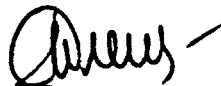


*На правах рукописи*



**Смирнов Лев Павлович**

**РОЛЬ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ В СТАНОВЛЕНИИ  
БИОХИМИЧЕСКИХ АДАПТАЦИЙ  
У ЭКТОТЕРМНЫХ ОРГАНИЗМОВ**

03.00.16 – экология

03.00.04 – биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Петрозаводск - 2005

Работа выполнена в Институте биологии Карельского научного центра  
Российской академии наук

Научный консультант  
доктор биологических наук, профессор Немова Нина Николаевна

Официальные оппоненты:  
доктор биологических наук Аврова Наталия Федоровна  
доктор биологических наук, профессор Замятнин Александр Александрович  
доктор биологических наук, профессор Брызгин Валерий Федорович

Ведущая организация  
Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН  
(ИПЭЭ), г. Москва

Защита состоится "12" января 2005 г. в "14" часов на заседании диссертационного совета Д 212.190.01 при Петрозаводском государственном университете по адресу: 185910, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33, ПетрГУ, эколого-биологический факультет, аудитория 326 теоретического корпуса.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Петрозаводского государственного университета.

Автореферат разослан " " декабря 2004 г.

**Ученый секретарь  
диссертационного совета**

**Крупень И.М.**

2006-4  
4164

2132582

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Адаптация - это способность живых организмов приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды с одновременным повышением вероятности выживания и самовоспроизводства, через включение сначала на клеточном, а затем и тканевом уровнях биохимических механизмов, перестраивающих метаболизм путем количественных и качественных преобразований (Харборн, 1985).

Вопросами изучения биохимических реакций, лежащих в основе приспособления организмов к экологическим условиям, как и аспектами механизмов биотрансформации ксенобиотиков занимается экологическая биохимия - наука, сформировавшаяся на стыке экологии и биохимии (Сидоров, 1983). Актуальность исследований в области экологической биохимии определяется не только возможностью получения данных об особенностях биохимической организации у разных по экологии групп животных и растений и изменениях биохимических показателей в пределах нормы реакции при адаптациях к изменяющимся условиям среды, но также и данными, свидетельствующих о возникновении патологии в связи с ростом антропогенного воздействия на природу. Эти знания являются очень важными для понимания эволюции живых организмов, механизмов их адаптаций к разнообразным условиям существования, разработки проблем эволюции функций (Слоним, 1971; Шварц, 1980; Наточин, 1987; Наточин, Бройнлих, 1991), так как в основе морфологии и физиологии живых организмов лежит определенное своеобразие "химической организации во времени и пространстве" (Опарин, 1957). Изучение биохимического разнообразия ответных реакций также необходимо и для решения задач, связанных с охраной природы, рациональным природопользованием, тестированием и мониторингом природных сред (Шульман, 1972; Лав, 1976; Биргер, 1979; Маляревская, 1979; Шатуновский, 1980; Щербина, 1980; Романенко и др., 1980, 1991; Сидоров, 1983; Лукьяненко, 1983, 1987; Кошелев, 1984; Флеров, 1989; Хорунжая, 1989; Грубинко и др., 1995). Особенно отчетливо взаимосвязь между организмом и средой на биохимическом уровне можно проследить у эктотермных организмов, что связано с большей зависимостью холоднокровных животных от условий среды обитания. Тем не менее, изучению роли различных веществ, в том числе липидов и белков - главных компонентов химической основы любого живого существа, в развитии ответных реакций эктотермного организма на влияние внешних, в том числе антропогенных, факторов уделяется недостаточно внимания, хотя это очень важный аспект общей проблемы биохимических адаптаций. Поэтому концепция данной работы связана с выяснением роли липидов и белков у эктотермных организмов разной организации при их взаимодействии со средой обитания.

**Цель и задачи исследования.** Главная цель работы - установление причинно-следственных связей между различными абиотическими, биотическими, антропогенными факторами окружающей среды и качественной и количественной изменчивостью отдельных компонентов биохимического статуса эктотермных организмов, относящихся к различным классам, но в той или иной



степени связанных с водной средой обитания: микроорганизмов, гельминтов и их хозяев, рыб.

