиям жизни радужной форели изменчивость в разных группах и биохимических категориях заметно отличается от таковых у более приспособленных к новой среде рыб – щуки и плотвы. Интересно отметить, что общая средняя доля слабо измененных (практически неизменных) биохимических признаков у щуки и плотвы уменьшается до 15–20%, в то время как у радужной форели остается в среднем неизменными около 30% признаков. При этом у радужной форели, как это можно было бы предполагать из общих теоретических положений, высказанных ранее (Сидоров, 1986) наиболее изменчивой оказалась группа лизосомальных ферментов (+55, –34, неизменные – 11%), а наименее изменчивой – группа фосфолипидов (+17, –25, неизменные – 58%), у щуки – эти значения для лизосомальных ферментов составляют: +44, –28, неизменные – 28; а для фосфолипидов – +47, –40, константные – 13%. Плотва занимает промежуточное положение по изменчивости этих групп показателей: по фосфолипидам она ближе к щуке, а по лизосомальным ферментам – к радужной фо-

рели, с одним только отличием: большинство лизосомальных ферментов у нее в новых условиях не увеличивают свою активность, как у радужной форели, а наоборот уменьшают (+8; –72; константных – всего 10). Остальные группы веществ занимают промежуточное положение. Эта таблица иллюстрирует определенные особенности в адаптации к повышенной минерализации воды у разных видов рыб, а также ее четкую зависимость от времени и функциональной роли той или иной группы веществ в специфических механизмах адаптации. Это относится, прежде всего, к фосфолипидам. С одной стороны, неоднократно приводились данные о высокой консервативности фосфолипидных соотношений в биомембранах в зависимости от систематической принадлежности организма, специфичности ткани и некоторых экологических условий, кроме экстремальных и сильно патогенных (Крепс, 1981; Сидоров, 1983). С другой стороны, полученные результаты показывают, что биохимический статус рыб (прежде всего фосфолипидные соотношения) в изменившихся условиях солености воды переходит на новый уровень, причем практически не возвращается к исходной норме. Как известно (Озернюк, 1992; 2000), рассматриваются, как теоретически возможные, два типа адаптаций на молекулярном уровне: после резкого изменения обмена веществ в первоначальный момент (в течение первых 2–3 недель адаптации) может происходить постепенное возвращение к исходной норме (первый тип адаптации) или осуществляется переход на новый уровень обмена веществ и биохимического статуса (второй тип адаптации). Нам кажется, что при постоянно действующих новых факторах среды никакого возвращения к исходной норме обмена веществ и теоретически не должно происходить. Этого можно ожидать лишь при кратковременном воздействии какого-то фактора и последующем восстановлении условий среды на первоначальном уровне. По крайней мере, и эта возможность требует экспериментального подтверждения. Думается, что полной релаксации обмена веществ и в этом (последнем) случае не будет наблюдаться. Наблюдающиеся в наших исследованиях сильные различия по биохимическим показателям у разных видов рыб (радужная форель, плотва и щука) при адаптации к новым условиям минерального загрязнения, pH, спектру питания и прозрачности воды, в значительной степени могут быть предопределены биохимическими особенностями рыб, связанными с их филогенезом, экологией и физиологией. Например, радужная форель по происхождению более древняя рыба, чем плотва и щука, и, кроме того, она относится к так называемым “жирным” рыбам, в то время как щука к “явно то-

Таблица 56

Активность лизосомальных ферментов в органах рыб из оз. Кимасозеро

Биохимические показатели	Печень			Почки		
	Рад. форель	Плотва	Щука	Рад. форель	Плотва	Щука
Эластаза	2,05	38,0	9,0	1,47	33,5	10,0
Катепсин В	0,30	27,5	5,8	0,25	28,0	5,8
Катепсин D	0,50	23,5	5,0	0,79	25,0	41,0
Кислая фосфатаза	0,54	0,48	-	0,66	0,51	-
Глюкозидаза	1,07	0,37	-	0,33	0,12	-
Галактозидаза	0,42	0,64	-	1,43	0,46	-
ДНКаза	0,46	1,30	-	0,91	1,1	-
РНКаза	1,36	1,39	-	1,77	1,53	-
		Мышцы			Жабры	
Эластаза	0,3	8,0	0,6	-	20,0	9,0
Катепсин В	0,54	9,0	8,7	-	26,5	9,0
Катепсин D	0,07	8,0	7,5	-	5,1; 15,0	18,5
Кислая фосфатаза	0,35	0,37	-	-	0,40	-
Глюкозидаза	0,10	0,02	-	-	0,09	-
Галактозидаза	0,01	0,02	-	-	0,12	-
ДНКаза	0,24	0,35	-	-	0,73	-
РНКаза	0,23	0,42	-	-	0,93	-

щим”, а плотва может занимать промежуточное положение. В частности, из данных табл. 56–59, на которых представлены исходные значения для основных изучаемых веществ у рыб из чистых водоемов, хорошо видно, что уже в норме эти рыбы по сравнимым параметрам сильно различаются. Для тощих рыб (плотва и щука), у которых главным энергетическим источником являются белки, наблюдается значительно более высокая активность лизосомальных протеиназ (катепсинов В и D), превышающая этот показатель для жирных рыб (радужная форель), для которых энергетическими источниками служат запасные липиды (триацилглицерины), на целый порядок в печени, почках и жабрах (табл. 56) и, по-видимому, в мышцах, в которых мы в этих экспериментах активность катепсинов не определяли, но это вытекает из других наших данных.

Исследуемые показатели углеводного обмена у исследованных видов более близки, хотя и встречаются отдельные очень сильные различия (табл. 57). Например, в жабрах тощих рыб (плотва и щука) активность практически всех изоферментов ЛДГ в десятки раз превышает таковую у радужной форели. Это харак-

Таблица 57

Активность ферментов углеводного обмена в органах рыб из озера Кимасозеро (контрольный водоем)

Биохимические показатели	Печень			Почки			Жабры		
	Р. форель	Плотва	Щука	Р. форель	Плотва	Щука	Р. форель	Плотва	Щука
Цитохромоксидаза	68	70	173	57	75	360	47	91	222
Глюкозо-фосфат-дегидрогеназа	113	11	239	139	82	431	54	33	94
Альдолаза	4	8	5	-	41	18	-	8	91
НАДФ-ПР	-	14	256	-	49	70	9	24	256
МДГ-100	18	36	-	6	57	-	16	28	-
МДГ-93	-	4	-	-	8	-	-	8	-
МДГ-81	-	4	-	-	4	-	-	5	-
ЛДГ А ₄	-	71	190	-	101	762	4	599	130
ЛДГ А ₁ В ₃	4	30	-	80	25	-	3	88	-
ЛДГ А ₂ В ₂	0	44	62	71	27	396	4	44	79
ЛДГ А ₃ В ₁	0	61	-	39	36	-	5	286	-
ЛДГ В ₄	29	37	17	89	52	210	4	78	592

Таблица 58

Содержание основных групп липидов в органах рыб из озера Кимасозеро (в%)

Биохимические показатели	Печень		Почки	
	Р. форель	Щука	Р. форель	Щука
Суммарные липиды, ∇	14,5	9,8	33,0	1,7
Фосфолипиды, ∇∇	67,1	80,8		83,7
Триацилглицерины ∇∇	9,1	9,6		12,4
Эфиры холестерина ∇∇	0,8	6,7		5,4
Холестерин ∇∇	0,7	3,3		4,3
Лизофосфолипиды**	0,6	4,8		3,5
Фосфатидилсерин**	0,5	3,6		4,3
Сфингомиэлин**	13,4	10,3		10,3
Фосфатидилхоллин**	54,3	48,2		41,3
Фосфатидилэтанолламин**	25,5	25,3		16,4
Фосфатидная кислота**	0,5	3,7		9,5
Кардиолипин**	0,6	1,2		9,5
Неидентифицированные липиды**	4,6	2,4		5,2
Холестерин*	0,74	1,0		
Литохолевая кислота*	0	0,3		
Дезоксихолевая кислота*		1,3		
Хенодесоксихолевая кислота*	2,6	10,6		
X1*	2,6	3,0		
X2*	10,1	7,8		
Холевая кислота*	84,1	75,9		

Примечание: * – в% от общего содержания желчных кислот и холестерина в желчи
 ** – в% к общей сумме фосфолипидов
 ∇ – в% к сухому весу
 ∇∇ – в% к общей сумме липидов

терно для печени указанных рыб, в то время как в мышцах и почках этих рыб такие различия не отмечаются. Пока трудно этому найти правдоподобное объяснение. Однако мы видим, что разные виды рыб, обитающие казалось бы, в одинаковых условиях, тем не менее, резко отличаются не только по активности лизосомальных ферментов, что для протеиназ находит разумное объяснение, но и для ферментов углеводного и энергетического обмена.

Аналогичные выводы можно сделать и для липидов (табл. 58–59, рис. 10). Интересно отметить при этом, что хотя абсолютное содержание, как запасных, так и структурных липидов у “жирных” рыб в мышцах и других тканях всегда выше такового у тощих рыб, относительная доля фосфолипидов у тощих рыб часто выше таковой у жирных рыб (% от суммы

Таблица 59

Содержание основных групп липидов в мышцах рыб из озера Кимасозеро (в% на сухой вес)

Биохимический показатель	Рад. форель	Плотва	Щука
Суммарные липиды	15,9	1,7	1,5
Фосфолипиды	67,1	67,2	83,5
Триацилглицерины	30,1	31,4	3,2
Эфиры холестерина	2,8	0,3	2,8
Холестерин	0,9	1,1	10,2
Лизофосфатидилхоллин	0,0	3,1	–
Фосфатидилсерин	1,7	6,2	–
Сфингомиэлин	3,5	10,0	–
Фосфатидилхоллин	64,7	41,6	–
Фосфатидилэтанолламин	30,1	19,9	–
Фосфатидная кислота	0,5	3,7	–
Кардиолипин	0,5	8,1	–
Неидентифицированные фосфолипиды	0,0	6,8	–

липидов), достигая 70–80%; при этом относительная доля триацилглицерин в мышцах плотвы и радужной форели практически одинакова (около 30%), в то время как их абсолютное содержание в теле плотвы во много раз меньше, чем у радужной форели.

Обращает на себя внимание то, что в отличие от ранее обнаруживаемого разными авторами (Крепс, 1981; Сидоров, 1983) относительно мало изменчивого соотношения фосфолипидов рыб в нервных тканях, половых продуктах и изолированных мембранах лизосом разных в таксономическом отношении рыб, в целых органах (особенно, таких как печень и почки) эти соотношения менее постоянны (табл. 58–59). Особенно хорошо это видно на диаграмме (рис. 10). Возможно, это связано с меньшей генетической закрепленностью фосфолипидного статуса этих органов, ответственного за адаптации этих тканей к меняющимся условиям среды.

Таким образом, полученные результаты показывают, что хотя, как и следовало ожидать из чисто теоретических предпосылок, наибольший вклад в адаптацию организма рыб к повышенной минерализации несут биомембраны (прежде всего, фосфолипидные соотношения в них) участвующих в этом процессе органов (печень, почки и, по-видимому, жабры), другие показатели метаболизма (лизосомальные ферменты, углеводный обмен, запасные липиды и др.) не остаются при этом неизменными и, оче-

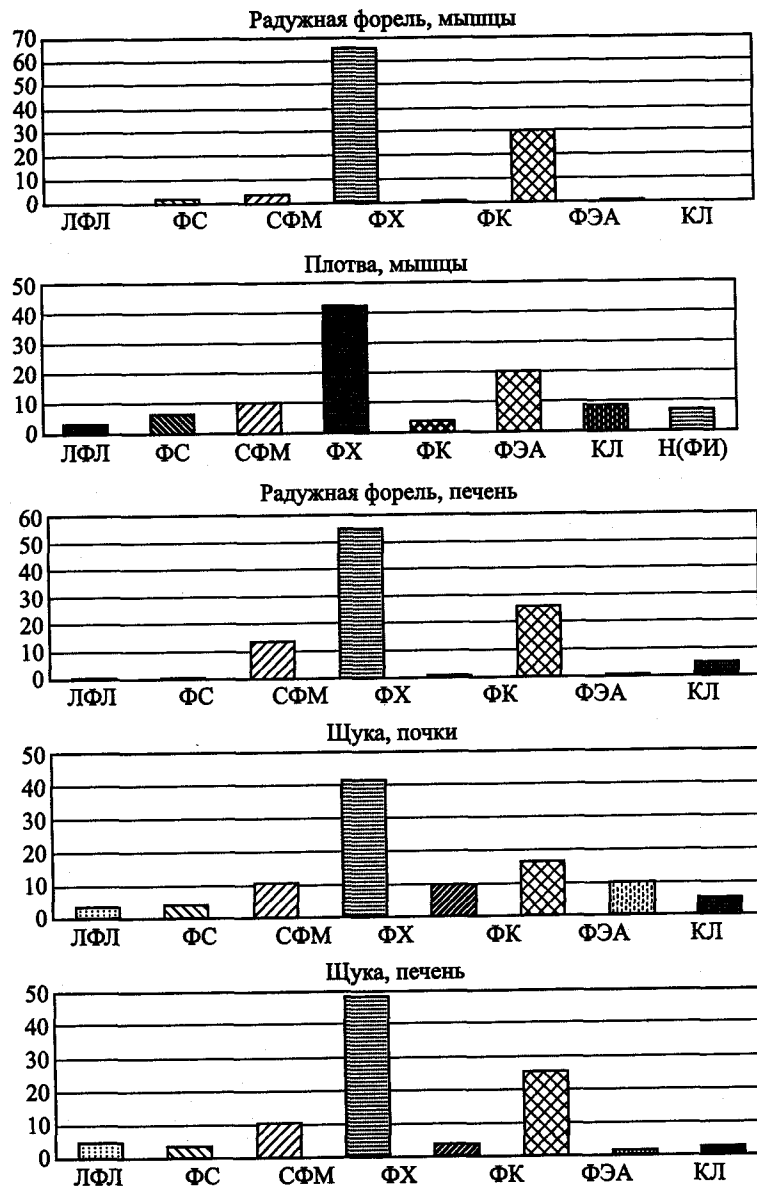


Рис. 10. Соотношения фосфолипидных фракций в тканях рыб.
ЛФЛ-лизофосфолипиды, ФС-фосфатидилсерин, СФМ-сфингомиелин, ФХ-фосфатидилхолин, ФК-фосфатидная кислота, ФЭА-фосфатидилэтаноламин, КЛ-кардиолипин, Н(ФИ)-неидентифицирован, возможно фосфатидилинозитол

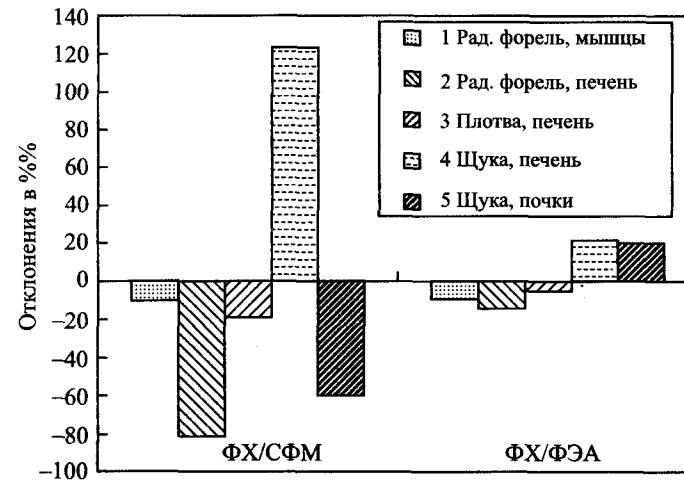


Рис. 11. Соотношения основных фосфолипидных фракций в органах рыб Костомукшского хвостохранилища (контроль – рыбы из Кимасозера)

видно, участвуют в общем процессе адаптации всего организма к новым условиям существования.

В заключение, продемонстрируем еще одну таблицу (табл. 60), из которой четко видна роль соотношения мембранных липидов в адаптации организма рыб к новой, более минерализованной среде. У радужной форели на начальных этапах адаптации заметно изменяется соотношение лишь основных фосфолипидов, входящих в состав внешней клеточной мембраны (например, фосфатидилхолина к сфингомиелину): оно уменьшается в печени почти в 5 раз (рис. 11). Такое изменение близко к стрессовым и патогенным изменениям.