Задачи исследования сводились к следующему:

- исследовать влияние температуры окружающей среды, географического распространения, гостальпной специфичности на липидный и жирнокислотный состав микроорганизмов сем. *Vibrionaceae*, являющихся обычным компонентом бактериальной флоры воды и важным биотическим фактором для рыб;
- выявить биохимические особенности микроорганизмов рода *Aeromonas* на уровне липидов и белков, являющихся патогенными компонентами аэромонад, как биотического фактора и на основе этого создать бесклеточную вакцину против бактериальной геморрагической септицемии карповых и лососевых рыб, вызываемой подвижными аэромонадами;
- провести сравнительное изучение липидного и белкового составов гельминтов класса *Cestoda*, паразитирующих у холоднокровных и теплокровных позвоночных, тканей их хозяев на клеточном и субклеточном уровнях и выявить биохимические особенности, которые связаны с термическим фактором среды обитания;
- выявить у рыб изменения биохимических параметров, происходящие на уровне липидов, белков и низкомолекулярных соединений пептидной природы под действием некоторых факторов среды абиотического (температура), биотического (микроорганизмы, паразитические зоокариоты) и антропогенного происхождения.

**Научная новизна и теоретическое значение работы.** Впервые проведено систематическое исследование изменений липидного и белкового состава разных групп эктотермных прокариотических и эукариотических организмов (микроорганизмов, гельминтов, рыб), обитающих при разных температурах по единой методической схеме. Получены новые данные на всех исследованных группах организмов, о соответствии степени ненасыщенности липидов температуре внутренней среды. Показано, что преадаптация эктотермных животных к вариабельному термическому режиму происходит на биохимическом уровне. Одним из способов реализации этого феномена является изменение качественных и количественных характеристик макромолекул, входящих в состав организмов. На уровне липидов преадаптация реализуется через количественную модификацию спектра этих веществ, осуществляемую путем накопления соединений, физико-химические свойства которых соответствуют температурным условиям того или иного этапа онтогенеза эктотермного организма.

При изучении белковых спектров хроматографическими методами получены данные, свидетельствующие о том, что белковый набор организма распределен по размерным группам, а не существует в виде "молекулярного континуума". Обнаружено, что количественный и качественный состав размерных белковых групп исследованных видов позвоночных животных имеет таксономический ранг.

Утверждается, что изменения на уровне белкового метаболизма у эукариотических организмов, сопровождающиеся ростом числа низкомолекулярных

белков, могут быть связаны не только с эволюционным прогрессом в мире животных и растений, как постулировалось ранее (Благовещенский, 1966; Шульман, Куликова, 1966; Груздев и др., 1972; Смирнов 1977), но и с температурными различиями внутренней среды экто- и эндотермных животных.

Проведено широкое сравнительно-биохимическое изучение изменчивости показателей липидного и белкового обмена у рыб в ответных реакциях на воздействие факторов среды биотического происхождения (паразитических про- и эукариот). Ответные реакции на воздействие паразитических организмов на уровне липидного метаболизма реализуются через нарастание уровня фосфолипидов, содержащих полиеновые кислоты, происходящее в первые часы после контакта с биотическим фактором. В отличие от теплокровных позвоночных, у которых при контакте с патогеном варьирует содержание арахидоновой кислоты в липидах, у рыб наибольшей изменчивостью характеризуются более ненасыщенные эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты.

Впервые исследован у рыб комплекс тканевых низкомолекулярных пептидов с молекулярными массами до 10 кДа. Показано, что фракционному составу пептидов у разных видов рыб присущи особенности таксономического ранга. Продемонстрирована количественная варибельность пептидного пула под влиянием абиотических факторов среды естественного (процессы эвтрофикации водоемов) и искусственного (антропогенное загрязнение) происхождения.

#### **Практическое значение работы.**

Работа является частью многолетних исследований, проводимых в лаборатории экологической биохимии Института биологии Карельского научного центра РАН в рамках Программы ОБН РАН "Проблемы общей биологии и экологии: рациональное использование биологических ресурсов" и "Основных направлений фундаментальных исследований РАН (5.15, 5.21)". Полученные в ходе работы результаты изучения варибельности показателей липидного и белкового метаболизма у рыб под влиянием изменяющихся факторов среды могут быть использованы при разработке систем эколого-биохимического мониторинга и тестирования экологической обстановки в водоемах.