При дальнейшей адаптации радужной форели к рассматриваемым факторам среды в Костомукшском хвостохранилище это

Таблица 60

Соотношение основных фосфолипидных фракций в органах рыб из оз. Кимасозера и Костомукшского хвостохранилища

Соотношение фракций	Радужная форель		Плотва		Щука					
	мышцы	печень	печень	печень	Почки					
ФХ/СФМ	18,5	16,6	19,0	3,6	4,2	3,4	4,7	10,5	4,0	1,6
ФХ/ФЭА	2,1	1,9	2,1	1,8	2,1	2,0	1,9	2,3	2,5	3,0
ФЭА/СФМ	8,6	8,8	1,9	2,0	2,0	1,7	2,4	4,6	1,6	0,5

Таблица 61

**Биохимический статус личинок сига при действии техногенных вод
Костомукшского ГОКа с различной степенью разбавления чистой водой
(в % к контролю)**

	Биохимический показатель	Конт- роль	Степень разбавления (число раз)			
			600	125	25	5
1	Катепсин D	6	+42	+125	+308	+458
2	Катепсин B	70	-29	-17	-7	-11
3	ДНКаза	100%	+60	+50	+35	+45
4	РНКаза	100%	+20	+20	+10	+3
5	β -Глюкозидаза	100%	-20	-30	-35	-35
6	β -Галактозидаза	100%	+35	+25	+30	+15
7	Суммарные липиды	27,4	-8	-5	+37	-5
8	Триацилглицерины	7,9	-33	-20	-1	-20
9	Эфиры холестерина	0,4	175	+20	+600	+775
10	Суммарные фосфолипиды	18,8	-1	0	+42	-13
11	Холестерин	0,4	-25	-25	0	-50
12	Лизофосфатидилхолин	1,1	+9	+9	+300	+9
13	Фосфатидилсерин	1,7	-12	-41	-23	-47
14	Сфингомиэлин	2,0	+5	+30	+120	+5
15	Фосфатидилхолин	10	-2	-11	+8	-14
16	Фосфатидилэтанолламин	4	-5	-2	+45	+5
Жирные к-ты фосфолипидов в %:						
17	C 14 : 0	0,3	0	0	+33	0
18	C 14 : 1	0,1	0	0	+100	0
19	C 15 : 0	0,1	+100	0	0	0
20	C 15 : 1	0,1	0	0	0	0
21	C 16 : 0	27,4	+31	+19	+3	-3
22	C 16 : 1	2,3	+39	+4	-4	-8
23	C 17 : 0	0,2	+50	+50	+50	+100
24	C 17 : 1	0,2	-50	-50	-50	0
25	C 18 : 0	5,7	-7	+23	+17	0
26	C 18 : 1	12,7	+9	+3	+1	+2
27	C 18 : 2 ω 6	2,5	-36	-19	+12	-12
28	C 18 : 3 ω 3	0,5	0	+100	+60	+20
29	C 20 : 3 ω 6	2,7	-18	+11	+55	+18
30	C 20 : 4 ω 6	3,1	-26	-5	+6	+10
31	C 20 : 4 ω 3	0,1	0	0	+400	+410
32	C 20 : 5 ω 3	5,1	-31	+2	+2	+2
33	C 22 : 4 ω 6	1,0	-90	-90	-30	-10
34	C 22 : 5 ω 3	2,1	-14	0	-5	+14
35	C 22 : 6 ω 3	33,6	-16	-14	-8	-4
36	Насыщенные жирные кислоты	33,7	+20	+15	0	0
37	Моноеновые жирные кислоты	15,4	+11	+3	0	0

Таблица 61 (окончание)

	Биохимический показатель	Конт- роль	Степень разбавления (число раз)			
			600	125	25	5
38	Полиеновые жирные кислоты	50,9	-20	-11	-1	-1
39	ω 6 Жирные кислоты	8,6	-24	-7	+28	+13
40	ω 3 Жирные кислоты	41,3	-15	-5	-5	-1
41	Цитохромоксидаза	100%	+23	-22	+18	+37
42	Лактатдегидрогеназа A ₄ ¹	100%	-43	-4	-4	-2
43	Лактатдегидрогеназа B ₄ ¹	100%	-7	+7	+7	+9
44	Лактатдегидрогеназа B ₄ ²	100%	-4	+7	+8	-4
45	Коллагеновый оксипролин	541,2	0	-9	-8	-10
Общее число показателей			45	45	45	45
Число показателей, отклоняющихся от нормы			4(9)	4(9)	14(31)	10(22)
Однонаправленные			25(55%)			

соотношение, по-видимому, должно было бы приблизиться к норме. Об этом свидетельствуют и данные по печени плотвы и щуки: у первой это соотношение через несколько лет адаптации к новым условиям почти вернулось к норме, отличаясь от нее всего в 1,2 раза в сторону уменьшения, а у щуки, наоборот, в сторону увеличения в 2,2 раза. Заметные изменения при такой длительной адаптации почти всех соотношений главных мембранных липидов наблюдаются и в почках щуки.

В табл. 61 сведены данные по изучению биохимического статуса личинок сига при действии на него техногенных вод Костомукшского ГОКа.

Значения биохимических показателей у контрольных рыб, сохранившихся в чистой воде, выражали в единицах, указанных для каждого показателя в разделе "Методика" в расчете на 1 г сухой или сырой массы органа рыб, или в % к общему количеству родственных веществ, определенных одним и тем же методом (например, жирных кислот – газохроматографическим методом, а фосфолипидов – с помощью тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии). Значения же в опытных вариантах приведены в виде разницы между опытом и контролем, отнесенной в процентах к контролю. Знак "+" говорит на сколько процентов, по сравнению с контролем, опытная величина биохимического показателя увеличилась, а знак "-" свидетельствует о том, на сколько она уменьшалась. Такой способ выражения опытных значений очень удобен для понимания протекающих под воздействием токсикантов био-

химических процессов: их ингибирования, активизации, неизменности, характера изменений, в частности, направленности, в зависимости от дозы действующего вещества.

Такой подход позволяет избежать некоторых возможных ошибок, что особенно хорошо видно из табл. 61. В частности, интерпретация многих тысяч газожидкостных хроматограмм жирных кислот различных рыб и других животных, полученных в нашей лаборатории (Болгова, 1978; Гурьянова, 1982; Смирнов, 1982; Сидоров, 1983; Богдан, 1986; Нефедова, 1989; Регеранд, 1994), показывает, что низкие (1,0–1,5%) значения минорных жирных кислот, представленных на хроматограммах, сильно вариабельны по разным методическим причинам, и, как правило, для них достоверен лишь порядок значений. Исходя из сказанного, в этих случаях принимали во внимание лишь очень сильные различия.

3.2. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НА БИОХИМИЧЕСКИЙ СТАТУС РЫБ КОМПОНЕНТОВ БУРОВЫХ РАСТВОРОВ

Речную камбалу (*Platichthys flesus* L.) вылавливали в Белом море и использовали в острых аквариальных экспериментах с различными концентрациями запатентованных препаратов, применяемых в качестве компонентов буровых растворов, с целью установления ПДК. Испытуемые препараты изучали в концентрации 0,1, 1,0, 10,0 и 100,0 мг/л. В каждом аквариуме объемом 50 литров содержали по 10 рыб при температуре 10–15°. Экспозиция составляла 30 сут.

Влияние различных концентраций нескольких компонентов буровых растворов на биохимические показатели в разных органах рыб изучали также в экспериментах с годовиками семги (*Salmo salar* L.). Молодь рыб (по 10 шт.) выдерживали в емкостях с различными концентрациями испытуемых препаратов в течение месяца при температуре воды 6–7 °С.

По окончании экспериментов брали материал для биохимического анализа. Из окуня и камбалы выделяли органы и ткани (мышцы, жабры, почки, гонады). В большинстве случаев отпрепарированные органы и ткани объединяли в среднюю пробу и готовили из них гомогенаты при 0–5 °С. В тех случаях, когда анализ не проводили сразу, пробы замораживали и хранили в течение нескольких недель в жидком азоте.

Было проведено сравнение двух наборов биохимических тестов: минимального и оптимального. Первый содержал 13 биохими-

Влияние препарата J-475* на биохимический статус речной камбалы

№ п/п	Биохимические признаки		Конт-роль	Концентрация токсиканта (мг/л)		
				0,1	1,0	10
1	Белок общий	Печень	11,8	+18	+25	-18
2	"	Мышцы	4,8	+40	+20	+40
3	"	Жабры	5,6	+83	-3	+76
4	"	Гонады	9,0	-30	+21	-37
5	Каталаза	Печень	0,43	+7	-7	+7
6	"	Мышцы	0,4	-15	0	-15
7	"	Жабры	0,46	0	-13	+2
8	"	Гонады	0,4	+8	+15	+8
9	Катепсин D	Печень	4,3	-23	-23	+51
10	"	Мышцы	0,5	+60	+40	+300
11	"	Жабры	1,2	-8	+17	+85
12	"	Гонады	0,4	-50	-	0
13	ДНКаза	Печень	0,93	-50	-73	-93
14	"	Мышцы	0,13	+73	+70	+5
15	"	Жабры	0,61	-92	-67	-76
16	"	Гонады	0,46	-37	-92	-16
17	Малоновый диальдегид	Печень	33,2	+33	+16	-40
18	"	Мышцы	4,4	+170	-23	+480
19	Насыщенные жирные к-ты	Печень	34,5	-20	-14	-21
20	Моноеновые жирные к-ты	"	18,6	-21	-8	-8
21	Полиеновые жирные к-ты	"	40,1	+22	+3	+15
22	ω6-Жирные кислоты	"	19,0	-20	-30	-18
23	ω3-Жирные кислоты	"	27,9	+70	+32	+55
24	ω3/ω6	"	1,2	+125	+92	+92
25	20 : 4ω6/18 : 2ω6	"	6,3	+24	+127	+120
Общее число тестов				24	23	24
Число тестов, сильно отклоняющихся от контроля				6	9	12
То же в % к общему числу тестов				25	35	50

* – J-475 – смесь 77–87% пероксиддисульфата аммония и 13–23% сополимеров винилиденхлорида.

ческих показателей, относящихся к выполнению в организме и тканях, как минимум пяти биохимических функций: поддержание общего гомеостаза (белок), работа мембранной системы (насыщенные жирные кислоты, моноеновые жирные кислоты, полиеновые жирные кислоты, ω-6 жирные кислоты, ω-3 жирные кислоты, их соотношение, соотношение 20 : 4ω6/18 : 2ω6), внутриклеточное пищеварение, детоксикация дефектных и чужеродных веществ, ограниченный протеолиз, стресс (катепсин D, ДНКаза), окислительный стресс (каталаза, малоновый диальдегид), функционирование со-

единительных тканей (свободный и коллагеновый оксипролин). Эта система тестов (биохимических признаков) применялась для анализа четырех тканей камбалы – мышц, печени, жабр, гонад, подвергнутых воздействию различных концентраций пяти видов токсичных препаратов, то есть в целом действие каждого токсиканта оценивали по 25–30 биохимическим признакам.

В табл. 62 даны результаты по изменению биохимических признаков под влиянием самого токсичного из всех исследованных нами буровых растворов – запатентованной смеси, состоящей из 77–87% пероксиддисульфата аммония и 13–23% сополимеров винилиденхлорида.

Как видно из таблицы, одни и те же биохимические показатели в различных тканях по-разному реагировали на воздействие испытываемых препаратов. Например, активность ДНКазы в печени, жабрах и гонадах заметно уменьшалась, а в мышцах, напротив, возрастала. В то же время каталаза во всех проанализированных тканях (печени, почках, жабрах и гонадах) лишь незначительно варьирует в пределах от –15 до +15% от контроля. И в этом случае при комплексной оценке воздействия химического фактора мы берем в расчет “биохимический признак”, то есть биохимический показатель в отдельной ткани (см. выше).

В результате проведенных исследований нами был получен материал, сведенный в 14 таблицы, в которых сравнивались от 24 до 126 биохимических признаков (от 10 до 45 биохимических показателей) у пяти видов рыб под влиянием от 3 до 5 различных концентраций нескольких типов смесей разных токсикантов (техногенных отходов и буровых растворов). Все эти таблицы подробно приведены и рассмотрены в заключительном отчете по этой теме (Разработка теоретических..., 2001). Здесь же, для понимания главных итоговых рис. 12 и 13, в которых проиллюстрированы основные результаты работы, в качестве примера представлена таблица только для одного из компонентов буровых растворов – препарата J-475 и сводная таблица для всех изученных веществ.

3.3. БИОХИМИЧЕСКИЙ ИНТЕГРАЛЬНЫЙ ИНДЕКС (БИИ)

Таким образом, основываясь на вышеприведенной оценке степени отклонения от естественных границ variability изученных нами биохимических показателей и признаков во всех экспериментальных вариантах, мы в каждом из них определяли число показателей, близких к крайним границам variability, или даже выходящих за эти границы, и выражали это количест-

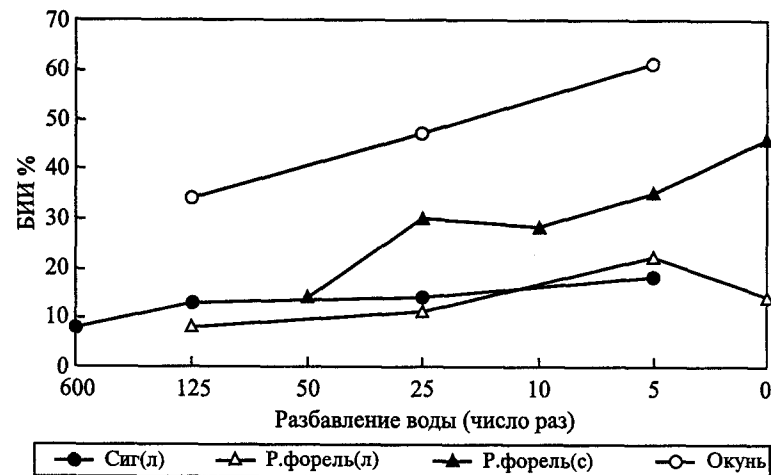


Рис. 12. Биохимический интегральный индекс у некоторых рыб под влиянием техногенной воды Костомукшского ГОКа

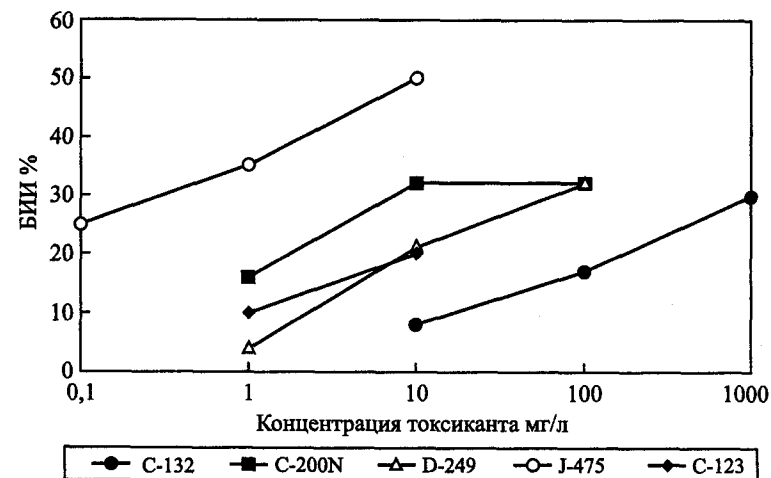


Рис. 13. Биохимический интегральный индекс речной камбалы под влиянием различных концентраций препаратов, используемых в качестве буровых растворов

во в процентах к общему количеству изученных показателей. Эту величину мы назвали первоначально биохимическим индексом стресса (БИС), так как она отражает развитие стрессового процесса на биохимическом уровне в организме под влиянием токсических веществ. В дальнейшем, при разработке этого способа

Таблица 63 (к рис. 12)

Вид рыб	Общее число показателей	Разбавление техногенной воды (число раз)						
		600	125	50	25	10	5	0
Сиг (личинки)	50	8	13	–	14	–	18	–
Р. форель (личинки)	36	–	8	–	11	–	22	14
Р. форель (сеголетки)	74	–	–	14	30	28	35	46
Окунь (3+)	126	–	34	–	47	–	61	–

Таблица 64 (к рис. 13)

Токсикант*	Общее число биохимических показателей	Концентрация токсиканта (мг/мл)				
		0,1	1,0	10	100	1000
C-132	26	–	–	8	17	30
C-200N	24	–	16	32	32	–
D-149	28	–	4	21	32	–
J-475	24	25	35	50	–	–
C-123	30	–	10	20	–	–

* Примечания:
C-132 – добавка для повышения вязкости растворов, смесь двух солей – карбоната кальция 50–80% и основного хлорида магния и алюминия 20–50%.
C-200N – ингибитор коррозии, смесь морфолинов, полученных в реакции аммиака с диэтиленгликолем. Основное вещество – диэтаноламин.
D-149 – ламинарный буфер, смесь 50% бентонита (глина), 25% динатриевой соли 1-гидроксиэтилендифосфорной кислоты и 25% полисахарида на основе глюкозы и маннозы.
J-475 – агент для разложения, смесь 77–87% пероксиддисульфата аммония и 13–23% сополимеров винилиденхлорида.
C-123 – стабилизатор глин, смесь из жильсонита (асфальт) 60%, натриевой соли гуминовых кислот 25%, и углеродных волокон.

комплексной оценки состояния организма гидробионтов, стремясь к корректному использованию уже сложившихся в биологической и медицинской литературе терминов, мы пришли к выводу о том, что рассчитываемый нами показатель правильнее будет называть – биохимический интегральный индекс (БИИ). Примеры расчета БИИ для двух вышеприведенных экспериментов приведены в табл. 63 и 64 к рис. 12 и 13.

На рис. 12 и 13 представлены данные по изменению БИИ в некоторых вариантах опытов в зависимости от концентрации действующего агента. Хорошо видно, что с увеличением дозы загрязненной воды во всех проведенных нами подострых аквари-

альных экспериментах БИИ четко увеличивался. Этот индекс также зависит от вида рыбы и ее возраста.

Несколько неожиданным для нас оказался выявленный факт меньшей чувствительности личинок сига и радужной форели (БИИ равен 8–22) к воздействию разных концентраций воды из Костомукшского хвостохранилища, по сравнению с сеголетками радужной форели (БИИ 14–46) и трехгодовиками окуня (БИИ 34–61). Возможно, различия между личинками и более взрослой молодью этих рыб связаны с тем, что у личинок показатели биохимического статуса определяли в гомогенатах из целостных личинок. Это могло разбавить концентрации некоторых метаболитов, содержание которых увеличивалось в отдельных органах, или ингибировать возросшие в них активности некоторых ферментов, что и сказалось на уменьшении числа сильно измененных биохимических параметров (то есть БИИ), по сравнению с молодью радужной форели и окуня, у которых значения биохимических показателей определяли в органах, наиболее чувствительных к воздействию токсикантов (печени, почках, жабрах). Более высокую чувствительность молоди окуня, по сравнению с сеголетками радужной форели, можно связать с разными адаптационными способностями этих видов. Радужная форель – одомашненный вид, она часто сталкивается с достаточно резкой сменой пищевых и других условий содержания на рыбоводных предприятиях, поэтому теоретически она должна быть более устойчивой и легче адаптироваться ко всякого рода экстремальным воздействиям, чем окунь, выросший в чистой воде северных водоемов.

Важно, что величина БИИ, то есть число показателей, близких к крайним границам их естественной вариабельности или выходящих за ее пределы, то есть уже патологичных, во всех случаях соответствует классическому принципу токсикологии “доза–эффект”, означающему, что с увеличением дозы токсиканта усиливается производимый им эффект.

Такая закономерность не свойственна отдельным биохимическим показателям, что, как мы убедились на практике, затрудняет интерпретацию биохимических результатов в работах по определению ПДК, и часто вызывает критику у специалистов, вынужденных учитывать этот показатель в работе.

Точность определения БИИ “априори” должна зависеть от степени охвата биохимическими показателями основных путей метаболизма: гликолиза, пентозофосфатного пути, цикла ди- и трикарбоновых кислот, окислительного фосфорилирования, бета-окисления жирных кислот, путей биосинтеза и распада биопо-

лимеров, пуриновых и пиримидиновых оснований, заменимых жирных кислот, глюконеогенеза, функционирования компонентов соединительной ткани, дыхания, состояния биологических мембран, гормонального статуса, обмена аминокислот, окислительного стресса, иммунной защиты и др. Почти тридцать лет тому назад известный отечественный ученый А.А. Покровский только для адекватной оценки энзиматического статуса клеток при разных патологиях рекомендовал определять в тканях 13 ферментов клеточного ядра, 8 ферментов ядерной оболочки, 29 ферментов митохондрий, 35 ферментов лизосом, 5 ферментов пероксисом, 20 ферментов эндоплазматического ретикулума, 18 ферментов гиалоплазмы, то есть всего 128 ферментов (Покровский, 1969). Только при таком широком биохимическом подходе можно с гарантией оценить характер появившихся при воздействии токсикантов на живой организм отклонений от нормы, выйти на основной механизм патологий, на приоритетные загрязнители и наладить раннюю диагностику тех или иных токсикогенных отклонений от нормы.

Таким образом, задачу, которая была поставлена – найти суммарный биохимический показатель для того, чтобы облегчить интерпретацию биохимических данных при определении ПДК, – мы, как нам кажется, решили. Этот показатель мы назвали биохимическим интегральным индексом (БИИ). Он представляет собой отношение числа резко отклоняющихся от нормы биохимических показателей к общему числу изученных показателей, выраженное в процентах. Чувствительность и точность индекса, по-видимому, зависит от общего числа (до определенного предела, который еще нужно установить) определяемых биохимических тестов и от степени охвата ими различных сторон метаболизма. Величина индекса и характер его изменений прямо пропорциональны дозе воздействия фактора (например, токсиканта), зависит от вида рыбы, ее возраста, от химического состава и концентрации токсиканта. Можно допустить, что этот индекс может иметь более широкое значение для изучения различных не только токсикологических, но и других экологических и патологических процессов, а также для изучения воздействия на рыб изменяющихся экологических факторов. Эти исследования имеют не только теоретическое значение для изучения биохимических механизмов адаптаций, но и для решения практических задач биомониторинга и биотестирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Концепция настоящей книги была сформулирована и частично подготовлена в виде совместных публикаций в журналах и сборниках статей профессором В.С. Сидоровым, ныне покойным, который руководил лабораторией экологической биохимии института биологии КарНЦ РАН в течение 36 лет и одним из первых обосновал необходимость создания системы эколого-биохимического мониторинга и тестирования водоемов по состоянию биохимического метаболизма водных организмов, прежде всего, рыб. За почти 50-летний период был собран огромный экспериментальный материал, полученный в ходе натуральных и модельных исследований, касающийся развития ответных реакций у водных организмов и, прежде всего, у пресноводных рыб при воздействии различных факторов среды, в том числе антропогенных. Биохимические методы позволяют наблюдать изменения в обмене веществ в организме, наступающие, как правило, до появления физиологических и морфологических изменений или отклонений от нормы и дают возможность определить границы адаптационных способностей, выявить фазы воздействия (адаптация, предпатология, патология) и на основании этого, делать выводы о степени устойчивости и чувствительности видов. Рыбопродуктивность численность, плодовитость, размерно-весовой состав популяций естественных водоемов зависят от физиолого-биохимического состояния рыб, о котором можно судить по ряду биохимических показателей. Появление в водоемах повышенных и превышающих допустимые нормы концентраций токсических веществ вызывает нежелательные изменения в воде и кормовых организмах, что приводит к нарушениям клеточного метаболизма и, как следствие, к изменению плодовитости и выживания рыб. Это было показано в наших исследованиях по влиянию на рыб так называемых “промстоков” целлюлозно-бумажного комбината, отходов горнообогатительного производства, компонентов буровых растворов, аммонийных и фосфатных удобрений и др. Было установлено также, что различные виды рыб отличаются друг от друга по характеру ответной реакции и устойчиво-

сти к негативным факторам. Для оценки реактивности метаболизма у рыб в ответ на изменение среды обитания в водоеме был использован большой арсенал биохимических методов, позволяющий оценить вариабельность примерно 150–200 индивидуальных показателей белкового, липидного, углеводного, нуклеопротеидного обмена, энзиматического профиля организмов, тканей, клеток и субклеточных структур тканей рыб. Анализ собственных и литературных материалов позволил предложить и научно обосновать систему биохимических показателей, характеризующих физиолого-биохимическое состояние рыб при воздействии различных факторов среды. При изучении влияния на рыб различных концентраций токсических веществ был предложен к использованию так называемый “биохимический интегральный индекс” (БИИ), имеющий значение как при определении ПДК (предельно-допустимых концентраций веществ), так и при выяснении механизмов развития адаптивных реакций у рыб на биохимическом уровне.

Значение таких исследований состоит не только в теоретической значимости для биологии и экологии, для изучения биохимических механизмов адаптаций, но и для решения практических задач биомониторинга и биотестирования состояния рыб в естественных водоемах и в аквакультуре. Работа вносит вклад также в проблему разработки современных методов оценки экологической ситуации в водоемах. Потребуется еще немало времени и усилий (методических, теоретических и, не в последнюю очередь, финансовых) для того, чтобы усовершенствовать и внедрить эту систему комплексного биохимического тестирования водоемов. Полученные результаты по биохимической индикации состояния рыб и других водных организмов поставили перед нами некоторые новые вопросы и проблемы, для выяснения которых необходимы дальнейшие исследования.

Изложенный выше материал включает лишь небольшую часть имеющихся у нас данных об использовании системы биохимических показателей для индикации воздействия различных факторов среды на рыб. Поэтому в планах авторов подготовка ряда монографий по специфическим проблемам экологической биохимии рыб.

Благодарности

Прежде всего, авторы считают своим долгом выразить искреннюю благодарность своему учителю, заслуженному деятелю науки РФ, доктору биологических наук, профессору Виктору

Сергеевичу Сидорову, а также всем ныне работающим (В.В. Богдан, С.Д. Гурьяновой, П.О. Рипатти, А.Л. Рабиновичу, М.Ю. Крупновой, Е.И. Кяйвярайнен, З.А. Нефедовой, Л.П. Смирнову, Т.Р. Руоколайнен, А.И. Груздеву, Л.М. Зекиной, С.А. Такшееву, Л.В. Марковой Т.А. Ломаевой) и уже по разным причинам, не работающим (Е.И. Лизенко, Р.А. Поповой, О.М. Болговой, В.С. Михкиевой, Л.В. Тойвонен, Н.А. Шишковой, З.А. Бехтеревой, Л.С. Захаровой) сотрудникам лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН, без которых не состоялась бы эта работа. Признательности, на наш взгляд, заслуживают начинающие исследователи, которые не так давно закончили аспирантуру и подготовили, а некоторые из них и защитили кандидатские диссертации – Бондарева Л.А., Мещерякова О.В., Васильева О.Б., Суховская И.В., Морозов Д.Н.

Большую помощь в проведении экспериментальных и полевых работ оказывали сотрудники лаборатории экологии рыб и водных беспозвоночных того же института, которой в разные годы руководили О.И. Потапова, Ю.А. Смирнов, О.П. Стерлигова. В течение длительного времени мы сотрудничали с группой исследователей из ВНИИПРХа, возглавляемой А.А. Яржомбеком (п. Рыбное Дмитровского р-на Московской области), СеверьбНИИпроекта (Петрозаводск), ПИНРО им. Н.М. Книпповича (Мурманск), ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН (Москва), Института биологии развития им. Н.К. Кольцова (Москва), Института биохимии им. А.Н. Баха, ИПЭС РАН (Апатиты), ИВПС КарНЦ РАН (Петрозаводск), ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН (Борок, Ярославская обл.). В совместных исследованиях принимали участие также студенты и аспиранты кафедры молекулярной биологии, биологической и органической химии Петрозаводского госуниверситета, всех их, к сожалению, невозможно здесь перечислить.

Авторы искренне признательны научному редактору книги профессору М.И. Шатуновскому за внимание к работе и сделанные очень ценные замечания и правки, а также Секции общей биологии отделения биологических наук РАН за поддержку в издании этой работы.

Мы признательны членам Ученого совета Института биологии КарНЦ РАН и другим сотрудникам нашего института за те многочисленные дискуссии, доброжелательные советы и замечания, которые были сделаны при обсуждении материалов, представленных в книге. Авторы также выражают благодарность рецензентам рукописи монографии – чл.-корреспон-

денту РАН, профессору А.Ф. Титову и профессору ПетрГУ Л.П. Рыжкову.

В оформлении работы значительную помощь оказала сотрудница лаборатории экологической физиологии растений Института биологии КарНЦ РАН, д.б.н. М.И. Сысоева, а также сотрудники лаборатории экологической биохимии С.А. Такшеев, Л.М. Зекина, Л.А. Бондарева.

Авторы будут крайне признательны за любые замечания и отзывы на опубликованную работу и выражают надежду, что она будет интересна широкому кругу читателей – биохимикам, физиологам, ихтиологам, гидробиологам, токсикологам, экологам и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абелев Г.И.* Воспаление // Сорос. образов. журн. 1996. № 10. С. 28–32.
2. *Алабастер Д., Ллойд Р.* Критерии качества воды для пресноводных рыб. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1984. 343 с.
3. *Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж.* и др. Молекулярная биология клетки. М: Мир, 1994. С. 278–279, 516.
4. *Александров В.Я.* Клетки, макромолекулы и температура. М.: Наука, 1975. 329 с.
5. *Аmineва В.А., Яржомбек А.А.* Физиология рыб. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1984. 200 с.
6. *Андрушайтис Г.П., Бойкова Э.С.* Действие цинка и свинца на солонатоводных простейших // Экспериментальная водная токсикология. Рига, 1982. Вып. 8. С. 7–18.
7. *Антонов В.Ф.* Липиды и ионная проницаемость мембран. М., 1982. 150 с.
8. *Арчаков А.И.* Микросомальное окисление. М.: Наука, 1975. 327 с.
9. *Афанасьев Ю.И., Ноздрин В.И.* Возможная роль лизосом в стресс-реакции клетки // Структура и функции лизосом: Тез. докл. Междунар. симпоз. М., 1976. С. 30–32.
10. *Баранникова И.А.* Функциональные основы миграций рыб. Л.: Наука, 1975. 210 с.
11. *Баранова Ф.С., Казакова О.В., Локшина Л.А., Попова Л.К.* Влияние катепсина D на интенсивность трансформации лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* // Структура и функции лизосом: Тез. докл. II Всесоюз. симпоз. Новосибирск, 1980. С. 24–25.
12. *Бауер О.Н., Мусселиус В.А., Николаева В.М., Стрелков Ю.А.* Ихтиопатология. М.: Пищ. пром-сть, 1977. 432 с.
13. *Беляев В.И., Николаев В.М., Шульман Г.Е., Юнева Т.В.* Тканевый обмен у рыб. Киев: Наук. думка, 1983. 144 с.
14. *Бергер В.Я.* Адаптации морских моллюсков к изменениям солености среды. Л.: Наука, 1986. 214 с.
15. *Билько В.П.* Выживаемость рыб в раннем онтогенезе в зависимости от pH водной среды: (Обзор) // Гидробиол. журн. 1994. Т. 30, № 4. С. 22–30.
16. Биологические процессы в загрязненных модельных водоемах. М., 1984. 192 с.

17. Биотест: Интегральная оценка здоровья экосистем и отдельных видов / Ред. В.М. Захаров, Д.М. Кларк. М., 1993. 68 с.
18. Биохимические методы в экологических и токсикологических исследованиях. Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 1993. 234 с.
19. Биохимические особенности болезней рыб / Под ред. В.С. Сидорова, Р.У. Высоцкой. Петрозаводск: Карел. науч. центр АН СССР, 1991. 151 с.
20. Биохимия молоди пресноводных рыб / Под ред. В.С. Сидорова. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1985. 144 с.
21. Биохимия молоди рыб в зимовальный период / Под ред. В.С. Сидорова, Н.Н. Немовой. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1987. 144 с.
22. Биоэнергетика и рост рыб / Под ред. У. Хоара, Д. Рэндалла, Дж. Бретта. М.: Мир, 1983. 403 с.
23. *Birger T.I.* Метаболизм водных беспозвоночных в токсической среде. Киев: Наук. думка, 1979. 190 с.
24. *Богдан В.В.* Липиды молоди карпа в процессе зимовки: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Харьков, 1986. 16 с.
25. *Богдан В.В., Смирнов Л.П.* Влияние аэромонадной инфекции на мембранные липиды некоторых тканей питающихся и голодающих годовиков карпа *Cyprinus carpio* L. // *Вопр. ихтиологии.* 2000. Т. 40, № 1. С. 128–132.
26. *Богдан В.В., Немова Н.Н., Руоколайнен Т.Р.* Влияние ртути на состав липидов печени и мышц // Там же. 2002. Т. 42, № 2. С. 259–263.
27. *Богдан В.В., Зекина Л.М., Такшеев С.А.* и др. Желчнокислотный состав желчи у щуки *Esox lucius* L. при техногенном воздействии // Там же. 2000. Т. 40, № 5. С. 573–576.
28. *Болгова О.М.* Липидный состав речной и заводской молоди лосося: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1978. 22 с.
29. *Болгова О.М., Полина А.В., Рыжков Л.П.* и др. Влияние линетола на липидный и жирнокислотный состав мышц лосося // *Вопросы лососевого хозяйства на Европейском Севере.* Петрозаводск, 1987. С. 99–102.
30. *Болгова О.М., Сидоров В.С., Смирнов Ю.А., Сорвачев К.Ф.* Жирнокислотный состав полостного жира молоди лосося в естественных условиях и при заводском выращивании // *Вопр. ихтиологии.* 1977. Т. 17, № 6 (107). С. 1090–1096.
31. *Болдырев А.А.* Na,K-АТФаза // *Успехи биол. химии.* М.: Наука, 1977. Т. 18. С. 122–139.
32. *Болдырев А.А.* Ионные градиенты в жизни клетки // *Природа.* 1992. № 7. С. 78–83.
33. *Большаков В.Н.* Пути приспособления мелких млекопитающих к горным условиям. М.: Наука, 1972. 200 с.
34. *Борисов Ю.А., Соболева О.Ю., Суглобова Е.Д., Федорович Е.Е.* Транспорт ионов Na⁺ и K⁺ через мембрану эритроцитов человека при формировании в ней нистатиновых каналов в условиях *in vitro*: Некоторые особенности и анализ процессов // *Цитология.* 1994. Т. 36, № 5. С. 427–436.
35. *Брагинский Л.П.* Пестициды и жизнь водоемов. Киев: Наук. думка, 1972. 227 с.
36. *Брагинский Л.П., Щербань Э.П.* Острая токсичность металлов для водных беспозвоночных при различных температурных условиях // *Гидробиол. журн.* 1978. Т. 14, № 6. С. 86–92.
37. *Браун А.Д., Моженок Т.П.* Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. Л.: Наука, 1987. 232 с.
38. *Браше Ж.* Биохимическая эмбриология. М.: Изд-во иностр. лит. 1961. 326 с.
39. *Быховская-Павловская И.Е.* Паразитологическое исследование рыб. Л.: Наука, 1969. 109 с.
40. *Васильев А.В.* Активность катепсинов у различных животных в норме и при изменении характера питания: Автореф. ... дис. канд. биол. наук. М., 1979. 24 с.
41. *Васильев А.В., Звягина О.П.* Влияние длительного голодания на активность катепсинов и некоторых липолитических ферментов печени крыс // *Вопр. питания.* 1978. № 5. С. 31–33.
42. *Ведемейер Г.А., Мейер Ф.П., Смит Л.* Стресс и болезни рыб. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1981. 128 с.
43. *Велдре И.А., Карлова С.А.* О нитратах в питьевой воде: (Обзор) // *Гигиена и санитария.* 1991. № 10. С. 39–40.
44. *Вельш У., Шторх Ф.* Введение в цитологию и гистологию животных. М.: Мир, 1976. 259 с.
45. *Веселов Е.А.* Определение допустимой нагрузки промышленных стоков на рыбохозяйственные водоемы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Петрозаводск, 1950. 19 с.
46. *Веселов Е.А.* Патологические, функциональные и морфологические изменения у пресноводных беспозвоночных и рыб под влиянием интоксикации // *Норма и патология в водной токсикологии.* Байкальск, 1977. С. 111–114.
47. Влияние загрязняющих веществ на гидробионтов и экосистемы водоемов. Материалы 2-х сов.-амер. симпозиумов. Л.: Наука, 1979. 352 с.
48. Влияние фенольных соединений на гидробионтов. Иркутск: Иркут. гос. ун-т, 1981. 142 с.
49. *Волкова Н.А., Грибарян Г.М., Карлюк И.А.* Влияние содержания цинка в рационе на течение хронической кадмиевой интоксикации в эксперименте // *Вопр. питания.* 1994. № 5. С. 21–23.
50. *Володин В.М., Межнин Ф.И., Кузьмина В.В.* Экспериментальное изучение резорбции икры леща *Abramis brama* (L.) // *Вопр. ихтиологии.* 1974. Т. 14, вып. 2(85). С. 249–263.
51. *Врочинский К.К., Телитченко М.М., Мережко А.И.* Гидробиологическая миграция пестицидов. М.: Изд-во МГУ, 1980. 120 с.
52. *Высоцкая Р.У.* Влияние микроэлементов на лизосомы рыб в раннем онтогенезе // *Биохимия экто- и эндотермных организмов.* Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1989. С. 104–111.
53. *Высоцкая Р.У.* Лизосомальная ферментная система в адаптивных реакциях организма // 50 лет Карельскому научному центру Россий-