На основе сравнительного анализа ряда биохимических характеристик (липидных и белковых спектров) разных штаммов аэромонад были определены подходы к созданию бесклеточных вакцин против бактериальных болезней рыб. Методическая и экспериментальная проработка вопроса позволила создать на базе вирулентного штамма *Aeromonas sobria* цитоплазматическую вакцину ВЮС-2, обладающую поливалентными свойствами, т.е. высокочувствительную не только против микроорганизмов из группы подвижных аэромонад, но также проявившую протективные свойства в отношении неподвижных аэромонад и вибрионов и стимулирующую повышенную устойчивость рыб к воздействию Т<sub>2</sub>-микотоксина. На разработанный препарат получены 2 патента (патент (19) SU (11) 1839458 A1 (51) 5 C 12 N1/20, A61K 39/02 от 23.01.1995 и патент (19) RU (11) 2080874 (13)C1 (51) 6 A61K39\02 от 10.06.1997).

Полученный материал может быть использован при чтении курса лекций «Экологическая биохимия животных» для студентов биологических факультетов ВУЗов.

#### **Основные положения, выдвигаемые на защиту.**

1. Экотермные организмы разных систематических групп (микроорганизмы, гельминты, рыбы) имеют общие механизмы биохимической адаптации к температуре окружающей среды на уровне липидного и белкового метаболизма.
2. Экотермные организмы приспосабливаются к значительным колебаниям термического режима окружающей среды путем реализации феномена преадаптации жирнокислотных радикалов липидов.
3. На уровне липидного метаболизма ответные реакции рыб на воздействие различных факторов среды биотического происхождения имеют как общие с теплокровными животными черты, так и специфические особенности.
4. Естественные и антропогенные факторы среды оказывают влияние на качественную и количественную вариабельность состава тканевых низкомолекулярных соединений пептидной природы у рыб.

**Апробация работы.** Основные результаты исследования были представлены на Всесоюзных, Российских и региональных конференциях: IX сессии ученого совета "Биологические ресурсы Белого моря и внутр. водоемов Европейского севера", Петрозаводск, 1974; Науч. конф. биологов Карелии, посв. 250-летию АН СССР, Петрозаводск, 1974; Конф. молодых ученых и специалистов Карелии, Петрозаводск, 1975; III Всесоюз. конф. по экологической физиологии рыб, Киев, 1976; III Всесоюз. конф. по биохимии мышц, Ленинград, 1978; Всесоюз. конф. "Эвол. биохимия и происхождение жизни", Ереван, 1978; IV Всесоюз. конф. "Экологическая физиология и биохимия рыб", Астрахань, 1979; IV Всесоюз. биохимическом съезде, Москва, 1979; II Всесоюз. совещании по генетике, селекции и гибридизации рыб, Ростов-на-Дону, 1981; V Всесоюз. конф. по экологической физиологии и биохимии рыб, Севастополь, 1982; Всесоюз. конф. "Современные проблемы эволюционной биохимии и происхождения жизни", Петрозаводск, 1984; VI Всесоюз. конф. по экологической физиологии и биохимии рыб, Вильнюс, 1985; III Всес. симпозиуме "Структура и функции лизосом", Тбилиси, 1986; I симпозиуме по экологической биохимии рыб, Ярославль, 1987; VI Всесоюз. конф. по биохимии мышц, Тбилиси, 1989; VII Всесоюз. конф. по экологической физиологии и биохимии рыб, Ярославль, 1989; II симпозиуме по экологической биохимии рыб. Ярославль, 1990; IX Всесоюзное совещании по паразитам и болезням рыб. Ленинград, 1990; VIII науч. конф. по экологической физиологии и биохимии рыб, Петрозаводск, 1992; Всеросс. конф. "Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера", Петрозаводск, 1995; Юбилейной науч. конф. "50 лет Карельскому научному центру Российской Академии наук", 1996; Всеросс. конф. "Экологическая физиология и биохимия осетровых рыб", Ярославль, 1997; Первом конгрессе ихтиологов России, Астрахань, 1997; конф. "Антропогенное воздействие на природу севера и его экологические последствия", Апатиты, 1998; IX Всероссийская конф. по экологической физиологии и биохимии рыб, Ярославль, 2000; IX Всероссийской конференции по экологической физиологии

и биохимии рыб (Ярославль 2000); Всеросс. конф. "Проблемы воспроизводства, кормления и борьбы с болезнями рыб при выращивании в искусственных условиях", Петрозаводск, 2002; III Съезде биохимического общества, Санкт-Петербург, 2002; Всеросс. конф. "Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов", Москва, 2003; Российском симпозиуме по химии и биологии пептидов, Москва, 2003.