- ской академии наук: Тез. докл. юбил. науч. конф. Петрозаводск, 1996. С. 41–42.
54. *Высоцкая Р.У.* Лизосомальные ферменты у рыб и влияние на них природных, антропогенных и патогенных факторов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Петрозаводск, 1999. 42 с.
 55. *Высоцкая Р.У., Михкиева В.С.* Некоторые ферментные системы икры форели при токсическом воздействии // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: Тез. докл. XIII сес. Ученого совета. Сыктывкар, 1990. С. 69.
 56. *Высоцкая Р.У., Рипатти П.О.* Воздействие детергентов на структуру и функционирование лизосом у пресноводных рыб // Физиология и токсикология гидробионтов. Ярославль: Яросл. гос. ун-т, 1988. С. 100–106.
 57. *Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р.* Лизосомальные ферменты у рыб в условиях антропогенного загрязнения водоемов // Крупные озера Европы – Ладожское и Онежское: (Настоящее и будущее): Тез. докл. Междунар. конф. Петрозаводск: Изд-во Петрозавод. ун-та, 1996. С. 110–112.
 58. *Высоцкая Р.У., Сидоров В.С.* Участие лизосомального аппарата в ответной реакции организма на воздействие антропогенных факторов внешней среды // Сравнительные аспекты биохимии рыб и некоторых других животных. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1981. С. 5–18.
 59. *Высоцкая Р.У., Такшеев С.А.* Оценка экологического состояния водоема по активности ферментов в тканях рыб в условиях техногенного загрязнения // Адаптации животных и растений к условиям Арктических морей: Тез. докл. Междунар. семинара, посвящ. памяти акад. Е.М. Крепса, г. Мурманск, 11–13 мая 1999 г. Апатиты: Кол. науч. центр РАН, 1999. С. 22–27.
 60. *Высоцкая Р.У., Каймина Н.В., Сидоров В.С.* Влияние различных солей калия на активность некоторых ферментов развивающейся икры радужной форели // Гидробиол. журн. 2000. Т. 36, № 6. С. 82–91.
 61. *Высоцкая Р.У., Крупнова М.Ю., Мигаловский И.П.* Ферменты лизосом в раннем развитии сига: Влияние ионов цинка // Реакция гидробионтов на абиотические воздействия: (К разработке теоретических основ биотестирования). Ярославль: Яросл. ун-т, 1984. С. 54–60.
 62. *Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р., Крупнова М.Ю.* Ферментные системы лизосом у рыб при голодании // Экологические проблемы онтогенеза рыб: Физиолого-биохимические аспекты. М.: Изд-во МГУ, 2001. С. 178–187.
 63. *Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р., Сидоров В.С.* Изменение активности кислых гидролаз при действии на изолированные лизосомы рыб сульфатного щелока // Гидробиология Выгозерского водохранилища. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1978. С. 156–165.
 64. *Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р., Сидоров В.С.* О роли кислой фосфатазы в адаптивных реакциях организма к температурному фактору // Экологическая энергетика животных: Тез. докл. Всесоюз. совещ. Пущино, 1988. С. 32–33.
 65. *Высоцкая Р.У., Смирнов Л.П., Ванятинский В.Ф.* Влияние инвазии ихтиофтириусом на белковый состав и активность лизосомальных ферментов годовиков карпа // Биохимия молоди пресноводных рыб. Петрозаводск, 1985. С. 40–44.
 66. *Высоцкая Р.У., Заличева И.Н., Волков И.В.* Влияние соединений азота на физиолого-биохимические показатели радужной форели в раннем онтогенезе // VIII Науч. конф. по экол. физиологии и биохимии рыб: Тез. докл. Петрозаводск, 1992. С. 59–60.
 67. *Высоцкая Р.У., Стерлигова О.П., Сидоров В.С.* Лизосомальные и некоторые другие ферменты в тканях леща *Abramis brama* в период зимовки // Вопр. ихтиологии. 1998. Т. 38, № 2. С. 267–272.
 68. *Высоцкая Р.У., Шустова Н.К., Заличева И.Н.* Изменение активности лизосомальных ферментов у личинок онежской палии и радужной форели под влиянием токсикантов // Биохимические методы в экологических и токсикологических исследованиях. Петрозаводск, 1993. С. 63–73.
 69. *Высоцкая Р.У., Иешко Е.П., Яковлева К.Е., Сереженко Л.П.* Лизосомальная и энергетическая ферментные системы у карася при некоторых патологических состояниях // Биохимические особенности болезней рыб. Петрозаводск: Карел. науч. центр АН СССР, 1991. С. 93–99.
 70. *Высоцкая Р.У., Лызлова М.Ю., Юровицкий Ю.Г., Сидоров В.С.* Изменение активности лизосомальных ферментов печени рыб при действии экологических факторов // Изв. РАН. Сер. биол. 1994. № 4. С. 611–616.
 71. *Высоцкая Р.У., Крупнова М.Ю., Ломаева Т.А., Такшеев С.А.* Влияние компонентов буровых растворов на активность лизосомальных и антиоксидантных ферментов камбалы // Современные проблемы водной токсикологии: Тез. докл. Всеросс. конф., 19–21 ноября 2002 г. Борок: Ин-т биологии внутр. вод. РАН, 2002. С. 30–31.
 72. *Высоцкая Р.У., Немова Н.Н., Юхименко Л.Н., Щербина Т.В.* Лизосомальные ферменты у карпа при бактериальном заражении // Биохимия молоди пресноводных рыб. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1985. С. 44–49.
 73. *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, 1989. С. 98–104.
 74. *Выхристюк Л.А., Зинченко Т.Д., Шитиков В.К.* Комплексная оценка экологического состояния равнинных рек в условиях антропогенных воздействий // Научные аспекты экологических проблем России: Тез. докл. Всерос. конф. М., 2001. С. 70.
 75. *Гапеева М.В., Цельмович О.Л.* Статистические связи концентрации меди и цинка в воде, донных отложениях, олигохетах и лещах Ры-

- бинского водохранилища // Экспериментальная водная токсикология. Рига, 1991. Вып. 15. С. 138–143.
76. *Гвозденко С.И., Филатова Т.А., Смыр Т.М., Филатов О.В.* Оценка адекватными методами исследования токсического действия фунгицидных препаратов на гидробионтов // Первый конгресс ихтиологов России. М.: ВНИРО, 1997. С. 215.
 77. Гидробиология пруда-накопителя и морфо-физиологические адаптации рыб / О.М. Кожова, Н.М. Пронин, А.Г. Литвинов, А.М. Бейм и др. Улан-Удэ: БФ СО АН СССР, 1988. 147 с.
 78. *Голубович Е.Я., Орлянская Р.Л.* Влияние свинца на интенсивность обмена РНК в клеточных фракциях семенников белых крыс // Токсикология новых промышленных химических веществ. М.: Медицина, 1975. Вып. 14. С. 22–26.
 79. *Гончарова А.В.* Сезонные и возрастные изменения активности щелочной фосфатазы в чешуе рыбьинского леща // Тр. Ин-та биологии внутр. вод АН СССР. 1981. Вып. 47(50). С. 147–155.
 80. *Горизонтов П.Д.* Адаптационный синдром // БМЭ. М.: Сов. энциклопедия, 1974. Т. 1. С. 63–64.
 81. *Грубинко В.В., Смольский А.С., Коновец И.Н., Арсан О.М.* Гемоглобин рыб при действии аммиака и солей тяжелых металлов // Гидробиол. журн. 1995. Т. 31, № 4. С. 82–87.
 82. *Груздев А.И., Касаткина С.В.* Активность изоферментов лактатдегидрогеназы икры сига, развивающейся при повышенных концентрациях ионов цинка и никеля // Сравнительная биохимия водных животных. Петрозаводск, 1983. С. 134–140.
 83. *Груздев А.И., Сидоров В.С.* Регуляция гликолиза изоферментами лактатдегидрогеназы в тканях радужной форели при влиянии абетиновой кислоты // Физиология и биохимия гидробионтов. Ярославль: Яросл. гос. ун-т, 1987. С. 12–18.
 84. *Груздев А.И., Юровицкий Ю.Г., Сидоров В.С.* и др. Изоферменты лактатдегидрогеназы в норме и при расслоении мышц у волжского осетра // Физиолого-биохимический статус волго-каспийских осетровых в норме и при расслоении мышечной ткани: (Кумулятивный политоксикоз). Рыбинск: Ин-т биологии внутр. вод, 1990. С. 229–233.
 85. *Грушко Я.М.* Сброс лигнина в водоемы с промышленными сточными водами // Влияние фенольных соединений на гидробионтов. Иркутск: Иркут. гос. ун-т, 1981. С. 109–116.
 86. *Гуляева Л.Ф., Гришанова А.Ю., Громова О.А.* и др. Микросомная монооксигеназная система живых организмов в биомониторинге окружающей среды: Аналитический обзор. Новосибирск: Ин-т молекуляр. патологии и экол. биохимии СО РАМН; ГПНТБ СО РАН, 1994. 100 с.
 87. *Гурьянова С.Д.* Липидный и аминокислотный состав плероцеркоидов цестод рода *Diphyllobothrium*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1982. 25 с.
 88. *Гуткин В.С., Горбатов В.А., Феоктистов Т.А.* Лизосомы в антибактериальном иммунитете животных. М.: Колос, 1984. 304 с.
 89. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты: В 3 томах. М.: Мир, 1982. Т. 1. 389 с.; Т. 2. 806 с.; Т. 3. 1120 с.
 90. *Дмитриева А.Г., Кожанова О.Н., Дронина Н.Л.* Физиология растительных организмов и роль металлов. М.: Изд-во МГУ, 2002. 160 с.
 91. *Догель В.А.* Паразитарные заболевания рыб. М.; Л.: Сельколхозгиз, 1932. 152 с.
 92. *Дубровина Л.В., Калинин Н.М., Лозовик П.А.* Факторы токсичности для гидробионтов техногенных вод Костомукшского ГОКа // Влияние техногенных вод горнообогатительного комбината на водоемы системы реки Кенти. Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 1995. С. 15–25.
 93. *Евтушенко Н.Ю.* Динамика микроэлементного состава тканей карпа в условиях его садкового выращивания // Гидробиол. журн. 1994. Т. 30, № 4. С. 36–42.
 94. *Жоробекова Ш.Ж., Кыдралиева К.А.* Ингибирование активности протеолитических ферментов гуминовыми кислотами // Биол. науки. 1991. № 10. С. 151–154.
 95. *Жуковский Ю.Г.* Влияние винной кислоты на гидролитическую и трансферазную активность кислой фосфатазы простаты // Биохимия. 1965. Т. 30, № 3. С. 482–486.
 96. *Загорских О.М., Сидоров В.С.* Липидный состав органов леща в конце зимовки // Биохимия экто- и эндотермных организмов. Петрозаводск, 1989. С. 13–19.
 97. *Зайцева О.В., Ковалев В.В., Шувалова Н.Е.* Современное биотестирование вод, требования к тест-организмам и тест-функциям с позиций сравнительной физиологии и физиологии адаптационных процессов // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1994. Т. 30, № 4. С. 575–592.
 98. *Запруднова Р.А.* Изменение концентрации калия в плазме крови леща *in vitro* при стрессе и в разные периоды годового цикла. 2. Изменение в разные периоды годового цикла // Биология внутр. вод: Информ. бюл. 1989. № 84. С. 41–44.
 99. *Зекина Л.М., Рипатти П.О., Сидоров В.С.* Ихтиопатологическое тестирование на основе анализа желчных кислот // Методы ихтиотоксикологических исследований. Тез. докл. Первого Всесоюз. симпозиума по методам ихтиотоксикол. исслед. Л.: ГосНИОРХ, НПО "Промрыбвод", 1987. С. 37–39.
 100. *Зимаков И.Е., Комарова А.В.* Загрязнение рыбохозяйственных водоемов сточными водами животноводческих комплексов // Эксперим. вод. токсикология. 1991. Вып. 15. С. 89–92.
 101. *Зотиков Л.А., Пинчук В.Г.* Некоторые аспекты проблемы лизосом // Цитология. 1969. Т. 11, № 10. С. 1205–1220.
 102. *Иванова Р.П., Высоцкая Р.У., Куккарина О.И.* Исследование дыхания и активности ферментов радужной форели на ранних этапах развития при хроническом воздействии ортофосфата натрия // Биохимия экто- и эндотермных организмов в норме и при патологии. Петрозаводск, 1990. С. 139–145.

103. *Иванова Р.П., Высоцкая Р.У., Гурьянова С.Д., Зубкович Э.С.* Изменение физиолого-биохимических показателей радужной форели при хроническом воздействии некоторых токсикантов // Биохимические особенности болезней рыб. Петрозаводск, 1991. С. 126–133.
104. *Иващенко А.Т.* Анионные аденозинтрифосфатазы. Алма-Ата: Наука, КазССР, 1982. 138 с.
105. *Ивлева Е.В., Шульман Г.Е.* О связи активности щитовидной железы с динамикой содержания жира у рыб // Вопр. ихтиологии. 1991. Т. 31, № 6. С. 1036–1039.
106. *Иешко Е.П., Высоцкая Р.У., Сереженко Л.П.* Паразито-хозяйные отношения как неспецифический адаптивный синдром // Эколого-популяционный анализ паразитов и кровососущих членистоногих. Петрозаводск: Карел. науч. центр АН СССР, 1991. С. 103–109.
107. *Ильницкий А.П., Королев А.А., Худолей В.В.* Канцерогенные вещества в водной среде. М.: Наука, 1993. 222 с.
108. *Какоткин Н.М., Гурьянова С.Д., Сидоров В.С., Лукьяненко В.И.* Свободный и связанный оксипролин в мышцах и крови русского осетра в норме и при расслоении мышечной ткани // Физиолого-биохимический статус волго-каспийских осетровых в норме и при расслоении мышечной ткани: (Кумулятивный политокикоз). Рыбинск: Ин-т биологии внутр. вод, 1990. С. 234–239.
109. *Калиман П.А., Шаламов Р.В., Загайко А.А.* Влияние хлорида кобальта на содержание липидов и липопротеинов в печени и сыворотке крови крыс // Биохимия. 1997. Т. 62, № 7. С. 850–857.
110. *Калинкина Н.М., Кухарев В.И., Морозов А.К.* и др. Критические уровни минерального загрязнения экосистемы р. Кенти // Гидрологические проблемы Карелии и использование водных ресурсов. Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 2003. С. 103–110.
111. *Карменский В.М.* Синдром дефицита цинка // Вопросы питания. 1980. № 1. С. 10–18.
112. *Карневич А.Ф., Коржуев П.А., Строганов Н.С.* Задачи экологической физиологии рыб в свете современных требований // Современные вопросы экологической физиологии рыб. М.: Наука, 1979. С. 3–11.
113. *Карпович Т.А.* Внешнее дыхание и сердечная деятельность у хариусов в норме и при отравлении сульфатом меди // Физиология и биохимия гидробионтов. Ярославль, 1987. С. 139–147.
114. *Касавина Б.С., Сергеев П.В., Чеснокова Н.Б.* Лизосомальные ферменты тканей глаза при воздействии гидрокортизона // Докл. АН СССР. 1972. Т. 206, № 6. С. 1479–1482.
115. *Кауфман Б.З.* Преферентное поведение эктотермных позвоночных. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1989. 149 с.
116. *Кауфман Б.З.* Преферентное поведение беспозвоночных: (Абиотические факторы среды). Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 1995. 205 с.
117. *Кауфман З.С.* Влияние лигнина, метанола и некоторых нефтепродуктов на личиночные стадии ручейников *Limnophilus stigma* Curt и *Chaetopteryx salbergi* Mc. Lach // Гидробиология Выгозерского водохранилища. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1978. С. 165–171.
118. *Кашулина Н.А.* Ихтиологические основы биоиндикации загрязнения среды тяжелыми металлами: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Петрозаводск, 2000. 42 с.
119. *Кашулин Н.А., Лукин А.А., Амундсен П.-А.* Рыбы пресных вод Субарктики как биоиндикаторы техногенного загрязнения. Апатиты: Кол. науч. центр РАН, 1999. 142 с.
120. *Кесельман М.Л., Гвозденко С.И., Кузнецова Л.Я.* Свободно радикальные процессы, активность антиоксидантных механизмов и структурно-функциональное состояние мембран в тканях рыб при воздействии пиретроидных пестицидов // Первый конгресс ихтиологов России. М.: ВНИРО, 1997. С. 220–221.
121. *Кирпичников В.С.* Генетика и селекция рыб. Л.: Наука, 1987. 520 с.
122. *Китаев С.П.* Устойчивость и чувствительность гидробионтов к действию промышленных сточных вод сульфат-целлюлозного завода // Материалы VII Медико-биол. конф. Петрозаводск, 1974. С. 257–260.
123. *Китаев С.П.* Экологические основы биопродуктивности озер разных природных зон. М.: Наука, 1984. 208 с.
124. *Кляшторин Л.Б.* Водное дыхание и кислородные потребности рыб. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1982. 168 с.
125. *Кобылянский Л.Н.* Влияние пиридоксина, рибофлавина и глутаминовой кислоты на активность лизосомальных гидролаз в печени и сыворотке крови крыс при травматическом стрессе // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1982. № 11. С. 47–50.
126. *Кобылянский Л.Н.* Влияние адреналина на функциональное состояние лизосом печени, активность гидролаз в сыворотке крови крыс при тяжелой механической травме // Там же. 1983. Т. 95, № 3. С. 22–25.
127. *Коваленко В.Д., Клоченко П.Д.* Влияние углеаммонийных солей на газообмен у рыб // Гидробиол. журн. 1994. Т. 30, № 4. С. 43–46.
128. *Козловская В.И., Павлов Д.Ф.* Биохимические тесты в оценке качества воды // V Всесоюз. конф. по вод. токсикологии. М., 1988. С. 39.
129. *Колупаев Б.И.* Дыхание гидробионтов в норме и патологии. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1989. 189 с.
130. *Комов В.Т.* Природное и антропогенное закисление малых озер Северо-Запада России: Причины, последствия, прогноз: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 1999. 46 с.
131. *Комишилов Н.Ф.* Канифоль, ее состав и строение смоляных кислот. М.: Лесн. пром-сть, 1965. 163 с.
132. *Коновец И.Н., Кулик В.А., Арсан О.М.* и др. Влияние свинца на азотистый обмен у карпа при различной температуре водной среды // Гидробиол. журн. 1994. Т. 30, № 5. С. 78–86.

133. Коржуев П.А. О биохимических аспектах обмена веществ рыб // Современные вопросы экологической физиологии рыб. М.: Наука, 1979. С. 11–19.
134. Коровкин Б.Ф. Циклазная система и активность лизосомальных ферментов в норме и при патологии // Вестн. АМН СССР. 1982. № 9. С. 69–74.
135. Короленко Т.А. Биохимические аспекты лизосомотропизма. Новосибирск: Наука, 1983. 120 с.
136. Кох В., Банк О., Йенс Г. Рыбоводство. М.: Пищ. пром-сть, 1980. 216 с.
137. Коцарь Н.И. Влияние пролактина на энергетический обмен у рыб при изменении температуры водной среды // Гидробиол. журн. 1988. Т. 24, № 6. С. 40–45.
138. Кочарян А.Г., Морковкина И.К., Сафронова К.И. Поведение ртуть в водохранилищах и озерах // Поведение ртути и других тяжелых металлов в экосистемах. Новосибирск, 1989. Ч. 3. С. 88–127.
139. Кошелев Б.В. Экология размножения рыб. М.: Наука, 1984. 310 с.
140. Кошелев Б.В. Биоиндикация водных экосистем на основании анализа особенностей гаметогенеза и размножения рыб // Животные в биоиндикации состояния среды. М.: Наука, 1991. С. 166–170.
141. Кравченко Л.В., Хвыля С.И., Авреньева Л.И. и др. Влияние Т-2 токсина на ультраструктуру и активность органеллспецифических ферментов некоторых органов крыс // Цитология. 1983. Т. 25, № 11. С. 1264–1269.
142. Крепс Е.М. О приспособительной роли клеточных липидов // IV Всесоюз. биохим. съезд: Тез. симпоз. докл. М.: Наука, 1979. С. 34–36.
143. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Л.: Наука, 1981. 339 с.
144. Крупнова М.Ю. Лизосомальные ферменты рыб при различных типах голодания: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Харьков, 1986. 23 с.
145. Крупнова М.Ю., Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р. Изменение активности ферментов лизосом у форели при голодании // Укр. биохим. журн. 1985. Т. 57, № 3. С. 62–65.
146. Крылов О.Н. Влияние поверхностно-активных веществ на рыб // Биологическая продуктивность водоемов Сибири. М.: Наука, 1969. С. 276–279.
147. Кудрявцева Г.В. Эколого-физиологические особенности и роль пентозофосфатного пути обмена углеводов в адаптации гидробионтов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1990. 35 с.
148. Кудрявцева Г.В., Шишкин В.И. Надежность и качество ферментативных функциональных систем. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 1996. 68 с.
149. Кузьмина В.В. Роль индуцированного аутолиза в процессах пищеварения рыб // Физиол. журн. 1993. Т. 79, № 6. С. 102–108.
150. Кузьмина В.В. Вариабельность активности некоторых ферментов слизистой кишечника рыб // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1994. Т. 30, № 6. С. 753–761.
151. Кузьмина В.В., Гельман А.Г. Особенности становления пищеварительной функции рыб // Вопр. ихтиологии. 1998. Т. 38, № 1. С. 113–122.
152. Кулебакина Л.Г., Пивоварова И.Б. Накопление и детоксикация кадмия морскими двусторчатными моллюсками // Тез. докл. V Всесоюз. конф. по водн. токсикологии. Одесса, 1988. С. 89–90.
153. Куровская Л.Я. Адаптационные изменения у сеголеток канального сома при заражении паразитической инфузорией *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet // Гидробиол. журн. 1998. Т. 34, № 1. С. 91–98.
154. Кустова С.Д. Синтетические исследования в области абиеиновой кислоты: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1953. 20 с.
155. Кухарев В.И., Пальшин Н.И., Сало Ю.А. Общая характеристика озерной системы Кенти-Кенто // Влияние техногенных вод горнообогатительного комбината на водоемы системы реки Кенти. Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 1995. С. 4–8.
156. Кухарев В.И., Власова Л.И., Калинин Н.М. и др. Исследование влияния техногенных вод Костомукшского ГОК на водоемы системы р. Кенти (бассейн р. Кемь) методами гидроэкологии // Антропогенное воздействие на природу Севера и его экологические последствия: Тез. докл. Всерос. совещ. Апатиты, 1998. С. 68–70.
157. Кярнер Ю.К. Роль лизосом в дифференцировке и функционировании клеток развивающихся и дефинитивных тканей: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Л., 1983. 41 с.
158. Лав Р.М. Химическая биология рыб. М.: Пищ. пром-сть, 1976. 348 с.
159. Лесюк И.И., Решетило С.Г., Костюк А.О. и др. Изучение токсичности некоторых неонов для развивающихся эмбрионов личинок и сеголеток радужной форели // Эксперим. вод. токсикология. 1984. С. 56–67.
160. Лизенко Е.И. Содержание липидов в некоторых органах крупной ряпушки (*Coregonus albula* L.) в зависимости от некоторых экологических и физиологических факторов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 1973. 27 с.
161. Лизенко Е.И. Липидный состав и липолитические ферменты лизосом // Успехи соврем. биологии. 1982. Т. 94, вып. 1(4). С. 94–110.
162. Лизенко Е.И., Нефедова З.А. Влияние ионов никеля на липидный состав сига в процессе эмбриогенеза // Вопросы сравнительной физиологии и водной токсикологии. Ярославль: Яросл. ун-т, 1987. С. 102–108.
163. Лизенко Е.И., Сидоров В.С., Потапова О.И. Сезонные изменения липидного состава органов и тканей крупной ряпушки озер Карелии // Вопр. ихтиологии. 1975. Т. 15. С. 519–526.
164. Лизенко Е.И., Сидоров В.С., Нефедова З.А., Потапова О.И. О содержании липидных компонентов в икре и молоках ряпушки // Там же. 1979. Т. 19. С. 369–370.
165. Лизенко Е.И., Загорских О.М., Болгова О.М. и др. Липидный состав печени, почек, мышц и желчи осетра и стерляди в норме и при расслоении мышц // Физиолого-биохимический статус волго-кас-

- пийских осетровых в норме и при расслоении мышечной ткани: (Кумулятивный политоксикоз). Рыбинск: Ин-т биологии внутр. вод, 1990. С. 216–224.
166. *Линник П.Н., Набиванец Б.И.* Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. Л.: Гидрометеоздат, 1986. 272 с.
167. *Линник П.Н., Набиванец Ю.Б., Искра И.В., Чубарь Н.И.* Комплексобразующая способность растворенных органических веществ поверхностных вод как составная часть “буферной емкости” водных экосистем // *Гидробиол. журн.* 1994. Т. 30, № 5. С. 87–99.
168. *Ложниченко О.В., Куренкова М.П., Федорова Н.Н.* Влияние кумуляции тяжелых металлов в селезенке на ее кроветворную функцию // *Материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 70-летию АГТУ. Астрахань, 2000.* Т. 2. С. 249–250.
169. *Лозовик П.А.* Критерии оценки антропогенного влияния на водные экосистемы // *Антропогенное воздействие на природу Севера и его экологические последствия: Тез. докл. Всерос. совещ. Апатиты, 1998.* С. 36–37.
170. *Ломакина Л.В., Шугалей В.С.* Влияние акклиматизации к холоду на активность пептидгидролаз в обогащенных лизосомами фракциях тканей мозга и печени крыс // *Физиол. журн. СССР.* 1980. Т. 66, № 3. С. 400–403.
171. *Лукьяненко В.И.* Токсикология рыб. М.: Пищ. пром-сть, 1967. 216 с.
172. *Лукьяненко В.И.* Общая ихтиотоксикология. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1983. 320 с.
173. *Лукьяненко В.И.* Экологические аспекты ихтиотоксикологии. М.: Агропромиздат, 1987. 240 с.
174. *Лукьяненко В.И.* Иммунобиология рыб: Врожденный иммунитет. М.: Агропромиздат, 1989. 271 с.
175. *Лукьяненко В.И.* Заключение // *Физиолого-биохимический статус волго-каспийских осетровых в норме и при расслоении мышечной ткани: (Кумулятивный политоксикоз) / Отв. ред. В.И. Лукьяненко.* Рыбинск: Ин-т биологии внутр. вод, 1990. С. 254–259.
176. *Лукьяненко В.И., Карпович Т.А.* Биотестирование на рыбах токсичности сточных вод: (Методические рекомендации). Рыбинск: Ин-т биологии внутр. вод, 1989. 96 с.
177. *Лукьяненко В.И., Васильев А.С., Лукьяненко В.В.* Гетерогенность и полиморфизм гемоглобина рыб. СПб.: Наука, 1991. 392 с.
178. *Майер Ф., Мерле П.* Коллаген и гидрооксипролин в токсикологических исследованиях на рыбах // *Влияние загрязняющих веществ на гидробионтов и экосистемы водоемов.* Л., 1979. С. 310–319.
179. *Максимович А.А.* Особенности углеводного обмена у тихоокеанских лососей в условиях полного голодания // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1988. № 4. С. 500–508.
180. *Максимович А.А., Серков В.М.* Функциональная морфология хлоридных клеток жаберного эпителия тихоокеанских лососей в сре-
дах различной солёности // *Цитология.* 1994. Т. 36, № 2. С. 148–155.
181. *Маляревская А.Я.* Обмен веществ у рыб в условиях антропогенного эвтрофирования водоемов. Киев: Наук. думка, 1979. 256 с.
182. *Маляревская А.Я., Биргер Т.И., Арсан О.М.* Влияние синезеленых водорослей на обмен веществ у рыб. Киев, 1978. 193 с.
183. *Мартемьянов В.И.* Стресс у рыб: Защитные и повреждающие процессы // *Биология внутр. вод.* 2002. № 4. С. 3–13.
184. *Мартемьянов В.И., Запруднова Р.А.* Динамика концентрации электролитов в плазме крови, эритроцитах и мышечной ткани пресноводных рыб при стрессе // *Биол. науки.* 1982. № 10. С. 44–49.
185. *Мартемьянов В.И., Лиманский В.В., Бекина Е.Н., Яржомбек А.А.* Динамика калия в плазме крови карпа при стрессе в зависимости от исходного содержания // *Биохимия молоди рыб в зимовальный период.* Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1987. С. 89–95.
186. *Матей В.Е.* Изменение ультраструктуры клеток жаберного эпителия тиляпии при действии на рыб кадмия // *Цитология.* 1993. Т. 35, № 6/7. С. 34–41.
187. *Матей В.Е., Комов В.Т.* Действие алюминия и низких значений рН воды на ультраструктуру жабер и содержание электролитов в плазме крови молоди семги *Salmo salar* // *Журн. эволюц. биохимии и физиологии.* 1992. Т. 28, № 5. С. 596–604.
188. *Машанский В.Ф.* Лизосомы // *Руководство по цитологии.* 1965. Т. 1. М.–Л.: Наука. С. 218–222.
189. *Маянский А.Н., Маянский Д.Н.* Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, 1989. 340 с.
190. *Меерсон Ф.З.* Адаптация, стресс и профилактика. М.: Наука, 1981. 274 с.
191. *Мелехов Е.И., Анев В.Н.* О механизмах защитной реакции клетки, сопряженной с выходом из нее K^+ // *Успехи соврем. биологии.* 1992. Т. 112, вып. 1. С. 18–28.
192. *Метелев В.В., Канаев А.И., Дзасохова Н.Г.* Водная токсикология. М.: Колос, 1971. 247 с.
193. *Мецлер Д.* Биохимия. М.: Мир, 1980. Т. 1. 408 с.; Т. 2. 594 с.; Т. 3. 488 с.
194. *Мещерякова О.В.* Изоферменты лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и 1-глицерофосфатдегидрогеназы в тканях окуня *Perca fluviatilis* и плотвы *Rutilus rutilus* // *Вестн. молодых ученых.* 2002. № 4: Науки о жизни, № 1. С. 47–52.
195. *Мишин В.М., Ляхович В.В.* Множественные формы цитохрома Р-450. Новосибирск: Наука, 1985. 180 с.
196. *Мосолов В.В., Лушникова Е.В., Афанасьев П.В.* Влияние желчных кислот на трипсин // *Докл. АН СССР.* 1967. Т. 174, № 1. С. 230–233.
197. *Наточин Ю.В., Бройнлих Х.* Использование методов токсикологии в изучении проблемы эволюции функций почки: (Проблемная статья) // *Журн. эволюц. биохимии и физиологии.* 1991. Т. 27, № 5. С. 584–589.

198. *Наточин Ю.В., Чапек К.* Методы исследования транспорта ионов и воды. Л., 1976. 283 с.
199. *Наточин Ю.В., Куперман Б.И., Шахматова Е.И., Извекова Г.И.* Изоосмотическая регуляция у цестод из пресноводных рыб // Паразитология. 1994. Т. 28, вып. 4. С. 286–292.
200. *Наточин Ю.В., Шахматова Е.И., Лаврова Е.А.* и др. Волюморегуляция клеток некоторых органов и тканей у пресноводных и проходных рыб при изменении осмоляльности и ионного состава сывротки крови // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1991. Т. 27, № 2. С. 159–166.
201. *Некрасов Б.В.* Основы общей химии. Т. 1. М.: Химия, 1969. 520 с.
202. *Немова Н.Н.* Катепсины лососевых рыб в процессах оогенеза и эмбриогенеза: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Харьков, 1982. 23 с.
203. *Немова Н.Н.* Влияние некоторых неблагоприятных факторов зимовки на активность лизосомальных протеиназ тканей карпа // Биохимия молоди рыб в зимовальный период. Петрозаводск: Кар. фил. АН СССР, 1987. С. 99–101.
204. *Немова Н.Н.* Внутриклеточные протеиназы в эколого-биохимических адаптациях у рыб: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1992. 42 с.
205. *Немова Н.Н.* Внутриклеточные протеиназы животных // Теоретические аспекты экологической биохимии. Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 1994. С. 91–116.
206. *Немова Н.Н.* Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 1996. 104 с.
207. *Немова Н.Н., Сидоров В.С.* Влияние некоторых токсикологических факторов на лизосомальные протеиназы пресноводных рыб // Гидробиол. журн. 1990. Т. 26, № 4. С. 69–73.
208. *Немова Н.Н., Высоцкая Р.У., Сидоров В.С.* Эколого-биохимическое тестирование водоемов по состоянию рыб // Научные аспекты экологических проблем России. М.: Наука, 2002. Т. 1. С. 215–220.
209. *Немова Н.Н., Сидоров В.С., Зекина Л.М.* Влияние ионов цинка на активность катепсинов в развивающейся икре сига // Реакция гидробионтов на абиотические воздействия: (К разработке теоретических основ биотестирования). Ярославль: Яросл. ун-т, 1984. С. 3–9.
210. *Немова Н.Н., Сидоров В.С., Рипатти П.О.* Лизосомальное переваривание белков органов озерного лосося при голодании в условиях содержания в садках в преднерестовый период // Вопр. ихтиологии. 1980. Т. 20, № 1. С. 180–182.
211. *Немова Н.Н., Крупнова М.Ю., Клявьярйнен Е.И., Волков И.В.* Влияние токсических факторов на протеолитическую активность в икре и ранних личинках рыб // Изв. РАН. Сер. биол. 1994. № 4. С. 605–610.
212. *Немова Н.Н., Клявьярйнен Е.И., Крупнова М.Ю., Бондарева Л.А.* Активность внутриклеточных протеолитических ферментов в тканях окуня *Perca fluviatilis* с различным содержанием ртути // Вопр. ихтиологии. 2001. Т. 41, № 5. С. 704–707.
213. *Немова Н.Н., Сидоров В.С., Высоцкая Р.У.* и др. К вопросу о биохимических механизмах обезвреживания чужеродных веществ в организме рыб // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: Материалы II (XXV) Междунар. конф. Петрозаводск: Изд-во Петрозавод. ун-та, 1999. С. 260–262.
214. *Немова Н.Н., Сидоров В.С., Григорьева Л.И.* и др. Внутриклеточные протеиназы в органах русского осетра *Acipenser guldenstaedti* при расслоении мышц // Вопр. ихтиологии. 1992. Т. 32, № 5. С. 57–62.
215. *Нефедова З.А.* Липидный статус лосося на ранних этапах онтогенеза: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Харьков, 1989. 16 с.
216. *Никольский Г.В.* Экология рыб. М.: Высш. шк., 1963. 368 с.
217. *Овчинников Ю.А.* Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с.
218. *Одум Ю.* Основы экологии. М.: Мир, 1975. 740 с.
219. *Одум Ю.* Экология: В 2 т. М.: Мир, 1986. Т. 1. 328 с.; Т. 2. 376 с.
220. *Озернюк Н.Д.* Механизмы адаптаций. М.: Наука, 1992. 272 с.
221. *Озернюк Н.Д.* Температурные адаптации. М.: Изд-во МГУ, 2000. 205 с.
222. *Озернюк Н.Д.* Биоэнергетика онтогенеза. М.: Изд-во МГУ, 2000. 259 с.
223. *Озернюк Н.Д.* Феноменология и механизмы адаптационных процессов. М.: Изд-во МГУ, 2003. 215 с.
224. *Остроумов С.А.* Введение в биохимическую экологию. М.: Изд-во МГУ, 1986. 176 с.
225. *Остроумова И.Н.* Влияние разных кормов на кровь и кроветворение у ранней молоди семги // Изв. ГосНИОРХ. 1964. Т. 58. С. 98–108.
226. *Остроумова И.Н.* Физиолого-биохимическая оценка состояния рыб при искусственном разведении // Современные вопросы экологической физиологии рыб. М.: Наука, 1979. С. 59–67.
227. *Панин Л.Е.* Энергетические аспекты адаптации. Л.: Медицина, 1978. 190 с.
228. *Панин Л.Е.* Биохимические механизмы стресса. Новосибирск: Наука, 1983. 234 с.
229. *Панченко Л.Ф., Эфрон И.И.* Изменение ферментных характеристик лизосом печени при вирусном гепатите мышей // Физико-химические основы функционирования надмолекулярных структур клетки: Материалы Всесоюз. симпоз. М., 1974. Ч. 2. С. 55.
230. *Парина Е.В., Калиман П.А.* Механизмы регуляции ферментов в онтогенезе. Харьков: Вища школа, 1978. 204 с.
231. *Парк Д.В.* Биохимия чужеродных соединений. М.: Медицина, 1973. 288 с.
232. *Патин С.А.* Влияние загрязнения на биологические ресурсы и продуктивность Мирового океана. М.: Пищ. пром-сть, 1979. 304 с.