А так же и на международных конференциях: XVI conf. FEBS. Moscow, 1984; VII национальной конф. по паразитологии, Варна, Болгария, 1987; III International symposium "Problems of fish parasitology", Petrozavodsk, 1991; VII Intern. EAFP Conf., Spain, Palma de Mallorca, 1995; Межд. симпозиуме "Karelia and Norway: the main trends and prospects of scientific cooperation", Petrozavodsk, 1997; I Межд. конф. Баренц Евро-Арктического региона "Биоиндикация и оценка повреждения организмов и экосистем", Петрозаводск, 1997; First Russia-USA symposium "Aquaculture and Fish Health". Moscow, 1998; II(XXV) Междунар. конф. "Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера", Петрозаводск, 1999; 3<sup>rd</sup> international Lake Ladoga symposium. Monitoring and sustainable management of Lake Ladoga and other large lakes, Petrozavodsk, 1999; Межд. конф. "Биологические основы изучения, освоения и охраны животного и растительного мира, почвенного покрова Восточной Фенноскандии", Петрозаводск, 1999; International Conference "Biodiversity of the European North" (Petrozavodsk, 2001); 3<sup>rd</sup> International Symposium on Trace Elements in Human: New Perspectives (Athens, Greece, 2001); 11<sup>th</sup> International Symposium on Trace Elements in Man and Animals (California USA, 2002); 21<sup>st</sup> Workshope "Essentiality and Toxicity of Macro, Trace and Ultratrace Elements" (Germany, 2002), XI Международном симпозиуме "Modern Problems of Bioindication and Biomonitoring", Syktyvkar, 2003; 10th International Congress of Toxicology: "Living in a Safe Chemical World". Tampere, Finland. 2004.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 130 работ, в том числе 1 монография.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 411 страницах, в числе которых 70 таблиц и 52 рисунка. Она включает введение, информацию об объектах и методах исследования, 3 главы, состоящих из краткого обзора, описания результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающей 690 публикаций, из них 374 иностранных.

**Благодарности.** Посвящая эту работу свежлой памяти своего учителя д.б.н, профессора В.С. Сидорова. Выражаю признательность своему научному консультанту д.б.н., профессору Н.Н. Немовой за поддержку, ценные советы и рекомендации. Благодарность от всей души к.б.н., ст.н.с. В.В. Богдан и к.б.н., ст.н.с. Л.Н. Юхименко, с которыми я творчески сотрудничаю в течение многих лет.

## 1. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 1.1. Общий список исследованных видов

В настоящей работе были использованы различные виды экто- и эндотермных организмов от бактерий до теплокровных позвоночных.

Микроорганизмы сем. *Vibrionaceae* - *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas* sp.

Гельминты – представители трех классов: Cestoda - *Diphyllobothrium dendriticum*, *Eubothrium crassum*, *Triaenophorus nodulosus*, *Ligula intestinalis*, *Schistocephalus solidus*; Nematoda - *Toxascaris leonina*; Acanthocephala - *Metechinorhynchus salmonis*.

Рыбы - карась (*Carassius carassius*), карп (*Cyprinus carpio*), колюшка трехиглая (*Gasterosteus aculeatus*), налим (*Lota lota*), окунь (*Perca fluviatilis*), палия (*Salvelinus lepechini*), плотва (*Rutilus rutilus*), радужная форель (*Parasalmo mykiss*), сиг (*Coregonus lavaretus*), щука (*Esox lucius*).

Птицы – чайка-клуша (*Larus fuscus*), ворона (*Corvus corone*).

Млекопитающие - крыса (*Rattus norvegicus*).

### 1.2. Сбор материала по микроорганизмам и их влиянию на рыбу

Сбор материала проводили на экспериментальной базе ВНИИПРХ (пос. Рыбное Московской обл.). Микроорганизмы получены из коллекции лаб. ихтиопатологии ВНИИПРХ. Их идентификация и выращивание бактериальной массы проведены ст.н.сотр. лаб. ихтиопатологии ВНИИПРХ Л.Н. Юхименко. Бактериальную массу смывали с чашек Петри охлажденным физиологическим раствором (0,15 М NaCl) и центрифугировали при 6000 г в течение 10 мин. Осадок дважды промывали и центрифугировали.