233. Пехливанов Бл., Цветкова Т., Пиперков Т., Чичовска М. Щелочная фосфатаза: Современное состояние вопроса: (Обзор литературы) // Лаб. дело. 1989. № 11. С. 4–7.
234. Плотников Г.К., Проскураков М.Т. Пищеварительные ферменты осетровых рыб на ранних стадиях онтогенеза // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1984. Т. 20, № 1. С. 21–25.
235. Покровский А.А. Актуальные проблемы медицинской энзимологии. М.: Ин-т питания АМН СССР, 1969. 84 с.
236. Покровский А.А. Роль биохимии в развитии науки о питании. М.: Наука, 1974. 128 с.
237. Покровский А.А., Крыстев Л.П. Печень, лизосомы и питание. София, 1977. 207 с.
238. Покровский А.А., Тутельян В.А. Изменение ферментов лизосом при белковой недостаточности // Биохимия. 1968. Т. 33, № 4. С. 809–816.
239. Покровский А.А., Тутельян В.А. Лизосомы. М.: Наука, 1976. 382 с.
240. Пономарев В.И. Влияние температуры на активность протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта у рыб Севера // Экология. 1995. № 1. С. 86–89.
241. Потапенко А.Я. Действие света на человека и животных // Сорос. образов. журн. 1996. № 10. С. 13–21.
242. Потапова О.И. Крупная ряпушка. Л.: Наука, 1978. 132 с.
243. Потапова О.И., Соколова В.А. О питании и пищевых взаимоотношениях некоторых бентосоядных рыб Сямозера // Гидробиологические исследования. Тарту, 1962. Т. 3. С. 225–233.
244. Правдин И.Ф. Влияние сплава леса и стоков бумажного производства на биологию рыб // Изв. Карело-фин. науч.-исслед. базы АН СССР. 1948. № 1. С. 76–81.
245. Привольнев Т.И. Отношение пресноводных и проходных рыб к различной солености воды // Изв. ГосНИОРХ. 1964. Т. 58. С. 58–83.
246. Проссер Л. Сравнительная физиология животных. М.: Мир, 1977. Т. 1. 607 с.; Т. 2. 571 с.
247. Путинцев А.И. Некоторые представления об адаптации и закономерностях реагирования гидробионтов на токсические воздействия // Сравнительные аспекты биохимии рыб и некоторых других животных. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1981. С. 127–146.
248. Разработка теоретических основ эколого-биохимического тестирования и мониторинга. Отчет о научно-исследовательской работе (заключительный) лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН за 1996–2000 гг. № гос. регистрации 01.9.60003521. Петрозаводск, 2001. 269 с.
249. Райдер К., Тейлор К. Изоферменты. М., 1983. 107 с.
250. Регеранд Т.И. Липидный состав сыворотки форменных элементов и липопротеидов крови человека и некоторых позвоночных: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 1994. 17 с.
251. Регеранд Т.И., Нефедова З.А., Тойвонен Л.В. и др. Липидный метаболизм личинок ручейников при низких значениях pH среды // Онтогенез. 2002. Т. 33, № 4. С. 286–292.
252. Решетников Ю.С. Экология и систематика сиговых рыб. М., 1980. 300 с.
253. Решетников Ю.С., Попова О.А., Стерлигова О.П. и др. Изменение структуры рыбного населения эвтрофируемого водоема. М.: Наука, 1982. 248 с.
254. Рипатти П.О. Биологическая специфичность желчных кислот: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 1975. 21 с.
255. Рипатти П.О., Сидоров В.С. Эколого-физиологическая роль желчных кислот у рыб // Сравнительная биохимия водных животных. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1983. С. 5–16.
256. Рипатти П.О., Михайлова Н.В., Антонова В.В. Оценка пулов жирных кислот, ковалентно связанных с коэнзимом А и белками // Биохимические методы в экологических и токсикологических исследованиях. Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 1993. С. 156–169.
257. Рипатти П.О., Рабинович А.Л., Богдан В.В. Докозагексаеновая кислота – температурный стабилизатор биомембран? // Биохимия молоди пресноводных рыб. Петрозаводск, 1985. С. 27–33.
258. Рисник В.В., Гусев Н.Б. Казеинкиназы II типа: Характеристика свойств и возможная физиологическая роль // Биол. науки. 1987. № 10. С. 73–88.
259. Романенко В.Д. Печень и регуляция межлужочного обмена: (Млекопитающие и рыбы). Киев: Наук. думка, 1978. 184 с.
260. Романенко В.Д. Метаболизм калия у пресноводных рыб // Гидробиол. журн. 1994. Т. 30, № 5. С. 63–69.
261. Романенко В.Д., Арсан О.М., Соломатина В.Д. Кальций и фосфор в жизнедеятельности гидробионтов. Киев: Наук. думка, 1982. 152 с.
262. Романенко В.Д., Арсан О.М., Соломатина В.Д. Механизмы температурной акклимации рыб. Киев: Наук. думка, 1991. 192 с.
263. Романенко В.Д., Евтушенко Н.Ю., Коцарь Н.И. Метаболизм углекислоты у водных животных. Киев: Наук. думка, 1980. 180 с.
264. Руднева-Титова И.И. Антиоксидантные системы морских животных в процессе их эволюции, онтогенеза и при действии антропогенных факторов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Харьков, 1994. 46 с.
265. Руднева И.И., Жерко Н.В. Действие полихлорированных бифенилов на активность антиоксидантных ферментов и перекисное окисление липидов в мышцах и печени двух видов черноморских рыб // Биохимия. 1994. Т. 54, № 1. С. 34–45.
266. Руднева И.И., Шевченко Н.Ф., Овен Л.С. и др. Комплексная оценка качества водной среды с помощью биомаркеров разного уровня // Актуальные проблемы водной токсикологии. Борок: Ин-т биологии внутр. вод РАН, 2004. С. 124–149.

267. Руоколайнен Т.Р. Влияние экологических и физиологических факторов на активность кислой фосфатазы рыб: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1985. 16 с.
268. Руоколайнен Т.Р., Высоцкая Р.У. Сезонная изменчивость спектра множественных форм кислой фосфатазы печени сига // Второе Всесоюз. совещ. по биологии и биотехнике разведения сиговых рыб: Тез. докл. Петрозаводск, 1981. С. 62.
269. Руоколайнен Т.Р., Высоцкая Р.У., Крупнова М.Ю. Влияние абиеитиновой кислоты на изолированные лизосомы рыб // Экспериментальные исследования загрязнителей на водные организмы. Апатиты, 1979. С. 122–127.
270. Руоколайнен Т.Р., Высоцкая Р.У., Сидоров В.С. Влияние смоляных кислот на молекулярную гетерогенность кислой фосфатазы печени форели // Теоретические вопросы биотестирования. Волгоград, 1983. С. 60–64.
271. Руоколайнен Т.Р., Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. и др. О возможной роли лизосомального аппарата в механизмах реакции рыб на поверхностно-активные вещества // Эксперим. вод. токсикология. 1985. Вып. 10. С. 103–109.
272. Рыжков Л.П. Морфологические закономерности и трансформация вещества и энергии в раннем онтогенезе пресноводных лососевых рыб. Петрозаводск: Карелия, 1976. 288 с.
273. Рябинкин А.В. Макрозообентос водоемов бассейна реки Кеми (Карелия) и его динамика в условиях антропогенного влияния: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2003. 25 с.
274. Саприн А.Н. Ферменты метаболизма и детоксикации ксенобиотиков // Успехи биол. химии. 1991. Т. 32. С. 146–175.
275. Саутин Ю.Ю., Романенко В.Д. Влияние фотопериода и температуры на соматотропную и лактоотропную активность гипофиза карпа // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1982. Т. 18, № 5. С. 471–476.
276. Свицкий А.М., Голованов В.К. Влияние температуры акклимации на терморегуляционное поведение молоди леща *Abramis brama* в различные сезоны года // Вопр. ихтиологии. 1991. Т. 31, № 6. С. 974–980.
277. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М.: Медгиз, 1960. 254 с.
278. Селье Г. На уровне целого организма. М.: Наука, 1972. 122 с.
279. Селье Г. Концепция стресса как мы ее представляем в 1976 г. // Новое о гормонах и механизме их действия. Киев: Наук. думка, 1977. С. 27–51.
280. Сидоров В.С. Экологическая биохимия рыб. Липиды. М.: Наука, 1983. 240 с.
281. Сидоров В.С. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб // Биологические основы рыбоводства: Актуальные проблемы экологической физиологии и биохимии рыб. М., 1984. С. 98–116.
282. Сидоров В.С. Эволюционные и экологические аспекты биохимии рыб: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1986. 56 с.
283. Сидоров В.С. К вопросу об эколого-биохимическом мониторинге // Первый симпоз. по экол. биохимии рыб: Тез. докл. Всесоюз. симпоз. Ярославль: Ин-т биологии внутр. вод, 1987. С. 174–176.
284. Сидоров В.С., Лизенко Е.И. Влияние стрессовых условий на липидный состав лизосомальной и митохондриальной мембраны у рыб // Экспериментальные исследования влияния загрязнителей на водные организмы. Апатиты, 1979. С. 108–113.
285. 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, 2000. С. 134–140.
286. Сидоров В.С., Попова Р.А. Липидный состав рыб в зависимости от изменения условий обитания, вызванных антропогенными факторами // Экологическая биохимия животных. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1978. С. 6–13.
287. Сидоров В.С., Шатуновский М.И. Теоретические и практические аспекты экологической биохимии рыб // Сравнительная биохимия водных животных. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1983. С. 5–17.
288. Сидоров В.С., Юровицкий Ю.Г. Перспектива использования биохимических методов регистрации экологических модуляций // Экологические модификации и критерии экологического нормирования. Л.: Гидрометеиздат, 1991. С. 264–277.
289. Сидоров В.С., Лизенко Е.И., Нефедова З.А. Фосфолипидный состав зрелых гонад пресноводных рыб // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1981. Т. 17. С. 222. Реф. рукописи. Деп. в ВИНТИ 08.12.80, № 5161-80.
290. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., Лизенко Е.И. и др. Значение изучения лизосом для водной токсикологии // Основы биопродуктивности внутренних водоемов Прибалтики. Материалы XVIII науч. конф. Вильнюс, 1975. С. 447–448.
291. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., Такшеев С.А. Эколого-биохимический мониторинг и тестирование водоемов // Экологические проблемы бассейнов крупных рек – 2: Тез. докл. Междунар. конф. Тольятти, 1998. С. 165–166.
292. Сидоров В.С., Немова Н.Н., Регеранд Т.И. Система эколого-биохимического мониторинга водоемов // Ладожское озеро. Петрозаводск: Ин-т водн. пробл. Севера Карел. научн. центра РАН, 2000. С. 75–81.
293. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., Немова Н.Н., Такшеев С.А. Интегральный биохимический индекс стресса у рыб // Освоение Севера и проблемы природовосстановления: Тез. докл. V Междунар. конф. Сыктывкар: Коми науч. центр УрО РАН, 2001. С. 225–227.
294. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., Смирнов В.С., Гурьянова С.Д. Сравнительная биохимия гельминтов рыб: Аминокислоты, белки, липиды. Л.: Наука, 1989. 152 с.

295. Сидоров В.С., Немова Н.Н., Высоцкая Р.У., Такиев С.А. Вариабельность интегрального биохимического индекса у рыб под влиянием техногенных вод горно-обогатительного комбината // Экология. 2003. № 4. С. 280–285.
296. Сидоров В.С., Немова Н.Н., Высоцкая Р.У., Феклов Ю.А. Использование биохимических методов при определении ПДК промышленных токсикантов // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38, № 3. С. 345–350.
297. Сидоров В.С., Помазовская И.В., Фрейндлинг А.В., Евсеева Н.В. Влияние жирных кислот на фосфолипидный состав печени карпа и плотвы // Гидробиология Выгозерского водохранилища. Петрозаводск, 1978. С. 176–185.
298. Сидоров В.С., Юровицкий Ю.Г., Кирилук С.Д., Такиев С.А. Принципы и методы эколого-биохимического мониторинга водоемов // Биохимия экто- и эндотермных организмов в норме и при патологии. Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 1990. С. 5.
299. Сидоров В.С., Такиев С.А., Немова Н.Н. и др. Принципы и методы эколого-биохимического тестирования водоемов // Экология и охрана окружающей среды. Тез. докл. 2-й междунар. науч.-практ. конф. Пермь: Изд-во Перм. гос. пед. ун-та, 1995. Ч. 1. С. 15–16.
300. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. и др. Некроз плавников у заводской молоди атлантического лосося *Salmo salar* L. // Атлантический лосось: (Биология, охрана, воспроизводство): Тез. докл. Междунар. конф. Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 2000. С. 50–51.
301. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. и др. Эволюционные аспекты эколого-биохимического мониторинга // Биохимические методы в экологических и токсикологических исследованиях. Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 1993. С. 5–35.
302. Слоним А.Д. Экологическая физиология животных. М.: Высш. шк., 1971. 448 с.
303. Смирнов Л.П. Сравнительное изучение липидного и белкового составов некоторых цестод, паразитирующих у холоднокровного и теплокровного позвоночного: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1982. 23 с.
304. Смирнов Л.П., Кирилук С.Д. Влияние загрязнения окружающей среды на фракционный состав низкомолекулярных пептидов из различных тканей сига // Изв. РАН. Сер. биол. 1994. № 4. С. 617–622.
305. Смирнов Б.П., Сидоров В.С. Хроматография на бумаге смоляных кислот сосны и ели // Журн. прикл. химии. 1960. № 33. С. 1192–1203.
306. Смирнов Л.П., Богдан В.В., Немова Н.Н., Юхименко Л.Н. Цитохимическая вакцина против геморрагической септицемии рыб // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36, № 5. С. 592–596.
307. Смирнов Ю.А. Пресноводный лосось: (Экология, воспроизводство, использование). Л.: Наука, 1979. 156 с.
308. Соифер В.Н. Исследование генома к концу 1999 г. // Сорос. образов. журн. 2000. Т. 6, № 1. С. 15–22.
309. Соломатина В.Д., Малиновская М.В., Гребенкина Т.Г. Биохимические изменения в организме дрейссены, обитающей в загрязненной радионуклидами среде // Гидробиол. журн. 1994. Т. 30, № 6. С. 58–63.
310. Сорвачев К.Ф. Основы биохимии питания рыб. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1982. 247 с.
311. Степанова И.К., Комов В.Т. Накопление ртути в рыбе из водоемов Вологодской области // Экология. 1997. № 4. С. 295–299.
312. Стерлигова О.П., Соколова Е.Л., Едомская Л.В. Современное состояние леща Сямозера // Сб. науч. тр. ГосНИОРХ. 1991. Вып. 310. С. 83–90.
313. Столбов А.Я., Ставицкая Е.Н., Шульман Г.Е. Потребление кислорода и экскреция азота у черноморских рыб различной экологической специализации при гипоксических режимах // Гидробиол. журн. 1995. Т. 31, № 1. С. 73–78.
314. Столбов А.Я., Ставицкая Е.Н., Битюкова Ю.Е., Ткаченко Н.К. Интенсивность потребления кислорода и экскреция азота у черноморской камбалы-калкана *Psetta maeeotica* (Pallas) на разных стадиях личиночного развития. Киев, 1996. 10 с. Деп. в ВИНТИ 29.04.96, № 1397-B96.
315. Стом Д.И. Фитотоксичность и механизм детоксикации фенолов водными растениями: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Киев, 1982. 48 с.
316. Строганов Н.С. Экологическая физиология рыб. М., 1962. 444 с.
317. Строганов Н.С. Критерий токсичности и принцип методик по водной токсикологии. М., 1971. 1428 с.
318. Строганов Н.С. Теоретические аспекты действия пестицидов на водные организмы // Эксперим. вод. токсикология. 1973. Вып. 5. С. 11–17.
319. Строганов Н.С. Теоретические вопросы экологической физиологии рыб в связи с усилением токсичности водной среды // Современные вопросы экологической физиологии рыб. М.: Наука, 1979. С. 19–34.
320. Строганов Н.С. Биологический аспект проблемы нормы и патологии в водной токсикологии // Теоретические проблемы водной токсикологии: Норма и патология. М., 1983. С. 5–21.
321. Структура и функционирование экосистем кислых озер / Под ред. В.Т. Комова. СПб.: Наука, 1994. 250 с.
322. Субботкина Т.А. О возможной роли некоторых факторов иммунитета в процессе расслоения мышечной ткани осетровых // Физиолого-биохимический статус волго-каспийских осетровых в норме и при расслоении мышечной ткани: (Кумулятивный политоксикоз). Рыбинск, 1990. С. 158–164.
323. Сумароков В.П., Ваньян М.Л., Аскинази А.И. Талловое масло. М.: Лесн. пром-сть, 1965. 148 с.