Часть осадка, предназначенную для исследования липидного и жирнокислотного состава, фиксировали 96%-ным этанолом и хранили до анализа при +4°C. Другую часть заливали трис-солянокислым буферным раствором, pH 6,9, в соотношении 1:2 (вес:объем), содержащим 2% додецилсульфата натрия (ДСН) и 5% 2-меркаптоэтанола. Смесь нагревали при 100°C в течение 5 мин., затем осветляли центрифугированием при 6000 г 5 мин. Прозрачный супернагант желтого цвета использовали для исследования белкового состава.

Все эксперименты по изучению влияния микроорганизмов на рыбу спланированы и осуществлены в аквариальных условиях нами совместно с сотрудниками лаб. ихтиопатологии под руководством ст.н.сотр. Л.Н. Юхименко. В качестве объекта наблюдения были использованы чешуйчатые карпы различного возраста от 0<sup>+</sup> до 2<sup>+</sup>. Изменение биохимических показателей (липиды, жирные кислоты, белки) исследовали в крови, гепатопанкреасе и мышцах рыб.

### 1.3. Сбор материала по гельминтам и их хозяевам

В настоящей работе исследованы гельминты рыб: цестоды *Eubothrium crassum* из пилорических придатков палии; плероцеркоиды *Triaenophorus nodulosus* из печени налима, *Diphyllobothrium dendriticum* и *Schistocephalus solidus* из полости тела колюшки трехиглой, *Ligula intestinalis* из полости тела плотвы; представитель акантоцефал *Metechinorhynchus salmonis* из кишечника сига. Из гельминтов теплокровных позвоночных изучены цестода *D. dendriticum* из кишечника серебрястых чаек (*Larus argentatus*) и клуш (*L. fuscus*) и нематода *Toxascaris leonina* из кишечника песца (*Alopex lagopus*).

Исследовали также ткани хозяев – печень и мускулатуру.



#### 1.4. Сбор материала для анализа состава низкомолекулярных пептидов

Качественный и количественный фракционный состав пептидов с молекулярными массами ниже 10 кДа исследовали в печени и мускулатуре сигов (*Coregonus lavaretus*), окуней (*Perca fluviatilis*), карасей (*Carassius carassius*), плотвы (*Rutilus rutilus*), щук (*Esox lucius*).

Техногенное воздействие протоклов выявляли у рыб, отловленных в водоемах с различной степенью загрязнения. Кроме этого при изучении влияния накопления ртути на рыбу были поставлены аквариальные опыты.

#### 1.5. Методы исследований

##### 1.5.1. Методы исследования липидов

Методы исследования липидов включали в себя экстракцию (Кейтс, 1975), количественное определение (Сидоров и др., 1972), газо-жидкостную хроматографию метиловых эфиров жирных кислот, полученных прямой перэтерификацией липидов в абсолютном метаноле (Цыганов, 1971). Метиловые эфиры разделяли в изотермическом режиме (190°C) на газожидкостных хроматографах "Pye Unicam" и "Хром-41"

Идентификацию жирных кислот проводили: а) с помощью доступных метчиков (метиловых эфиров миристиновой, лауриновой, пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой, арахидиновой, бегеновой, эруковой кислот); б) сравнением численных значений относительных удерживаемых объемов  $V_r^{отн}$  с литературными данными (Ackman, Burgher, 1965; Болгова, 1978), где  $V_r^{отн} = V_{r1}/V_{r2}$  ( $V_{r1}$  и  $V_{r2}$  - удерживаемые объемы идентифицируемой кислоты и известной (олеиновой), соответственно); в) временами удерживания метчиков, а также по совпадению вычисленных эквивалентных длин цепей молекул с табличными данными (Jamieson, Reid, 1969, Jamieson, 1975).

Концентрацию индивидуальных жирных кислот рассчитывали по методу Барлетта и Айверсона (Bartlett, Iverson, 1966).

##### 1.5.2. Методы исследования белков и низкомолекулярных пептидов

###### 1.5.2.1. Жидкостная хроматография низкого давления (ЖХНД) на гелях Sephadex

Подготовка образца для гель-хроматографии. Пробу размораживали, навеску ткани измельчали, разбавляли 0,1 М трис-солянокислым буферным раствором (рН 7,2-7,4) в соотношении 1:1 (вес:объем), гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера-Эльвейзма с тefлоновым пестиком в течение 2-3 мин. Затем гомогенат центрифугировали 1 час при 150 000 g. Супернатант объемом 3-5 мл хроматографировали в восходящем потоке элюента (0,05 М трис-НСl, 0,1 М КСl, рН 7,2-7,4) со скоростью 20 мл/час на колонках, заполненных Sephadex G-100.

Измеряли объемы элюции ( $V_e$ ) фракций, вычисляли  $K_{av}$  и по калибровочному графику определяли молекулярные массы фракций.

Калибровочный график строили по результатам хроматографии белков с известными молекулярными массами (бычий сывороточный альбумин - 67 кДа, овалбумин - 46 кДа, трипсин - 24 кДа, цитохром "С" - 12,6 кДа).

Относительное содержание белка во фракциях высчитывали триангуляционным методом (Берчфилд, Сторрс, 1964).

#### **1.5.2.2. Электрофорез белков**

Для сравнительного исследования как водорастворимых, так и мембранных белков использовали различные варианты диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по Дэвису (Davis, 1964). Запасные растворы буферных систем, мелко- и крупнопористого гелей готовили по стандартной прописи (Маурер, 1971; Остерман, 1981).

Мембранные белки разделяли модифицированным методом диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) (Laemmli, 1970).

#### **1.5.2.3. ЖХНД низкомолекулярных пептидов**

Подготовка образца. Для экстракции водорастворимых низкомолекулярных пептидов замороженную навеску образца (примерно 1 г), измельчали в фарфоровой ступке, добавляли 0,15 М раствор NaCl в соотношении 1:2 (масса образца: объем раствора), гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера-Эльвейзма. Супернатант после центрифугирования подвергали ультрафильтрации в ячейке ФМ02-10 (Россия) на мембране УМ-30 (Amicon Corp., USA). Полученный фильтрат, содержащий полипептиды с молекулярными массами 30 кДа и ниже, использовали для хроматографии.

Для хроматографического разделения использовали стандартный набор оборудования фирмы LKB (Швеция). Колонку (K<sub>1670</sub>) наполняли гелем TSK HW-40F (Fine) или 40S (Superfine) (Toyo Soda Corp., Japan) методом постоянной скорости в строгом соответствии с инструкцией фирмы изготовителя (пределы деления по молекулярной массе от 0,5 до 10 кДа) и уравнивали 0,15М раствором NaCl. Для калибровки колонки использовали окситоцин (1 кДа),  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи инсулина (2,5 и 3,5 кДа), а также интактный инсулин (6 кДа).

#### **1.5.2.4. Спектроскопический анализ пептидов**

Полученные фракции исследовали спектрофотометрически (Specord UV VIS). Их количественную оценку проводили по измерению экстинкции при длине волны 207 нм (пептидные связи) и 250 нм (меркаптидные связи) (Кантор, Шиммель, 1984).

Концентрацию пептидов определяли по калибровочному графику зависимости экстинкции при 207 нм от концентрации белка.

### **1.5.3. Получение препаратов лизосом**

Выделение лизосом. Для сравнительного изучения липидного и белкового состава мембран лизосом использовали гельминтов *E. crassum*, *D. dendriticum*. Живых гельминтов промывали в физиологическом растворе и гомогенизировали в растворе 0,25 М сахарозы, pH 7,2, содержащем 0,001 М ЭДТА, в соотношении 1:9. Время гомогенизации 30 сек., скорость вращения пестика 1200 об/мин. Все операции проводили при +4°C. Фракцию обогащенную лизосомами выделяли из полученного гомогената методом дифференциального центрифугирования (Покровский, Тутельная, 1976). Лизосомальную фракцию центрифугировали в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (100000 г, 2 часа). "Легкая" лизосомальная субфракция (первичные лизосомы) фиксировалась на границе между слоями сахарозы с  $\rho = 1,09$  и 1,14. Ее собирали и подвергали 10-кратному замораживанию-оттаиванию, мембраны лизосом осаждали при 105000g (30 мин.).

Пробы на липидный и жирнокислотный анализ фиксировали 96%-ным этанолом.

Мембранные белки солибилизировали в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,0, содержащем 1-3% додецилсульфата натрия и 1% 2-меркаптоэтанола, при 100°C в течение 5 мин.