324. Суханова М.Ж., Раушенбах И.Ю. Щелочная фосфатаза при стрессе у *Drosophila* // Докл. РАН. 1995. Т. 340, № 1. С. 128–131.
325. Суховская И.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н., Комов В.Т. Влияние ртуты на фракционный состав низкомолекулярных пептидов мускулатуры окуней *Perca fluviatilis* L. // Вопр. ихтиологии. 2001. Т. 41, № 5. С. 699–703.
326. Табукашвили Р.И., Ушаков И.Б., Антипов В.В. Роль лизосом в механизмах устойчивости и адаптации. М.: Наука, 1991. 214 с.
327. Телитченко М.М., Остроумов С.А. Введение в проблемы биохимической экологии: Биотехнология, сельское хозяйство, охрана среды. М.: Наука, 1990. 288 с.
328. Теоретические вопросы биотестирования. Волгоград: Ин-т биологии внутр. вод, 1983. 194 с.
329. Теоретические вопросы водной токсикологии. Л., 1981. С. 40–56.
330. Тимофеев-Ресовский Н.В., Воронцов Н.Н., Яблоков А.В. Краткий очерк теории эволюции. М.: Наука, 1977. 301 с.
331. Тимофеева С.С. Окислительно-восстановительные ферменты в биотестировании сточных вод и продуктов нового синтеза // Физиология и токсикология гидробионтов. Ярославль, 1988. С. 146–150.
332. Титова В.Ф. Многотычинковый сиг Сямозера. Петрозаводск, 1973. 87 с.
333. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. София, 1968. 1064 с.
334. Тойвонен Л.В. Биохимические особенности катарактогенеза у молоди семги: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1995. 16 с.
335. Тойвонен Л.В., Нефедова З.А., Сидоров В.С., Шарова Ю.Н. Адаптационные изменения в спектрах жирных кислот тканевых липидов сига при влиянии антропогенных нагрузок // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37, № 3. С. 364–368.
336. Токин Б.П. Общая эмбриология. М.: Высш. шк., 1977. 509 с.
337. Томилина И.И., Комов В.Т. Донные отложения как объект токсикологических исследований: (Обзор) // Биология внутр. вод. 2002. № 2. С. 20–26.
338. Третьяков А.В., Высоцкая Р.У., Груздев А.И. и др. Биохимическая характеристика эритроцитов молоди атлантического лосося *Salmo salar* при некрозе плавников // Вопр. ихтиологии. 1988. Т. 28, № 6. С. 1042–1045.
339. Трусевич В.С. Фосфорный обмен при плавании рыб // Элементы физиологии и биохимии общего и активного обмена у рыб. Киев: Наук. думка, 1978. С. 145–167.
340. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. Основы биохимии: В 3 т. М.: Мир, 1981. 1878 с.
341. Уголев А.М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л.: Наука, 1985. 544 с.
342. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации рыб. СПб.: Гидрометеиздат, 1993. 238 с.
343. Уилкинсон Дж. Изоферменты. М., 1968. 220 с.
344. Учитель И.Я. Макрофаги в иммунитете. М.: Медицина, 1978. 199 с.
345. Физиология водно-солевого обмена и почки / Отв. ред. Ю.В. Наточин. СПб.: Наука, 1993. 576 с.
346. Физиолого-биохимический статус волго-каспийских осетровых в норме и при расслоении мышечной ткани (кумулятивный политоксикоз) / Отв. ред. В.И. Лукьяненко. Рыбинск: Ин-т биологии внутр. вод, 1990. 262 с.
347. Филленко О.Ф. Водная токсикология. М.: Изд-во МГУ, 1988. 156 с.
348. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 1982. С. 151–152.
349. Философские проблемы теории адаптации. М., 1975.
350. Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. Л.: Наука, 1989. 144 с.
351. Формазюк В.Е. Особенности биохимии хрусталика глаза // Успехи биол. химии. 1993. Т. 33. С. 214–255.
352. Фрейдлин И.С. Цитокины и межклеточные контакты в противоинфекционной защите организма // Сорос. образов. журн. 1996. № 7. С. 19–25.
353. Фролов В.А. Хронобиология лизосом // Структура и функции лизосом. Тез. докл. 3-го Всесоюз. симпоз. М., 1986. С. 219–220.
354. Харборн Дж. Введение в экологическую биохимию. М.: Мир, 1985. 312 с.
355. Хлебович В.В. Критическая соленость биологических процессов. Л.: Наука, 1974. 235 с.
356. Хлебович В.В. Акклимация животных организмов. Л.: Наука, 1981. 136 с.
357. Хоружая Т.А. Перспективы использования биохимических функций в биомониторинге пресных вод // Гидробиол. журн. 1989. Т. 25, № 5. С. 47–52.
358. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. 396 с.
359. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир, 1988. 568 с.
360. Цветков И.Л., Зарубин С.Л., Урванцева Г.А. и др. Кислая фосфатаза гидробионтов как фермент-индикатор биохимической адаптации к воздействию токсических веществ // Изв. РАН. Сер. биол. 1997. № 5. С. 539–545.
361. Цветков И.Л., Попов А.П., Коничев А.С. Комплекс кислых фосфатаз живородки речной в норме и при интоксикации ионами кадмия // Биохимия. 2003. Т. 68, № 12. С. 1648–1656.
362. Чмилевский Д.А. Влияние пониженной температуры на рост тилляпии *Oreochromis mossambicus* // Вопр. ихтиологии. 1998. Т. 38, № 1. С. 92–99.
363. Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 1980. 283 с.

364. Шатуновский М.И., Акимова Н.В., Рубант Г.И. Реакция воспроизводительной системы рыб на антропогенные воздействия // *Вопр. ихтиологии* 1996. Т. 36, № 2. С. 229–238.
365. Шивокене Я. Симбионтное пищеварение у гидробионтов и насекомых. Вильнюс: Моклас, 1989. 223 с.
366. Шкорбатов Г.Л. Основные черты адаптаций биологических систем // *Журн. общ. биологии*. 1971. Т. 32, № 2. С. 131–142.
367. Шкорбатов Г.Л. Эколого-физиологические аспекты микроэволюции водных животных. Харьков, 1973.
368. Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных: Приспособление и среда. Кн. 1. М.: Мир, 1982. 414 с.
369. Шпаков А.О., Деркач К.В. Влияние катионов меди и кадмия *in vivo* и *in vitro* на активность аденилатциклазы и 5'-нуклеотидазы в тканях пресноводных моллюсков // *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*. 1994. Т. 30, № 6. С. 729–737.
370. Штерман Л.Я. Различия в осморегуляции у карпа и форели // *Изв. ГосНИОРХ*. 1964. Т. 58. С. 84–97.
371. Шулькин В.М., Чернова Е.Н. Концентрация тяжелых металлов в митилидах Амурского залива (Японское море) // *Экология*. 1994. № 4. С. 80–88.
372. Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М.: Пищ. пром-сть, 1972. 368 с.
373. Шульман Г.Е. (отв. ред.). Элементы физиологии и биохимии общего и активного обмена у рыб. Киев: Наук. думка, 1978. 204 с.
374. Шульман Г.Е., Юнева Т.В. Роль докозагексаеновой кислоты в адаптациях рыб: (Обзор) // *Гидробиол. журн.* 1990. Т. 26, № 4. С. 43–51.
375. Шульман Г.Е., Столбов А.Я., Солдатов А.А. и др. Метаболические реакции черноморских рыб на долговременную экспериментальную гипоксию // Там же. 2003. Т. 39, № 1. С. 21–30.
376. Шустов Ю.А. Экология молоди атлантического лосося. Петрозаводск: Карелия, 1983. 152 с.
377. Шустов Ю.А. Экологические аспекты поведения молоди лососевых рыб в различных условиях. СПб.: Наука, 1995. 160 с.
378. Щербань Э.П. Роль температурного фактора в проявлении токсического действия тяжелых металлов на донных членистоногих // Экспериментальные исследования влияния загрязнителей на водные организмы. Апатиты, 1979. С. 53–59.
379. Юдаев Н.А., Афиногенова С.А., Булатов А.А. Биохимия гормонов и гормональной регуляции. М., 1976. 380 с.
380. Юровицкий Ю.Г., Мильман Л.С. Ферменты обмена гексозомонофосфатов в развивающемся зародыше выюна *Misgurnus fossilis* // Ферменты в эволюции животных. Л., 1969. С. 126–139.
381. Юровицкий Ю.Г., Сидоров В.С. Эколого-биохимический мониторинг и эколого-биохимическое тестирование в районах экологического неблагополучия // *Изв. РАН. Сер. биол.* 1993. № 1. С. 74–82.
382. Юфит С.С. Яды вокруг нас: Вызов человечеству. М: Классик Стиль, 2002. 368 с.
383. Яблоков А.В., Остроумов С.А. Охрана живой природы: Проблемы и перспективы. М.: Лесн. пром-сть, 1983. 271 с.
384. Яблоков А.В., Остроумов С.А. Уровни охраны живой природы. М.: Наука, 1985. 175 с.
385. Яндовская Н.И., Лейзерович Х.А., Богданова Е.А. Инструкция по биотехнике разведения семги и лечебно-профилактическим мероприятиям при выращивании в бассейнах. Л., 1966. 52 с.
386. Ackerman N.R., Beele J.R. Release of lysosomal enzymes by alveolar mononuclear cells // *Nature*. 1974. Vol. 247, N 5441. P. 475–477.
387. Alcon M.P., Arola L., Mas A. Response to acute nickel toxicity in rats as a function of sex // *Biol. Metals*. 1991. Vol. 4, N 3. P. 136–140.
388. Allen Ch., Lee D. Effect of increasing concentrations of salt on the lysosomes of rat liver and *T. pyriformis* // *Bioch. et biophys. acta*. 1972. Vol. 288, N 2. P. 304–311.
389. Anderson A.J., Brocklehurst W.E., Wills A.L. Evidence for the role of lysosomes in the formation of prostaglandins during carrageenin induced inflammation in the rat // *Pharm. Res. Commun.* 1971. Vol. 3, N 1. P. 13–19.
390. Bardach J.E., Life J.C. Pollution effects on fish // *Encycl. Environ. Sci. and F-P. N.Y.*, 1982. P. 817–877.
391. Bartsch A.F. Paper mill pollution in Puget Sound // *Trans. 28th N. Amer. Wildlife and Natur Resources Conf.* 1963, Detroit, Mich. Wash. (D.C.): Wildlife Manag. Inst., 1963. P. 369–377.
392. Beckman B.P., Zaugg W.S. Copper intoxication in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) induced by natural springwater: effects on gill Na⁺, K⁺ – ATPase, hematocrit, and plasma glucose // *Canad. J. Fish. Aquat. Sci.* 1988. Vol. 45, N 8. P. 1430–1435.
393. Bensonana G., Densnuella P. Action of some effectors on the hydrolysis of long-chain triglycerides by pancreatic lipase // *Biochim. et biophys. Acta*. 1968. Vol. 164. P. 47–58.
394. Berlin J.D. Temperature induced differences in acid phosphatase level of rainbow trout livers // *U.S.A. F.C. Batalle: Northwest*, 1967. P. 157–159. BNWL-480.
395. Bhattacharya B.K. Post-irradiation acid phosphatase activity in juvenile chick thymus // *J. Environ. Biol.* 1989. Vol. 10, N 2. P. 105–109.
396. Black D., Love R. The sequential mobilization and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding // *J. Comp. Physiol. B*. 1986. Vol. 156, N 4. P. 469–479.
397. Bohley P. Intrazelluläre Proteolise // *Naturwissenschaften*. 1968. Bd. 55, N 5. S. 211–217.
398. Brenner I. Metabolic interaction of trace elements // *J. Inorg. Biochem.* 1991. Vol. 43, N 2/3. P. 282.
399. Buntun F.E., Frazier J.M. Hepatocellular ultrastructure in white perch (*Morone americana*) with abnormal hepatic copper storage // *Mar. Environ. Res.* 1989. Vol. 28, N 1/4. P. 375–382.
400. Burke I., Grischkowsky R. An epizooty caused by infections hemopoietic necrosis virus in an enhanced population of sockeye salmon,

- Oncorhynchus nerka* (Walbaum), smolts at Hedden Creek, Alaska // J. Fish. Diseases. 1984. Vol. 7, N 5. P. 421–429.
401. Campbell C.M., Davies P.S. Temperature acclimation in the teleost, *Blennius pholis*: Changes in enzymes activity and cell structure // Comp. Biochem. and Physiol. B. 1978. Vol. 61, N 1. P. 165–167.
402. Cornelius F., Skou J.Ch. The effect of cytoplasmic K⁺ on the activity of the Na⁺/K⁺-ATPase // Biochim. et biophys. acta. Biomembranes. 1991. Vol. 1067, N 2. P. 227–234.
403. Couture P., Rajotte J.W. Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from Sudbury, Ontario: A review // J. Environ. Monit. 2003. Vol.5, N 2. P. 216–221.
404. Dai L., Tian L., Tu Q., Wang X. Биоконцентрация редких земельных элементов у карпа // Хуаньцзун хуасюэ = Environ. Chem. 1991. Vol. 10, N 4. P. 37–43.
405. Dannevig B.H., Berg T. Temperature adaptation of lysosomal enzymes in fishes // Comp. Biochem. and Physiol. B. 1978. Vol. 61, N 1. P. 115–118.
406. Davis J.C., Hoos R.A.W. Use of sodium pentachlorophenate and dehydroabietic acid as reference toxicants for salmonid bioassays // J. Fish. Res. Board Canada. 1975. Vol. 32, N 3. P. 411–416.
407. Dayton W.R., Gole D.E., Gzece M. et al. A Ca²⁺-activated protease possible involved in Myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle // Biochemistry. 1976. Vol. 15, N 10. P. 2150–2158.
408. Dayton W.R., Reville W.J., Goll D.E., Stromer M.H. A Ca²⁺-activated protease possible involved in Myofibrillar protein turnover: Partial characterization of purified enzyme // Ibid. P. 2159–2167.
409. Delahynty G., Olecese J., Vlaming V. Photoperiod effects on carbohydrate metabolism in the goldfish *Carassius auratus*: Role of the pineal and retinal pathways // Rev. Canad. Biol. 1980. Vol. 39, N 3. P. 173–180.
410. Dua A., Sawhney S.K. Effect of chromium on activities of hydrolytic enzymes in germinating pea seeds // Environ. and Exp. Bot. 1991. Vol. 31, N 2. P. 133–139.
411. Fekhaoui M., Devaux A., Keck G. Toxicité aigue et distribution tissulaire du cuivre lors d'intoxication subaigue chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) // Bull. Inst. Sci. 1986. N 10. P. 155–163.
412. Fernandez J., Planas J. Annual variations of some carbohydrate and lipid parameters in the fish *Spicard chryselis* during captivity // Comp. Biochem. and Physiol. A. 1980. Vol. 67, N 3. P. 383–389.
413. Gallo-Torres H.E., Miller O.N., Hamilton J.G. A comparison of the effects of bile salts on the absorption of cholesterol from the intestine of the rat // Biochim. et biophys. acta. 1969. Vol. 176. P. 605–615.
414. Gautman A.K. Acute and chronic accumulation of copper in fresh water murrel: *Channa punctatus* (Bl.) Teleostii // J. Curr. Biosci. 1989. Vol. 6, N 2. P. 67–72.
415. Govoni J.J., Boehlert G.W., Watanabe Y. The physiology of degestion in fish larvae // Environ. Biol. Fish. 1986. Vol. 16, N 1/3. P. 59–77.
416. Gonzalez-Noriega A., Grubb J.H., Talkad V., Sly W.S. Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling // J. Cell Biol. 1980. Vol. 85, N 3. P. 839–852.
417. Hazel J., Prosser C.L. Interpretation of inverse acclimation to temperature // Ztschr. f. verg. Physiol. 1970. Bd. 67. S. 217–228.
418. Heißmeyer H., Grub R., Reutter W., Lesch R. The effect of galactosamine on the activity of lysosomal peptidohydrolases of the liver depending on the age of rats // Hormone and Metab. Res. 1973. Vol. 5, N 2. P. 93–97.
419. Helenius A., Simons K. Solubilisation of membranes by detergents // Biochim. et biophys. acta. 1975. Vol. 415, N 1. P. 29–79.
420. Hemelraad J., Herwig H.J., Van Donselaar E.G. et al. Effect of cadmium in freshwater clams. II. Ultrastructural changes in the renal system of *Anodonta cygnea* // Arch. Environ. Contam. and Toxicol. 1990. Vol. 19, N 5. P. 691–698.
421. Hochachka P.W., Bianconcini M.S.C., Parkhouse W.S., Dobson G.P. On the role of actomyosin ATPases in regulation of ATP turnover rates during intense exercise // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88, N 3. P. 5764–5768.
422. Holtzman E. Lysosomes: A survey // Cell biology monographs: Continuation of protoplasmatology. Wein; N.Y.: Springer, 1976. Vol. 3.
423. Holwerda D.A., Hemelraad J., Veenhof P.R., Zandee D.J. Cadmium accumulation and depuration in *Anodonta anatina* exposed to cadmium chloride or cadmium-EDTA complex // Bull. Environ. Contam. and Toxicol. 1988. Vol. 40, N 3. P. 373–380.
424. Horisberger J.-D., Lemas V., Krachenbühl J.-P., Rossier B.C. Structure-function relationship of Na, K-ATPase // Annu. Rev. Physiol. 1991. Vol. 53. P. 565–584.
425. Ikeda T., Matsumara T., Benjamin D.M. Chemical basis for feeding adaptation of pine sawflies *Neodiprion rugifrons* and *Neodiprion swaini* // Science. 1977. Vol. 197, N 4302. P. 497–499.
426. Johansen N. Studies on diseases in hatchery reared atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and sea trout (*Salmo trutta*) in Sweden // Acta Univ. Uppsala Abstr. 1977. N 401. P. 111.
427. Johansen N., Svenson K.M., Fritberg G. Studies on the pathology of ulcerative dermal necrosis (UDN) in swedish salmon *Salmo salar* L. and sea trout *Salmo trutta* L., populations // J. Fish Diseases. 1982. Vol. 5, N 4. P. 293–308.
428. Kaivarainen E.I., Nemova N.N., Krupnova M.Y., Bondareva L.A. The effect of toxic factors on intracellular proteinase activity in freshwater fish // Acta Vet. Brno. 1998. Vol. 67. P. 309–316.
429. Kenyon C.J., Shepherd R.M., Fraser R. et al. The role of potassium and other ions in the control of aldosterone synthesis // Endocrine Res. 1991. Vol. 17, N 1/2. P. 220–236.
430. Köhler A. Lysosomal perturbation in fish liver as indicators for toxic effects of environmental pollution // Comp. Biochem. and Physiol. C. 1991. Vol. 100, N 1/2. P. 123–127.
431. Kreibich G., Debey P., Sabatini D.D. Selective release of content from microsomal vesicles without membrane disassembly. 1. Permeability