#### 1.5.4. Определение активности ферментов

Активность маркерного фермента лизосом – кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2) определяли по Бессею с соавт. (Bessey et al., 1946) и выражали в микромолях р-нитрофенола, образовавшегося за 1 мин в пересчете на 1 г сырой ткани при рН 4,8 и 37°C. Определение щелочной фосфатазы проводили при значениях рН от 8,7 до 10,1 (Покровский, Тутельян, 1976). Для измерения активности дезоксирибонуклеазы использовали методику А.А. Покровского (Покровский, 1969), рибонуклеазы – А.П. Левицкого с соавт. (1973). Активность выражали в условных единицах изменения оптической плотности раствора ( $E_{260}$  на 1 г сырой ткани за 1 мин при 37°C). Активность  $\beta$ -глюкозидазы определяли по методу А.А. Покровского с соавт. (1971). Активность трипсиноподобной эндопротеиназы ( $E_{525}$ /1 г ткани/30 мин инкубации) определяли, используя в качестве субстрата 0,065 М раствор этилового эфира бензоиларгинаина (Алексеевко, 1968а). Активность кислой карбоксипроотеиназы определяли по методу Ансона с модификациями ( $E_{280}$ /1 г ткани/ 60 мин), используя в качестве субстрата 1%-ный раствор гемоглобина в ацетатном буфере рН 3,6 (Алексеевко, 1968б). Нейтральные и щелочные протеиназы определяли по методу Кунигца (Алексеевко, 1968б) при соответствующих значениях рН (7,0 и 8,5) и их активность выражали в тех же единицах.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами биометрии (Лакин, 1973; Кокунин, 1975).

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Экологическая вариабельность липидного состава разных штаммов *A. hydrophila*

Исследован липидный состав трех штаммов *A. hydrophila*, выделенных из разных экологических ниш и географических зон. Штаммы 78-16 и 256 найдены в республике Молдова. Первый выделен из паренхиматозных органов карпа, другой – из воды. Штамм 114 выделен из воды рыбохозяйства Якоть в Московской области. Наибольшее количество липидов обнаружено у штаммов 256 и 78-16 из Молдовы в 1,3 – 1,5 раз превышавшее уровень липидов у штамма 114 из Подмосквья.

Штамм 78-16, выделенный из тканей карпов, отличался наиболее высокой концентрацией триацилглицериннов (ТАГ) и нейтральных липидов (сумма ТАГ и эфиров стериннов). Уровень ТАГ у штаммов 256 и 114, выделенных из воды, был существенно ниже и проявил тенденцию к сходимости. Эти штаммы, вне их географической приуроченности, проявляли сходство как по относительному содержанию фосфолипидов, так и по уровню нейтральных липидов. Необходимо подчеркнуть, что эти различия обнаружены у микроорганизмов, которые культивировались в одинаковых условиях.

Полученные результаты, на наш взгляд, свидетельствуют о преадаптации количественных соотношений липидных компонентов у микроорганизмов к физико-химическим условиям той экологической ниши, в которой данные микроорганизмы обитали до изъятия.

## **2.2. Экологическая варибельность жирнокислотного состава *A. hydrophila* и *A. sobria***

Для изучения влияния среды выращивания на жирнокислотный (ЖК) состав микроорганизмов были использованы два представителя рода *Aeromonas* – *A. hydrophila* (штамм 78-16) и *A. sobria* (штамм 77-18), выделенные из внутренних органов карпа (*Cyprinus carpio*) и толстолоба (*Hypophthalmichthys molitrix*). У обоих штаммов, независимо от среды выращивания, состав жирных кислот качественно был идентичен. Сопоставление ЖК спектров аэромонад и питательных сред показало, что, во-первых, набор ЖК микроорганизмов был значительно беднее такового питательных сред и, во-вторых, концентрация отдельных ЖК кислот менялась в зависимости от среды культивирования, но выраженной корреляции между долей отдельных кислот в питательных средах и выращенных на них бактерий не обнаружено, что может свидетельствовать о том, что микроорганизмы кроме синтеза собственных кислот обладают механизмами избирательного поглощения ЖК из окружающей среды.

Эти данные свидетельствуют о том, что условия внешней среды (в данном случае тип агара, имеющий определенный химический состав) влияют на количественные соотношения отдельных ЖК в липидах аэромонад, а обнаруженные различия в соотношениях ЖК между исследованными бактериями, выращенными в одинаковых условиях, возможно отражают их видовую специфику.