- changes induced by low detergent concentration // *J. Cell Biol.* 1973. Vol. 58, N 2. P. 436–462.
432. *Kukkonen J.* Bioactive chemicals: Assessment of emissions and exposures in ecosystems: (Pap. (It. Meet. Finn. Soc. Toxicol. and Brit. Toxicol. Soc., 1996. // *Hum. and Exp. Toxicol.* 1996. Vol. 15, N 12. P. 989.
433. *Kuo M.-H., Blumenthal H.J.* Purification and properties of an acid phosphomonoesterases from *Neurospora crassa* // *Biochim. et biophys. acta.* 1961. Vol. 52, N 1. P. 13–19.
434. *Laidley C., Leatherland J.* Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormone, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson // *Comp. Biochem. and Physiol. A.* 1988. Vol. 89, N 3. P. 495–502.
435. *Laurent T.C., Fraser J.R.E.* The properties and turnover of hyaluronat // Functions of the proteoglycans. N.Y.: Wiley, 1986. P. 9–29. (Ciba Found. Symp.; N 124).
436. *Lemly A.D.* A protocol for aquatic hazard assessment of selenium // *Ecotoxicol. and Environ. Safety.* 1995. Vol. 32, N 3. P. 280–288.
437. *Love R.M.* The chemical biology of fishes. L.; N.Y.: Acad. press, 1970. Vol. 1. 547 p.
438. *Love R.M.* The chemical biology of fishes. L.; N.Y.: Acad. press, 1980. Vol. 2. 943 p.
439. *Luoma S.N.* Bioavailability of trace metals to aquatic organisms – a review // *Sci. Total Environ.* 1983. Vol. 28, N 1. P. 1–22.
440. *Marigómez I.A., Ireland V.P., Angulo E.* // *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 1990. Vol. 67, N 2. P. 171–176.
441. *Marigómez I.A., Vega M.M., Cajaraville M.P., Angulo E.* Quantitative responses of the digestive-lysosomal system of winkles to sublethal concentrations of cadmium // *Cell. and Mol. Biol.* 1989. Vol. 35, N 5. P. 555–562.
442. *Mazeaud M., Mazeaud F., Donaldson E.* Primary and secondary effects of stress in fish // *Trans. Amer. Fish. Soc.* 1977. Vol. 106, N 3. P. 201–212.
443. *Milanesi A.A., Bird J.W.C.* Lysosomal enzymes in aquatic species. II. Distribution and particle properties of thermally acclimated muscle lysosomes of rainbow trout *Salmo gairdneri* // *Comp. Biochem. and Physiol. B.* 1972. Vol. 41, N 3. P. 573–591.
444. *Milanesi A.A., Bird J.W.C.* Lysosomal enzymes in aquatic species. III. Zonal centrifugation studies of thermally acclimated skeletal muscle lysosomes of rainbow trout *Salmo gairdneri* // *Ibid.* P. 593–600.
445. *Morgan I.J., Potts W.T.W., Oates K.* Intracellular ion concentrations in branchial epithelial cells of brown trout (*Salmo trutta* L.) determined by X-ray microanalysis // *J. Exp. Biol.* 1994. Vol. 194. P. 139–151.
446. *Nemova N.N., Sidorov V.S., Vysotskaya R.U.* Integral biochemical index as a tool for the estimation of fish response to environmental pollution in the North aquatic ecosystems // *Environmental pollution of the Arctic: (The second AMAP Intern. Symp., Rovaniemi, Finland, Oct. 1–4, 2002).* Rovaniemi, 2002. P X17.
447. *Néve J.* Physiological and nutritional importance of selenium // *Experientia.* 1991. Vol. 47, N 2. P. 187–193.
448. *Olea M.T., Ma H., Nagata T.* Quantitative assessment of lysosomal size, number and enzyme activity in mouse kidney during maturational development // *Cell. and Mol. Biol.* 1991. Vol. 37, N 7. P. 679–685.
449. *Pagliarani A., Ventrella V., Ballestrazzi R. et al.* Salinity-dependence of the properties of gill (Na⁺, K⁺)-ATPase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Comp. Biochem. and Physiol. B.* 1991. Vol. 100, N 2. P. 229–236.
450. *Perrier H., Laurens G., Perrier C. et al.* Etude des activités de douze enzymes du plasma sanguin de la truite arc-en-ciel et la tanche soumises à diverses formes de contrainte thermique // *Rev. Canad. Biol.* 1980. Vol. 39, N 3. P. 141–147.
451. *Pickering A.D.* Stress responses of farmed fish // *Biology of farmed fish / Ed. K. Black, A.D. Pickering.* Sheffield: Acad. press, 1998. P. 222–255.
452. *Polat A., Conceição L., Sarihan E., Verreth J.* Protein, lipid, and energy metabolism in eleuthero-embryos and starving larvae of the African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell) // *ICES Mar. Sci. Symp.* 1995. Vol. 201. P. 74–79.
453. *Pratap H.B., Bonga S.E., Wendelaar S.E.* Effect of water-borne cadmium on plasma cortisol and glucose in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus* // *Comp. Biochem. and Physiol. C.* 1990. Vol. 95, N 2. P. 313–317.
454. *Precht H.* Concept of the temperature adaptation of unchanging reaction systems of cold-blooded animals // *Physiological adaptation / Ed. C.L. Prosser.* Wash. (D.C.): Amer. Physiol. Soc., 1958. P. 58–70.
455. *Precht H., Christophersen J., Hansel H., Larcher W.* Temperature and life. N.Y.: Springer, 1973. 779 p.
456. *Radhabrishnaiah K.* Accumulation of copper in the fresh water fish, *Zabeo rohita* (Hamilton), on exposure to lethal and sublethal concentrations of copper // *Environ. Biol.* 1988. Vol. 9, N 3. P. 316–326.
457. *Rathaus M., Bernheim J., Katz D. et al.* Effect of sodium and chloride depletion on urinary prostaglandin F_{2a} excretion in potassium loaded rats // *Prostagland. Leukotriens and Essent. Fatty Acids.* 1992. Vol. 46, N 4. P. 277–282.
458. *Renaud J., Moon T.* Starvation and the metabolism of hepatocytes isolated from the American eel, *Anguilla rostrata* Le Sueur // *J. Comp. Physiol. B.* 1980. Vol. 135, N 2. P. 127–137.
459. *Reynolds C., Wills E.D.* The effect of irradiation on lysosomal activation in HeLa cells // *Intern. J. Radiat. Biol.* 1974. Vol. 25, N 2. P. 113–120.
460. *Richards R.H.* Diseases of farmed fish: Salmonids // *Vet. Rec.* 1983. Vol. 112, N 6. P. 124–126.
461. *Salomons W., Forstner U.* Metals in the hydrocycle. B.; Heidelberg: Springer, 1984. 349 p.
462. *Sando G.N., Titus-Dillon P., Hall C.W., Neufeld E.F.* Inhibition of receptor-mediated uptake of lysosomal enzyme into fibroblasts by chloroquine, procaine and ammonia // *Exp. Cell Res.* 1979. Vol. 119. P. 359–364.

463. Sayer M.D.J., Reader J.P., Morris R. The effects of calcium concentration on the toxicity of cooper, lead and zinc to yolk-sac fry of brown trout, *Salmo trutta* L. in soft acid water // J. Fish Biol. 1989. Vol. 3, N 3. P. 323–332.
464. Sayer M.D.J., Reader J.P., Dalziel T.R.K., Morris R. Mineral content and blood parameters of dying brown trout (*Salmo trutta* L.) exposed to acid and aluminium in soft water // Comp. Biochem. and Physiol. C. 1991. Vol. 99, N 3. P.345–348.
465. Schneider R., Nicholson B.L. Bacteria associated with fin rot in hatchery-reared atlantic salmon (*Salmo salar* L.)// Canad. J. Fish. Aquat. Sci. 1980. Vol. 37, N 10. P. 1505–1515.
466. Seibert H. Effects of temperature on glucose release and glycogen metabolism in isolated hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // Comp. Biochem. and Physiol. B. 1985. Vol. 81, N 4. P. 877–883.
467. Sellinger O.Z., Nordrum Z.M. A regional study of some osmotic, ionic and age factors affecting the stability of cerebral lysosomes // J. Neurochem. 1969. Vol. 16. P. 1219–1229.
468. Shulman G.E., Love R.M. Advances in marine biology. Vol. 36. The biochemical ecology of marine fishes. N.Y.; L.: Acad. press, 1999. 361 p.
469. Toole B.P. Glucosaminoglycans in morphogenesis // Cell biology of extracellular matrix / Ed. E.D. Hay. N.Y.: Plenum press. 1981. P. 259–294.
470. Truong T., Medley Q., Côte G.P. Actin-activated Mg-ATPase activity of Dictyostelium myosin. II. Effects of filament formation and heavy chain phosphorylation // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267, N 14. P. 9767–9772.
471. Varute A.T., Patil V.A. Histopathology of alimentary tract of rats infected by *Moniliformis dubius* (Acantocephala). III. Changes in acid and alkaline phosphatases, β -glucuronidase and esterase // Ind. J. Exp. Biol. 1972. Vol. 10, N 4. P. 287–290.
472. Watanabe U. Intracellular digestion of horseradish peroxidase by the intestinal cells of teleost larvae and juveniles // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1982. Vol. 48. P. 37–42.
473. Went A.E.J. Irish salmon fisheries // Atlantic salmon / Assoc. Centennial Award Fund. Montreal, 1980. P. 5–9.
474. Weismann G. Effects of corticosteroids on the stability and fusion of bio-membranes // Asthma: Physiology, immunopharmacology and treatment / Ed. K.F. Austen, L.M. Lichtenstein. N.Y.: Acad. press, 1973. P. 221–233.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМО-ОТНОШЕНИЯ ОРГАНИЗМА И СРЕДЫ	8
1.1. Биохимические адаптации	8
1.1.1. Общие сведения об адаптациях.....	8
1.2. Принципы и методы биохимической индикации состояния рыб в различных эколого-физиологических ситуациях	14
1.2.1. Необходимость биохимической индикации состояния рыб.....	14
1.2.2. Основные принципы эколого-биохимического мониторинга.....	19
Глава 2. РОЛЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ АДАПТАЦИЯХ РЫБ К ИЗМЕНЯЮЩИМСЯ ФАКТОРАМ СРЕДЫ	33
2.1. Участие лизосомальных ферментов в адаптациях рыб к температуре среды	33
2.2. Влияние гипоксии на активность лизосомальных ферментов.....	50
2.3. Роль лизосомальных ферментов в реакциях рыб на токсические воздействия.....	52
2.4. Участие лизосомального аппарата в процессах питания	104
2.5. Использование показателей ферментативной активности в тканях рыб для оценки экологической ситуации в водоеме	118
2.6. Активность лизосомальных и некоторых других ферментов при заболеваниях разной этиологии	122
Глава 3. БИОХИМИЧЕСКИЙ ИНТЕГРАЛЬНЫЙ ИНДЕКС – БИИ.....	151
3.1. Изучение влияния техногенных вод горнообогатительного комбината (ГОКа) на биохимический статус пресноводных рыб.....	154

3.2. Оценка влияния на биохимический статус рыб компонентов буровых растворов	172
3.3. Биохимический интегральный индекс (БИИ).....	174
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	179
ЛИТЕРАТУРА.....	183

CONTENTS

INTRODUCTION.....	5
Part 1. BIOCHEMICAL PECULIARITIES (ASPECTS) OF ORGANISMS – ENVIRONMENT. RELATIONSHIP	8
1.1. Biochemical adaptations.....	8
1.1.1. Common data on adaptations	8
1.2. Principles and methods of biochemical indication of various environment effects on fish state.....	14
1.2.1. General aspects of biochemical indication of fish state.....	14
1.2.2. Principles of ecologo-biochemical monitoring	19
Part 2. ROLE OF LISOSOMAL ENZYMES IN ECOLOGO-BIOCHEMICAL ADAPTATION OF FISH TO CHANGING ENVIRONMENT.....	33
2.1. Role of fish lysosomal enzymes in temperature adaptations	33
2.2. Hypoxia effect on the activity of lysosomal enzymes.....	50
2.3. Role of lysosomal enzymes in fish response to toxic effects...	52
2.4. Role of lysosomal enzymes in the nutrition	104
2.5. Using of the level of lysosomal enzymes activity in fish for the estimation of ecological state of water ecosystems	118
2.6. Activity of lysosomal and some other enzymes under effects of different fish diseases.....	122
Part 3. BIOCHEMICAL INTEGRAL INDEX – BII	151
3.1. Study of the effect of technogenic waters from ore mining and processing enterprise on the biochemical status of freshwater fish.....	154
3.2. Evaluation of influence of drilling fluid components on the biochemical status of fish.....	172
3.3. Biochemical integral index (BII).....	174
CONCLUSION	179
LITERATURE	183

Научное издание

**Немова Нина Николаевна
Высоцкая Римма Ульяновна**

**БИОХИМИЧЕСКАЯ
ИНДИКАЦИЯ
СОСТОЯНИЯ РЫБ**

*Утверждено к печати
Ученым советом
Института биологии
Карельского научного центра
Российской академии наук*

Зав. редакцией *Н.А. Степанова*
Редактор *Е.С. Степанова*
Художник *Ю.И. Духовская*
Художественный редактор *В.Ю. Яковлев*
Технический редактор *О.В. Аредова*
Корректоры *А.В. Морозова, Т.И. Шеповалова*

Подписано к печати 02.11.2004
Формат 60 × 90 1/16. Гарнитура Таймс
Печать офсетная
Усл.печ.л. 13,5. Усл.кр.-отг. 14,0. Уч.-изд.л. 14,0
Тираж 500 экз. Тип. зак. 3690.

Издательство "Наука"
117997, Москва, Профсоюзная ул., 90
E-mail: secret@naukaran.ru
Internet: www.naukaran.ru

Отпечатано с готовых диапозитивов
в ГУП "Типография "Наука"
199034, Санкт-Петербург, 9 линия, 12



Немова Нина Николаевна – доктор биологических наук, профессор, директор Института биологии Карельского НЦ РАН, заведующая лабораторией экологической биохимии. Область научных интересов: фундаментальные и прикладные аспекты биохимии, ихтиологии, биологии развития, токсикологии, экологии животных – рыб и водных беспозвоночных. Автор 300 научных публикаций.



Высоцкая Римма Ульяновна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории экологической биохимии Института биологии Карельского НЦ РАН. Область научных интересов: фундаментальные и прикладные аспекты биохимии, ихтиологии, биологии развития, токсикологии, экологии животных – рыб и водных беспозвоночных. Автор 215 научных публикаций.

Hg

NH₄



O₂

Pb



Cd

ISBN 5-02-032891-X



9 785020 328914

НАУКА