## **2.3. Жирнокислотный состав у штаммов *A. hydrophila* из разных географических зон и экологических ниш**

Сравнительный анализ ЖК состава штаммов 78-16, 114 и 256 показал, что по относительному содержанию короткоцепочечных ( $C_{14}$ ) кислот и кислот с нечетным числом атомов углерода ( $C_{15}$  и  $C_{17}$ ) штаммы 78-16 и 256, собранные в Молдове, обладали сходством между собой и отличались от штамма 114, обнаруженного в прудах Подмосквья.

Вне зависимости от географической зоны, штаммы 256 и 114, выделенные из водной среды, обнаружили значительное сходство по уровню стеариновой ( $C_{18\ 0}$ ), доминирующих пальмитоолеиновой ( $C_{16\ 1}$ ), олеиновой ( $C_{18\ 1}$ ) и минорных линоленовой ( $C_{18\ 3}$ ) и эйкозамоноеновой ( $C_{20\ 1}$ ) кислот. Штамм 78-16, из внутренних органов карпа, по этим показателям заметно отличался от штаммов 256 и 114. Относительная концентрация стеариновой ( $C_{18\ 0}$ ) и олеиновой ( $C_{18\ 1}$ ) кислот у аэромонад из внутренних органов карпа была заметно выше, а пальмитоолеиновой ( $C_{16\ 1}$ ) – ниже, чем у микроорганизмов, обитавших в воде. Эти данные, по нашему мнению, указывают на образ жизни этих микроорганизмов -

сапрофитный (в толще воды и на дне водоема) или паразитический (в тканях рыб), поскольку штамм 78-16 был выделен из внутренних органов карпов.

Для проверки этой гипотезы был дополнительно проведен сравнительный анализ штаммов *A. hydrophila*, выделенных из тканей карпа в различных регионах России и стран СНГ (табл. 1). ЖК спектры всех микроорганизмов, паразитировавших во внутренних органах карпа, проявили тенденцию к сходству, особенно по доминирующим ЖК. Только штамм 56-6 из Казахстана характеризовался некоторыми отличиями – более низким по сравнению с другими штаммами содержанием пальмитоолеиновой ( $C_{16:1}$ ) кислоты и более высоким (в 2-3 раза) уровнем стеариновой ( $C_{18:0}$ ). Вероятно, это связано с тем, что данный образец выделен не из паренхиматозных тканей, а из язвенного экссудата.

Таблица 1

**Жирные кислоты некоторых штаммов *A. hydrophila* из разных регионов и биотопов**

Биотоп Регион	Внутренние органы карпа				Вода	
	Молдова n = 9	Кострома n = 4	Минск 404	Казах- стан 56-6	Молдова 256	Подмос- ковье 114
Жирные кислоты						
14 0	2,2±0,5	1,8±0,2	0,9	2,9	1,0	1,7
14 1	0,9±0,2	1,1±0,3	0,2	0,5	0,4	1,9
15 0	1,6±0,3	1,5±0,2	0,8	0,6	0,7	1,4
15 1	0,9±0,2	1,0±0,2	0,5	0,7	0,3	1,3
16 0	22,3±0,8	20,8±1,1	24,8	23,3	25,2	20,3
16 1	37,8±2,1	37,6±2,5	38,5	29,1	48,2	46,5
17 0	2,7±0,4	4,1±0,3	1,9	1,0	1,1	3,0
17 1	2,8±0,5	2,7±0,2	2,1	0,8	1,5	3,0
18 0	3,2±0,7	4,0±1,0	3,3	10,1	1,4	1,2
18 1	20,8±1,2	22,7±1,8	24,6	22,3	17,5	17,8
18 2	1,4±0,4	0,5±0,1	0,8	2,6	0,6	0,4
18 3	0,8±0,3	0,5±0,1	0,3	1,9	0,4	0,3
20 1	1,3±0,5	0,5±0,1	0,4	0,8	0,4	0,5
20 3	2,0±0,6	2,0±0,2	1,2	3,4	1,3	0,7

При сравнительной оценке групповых соотношений ЖК обнаружено, что у штаммов из паренхиматозной ткани карпа было больше насыщенных и меньше ненасыщенных и моноеновых кислот, чем у образцов из водной среды. Выявленные различия, на наш взгляд, могут быть связаны не только с преадаптацией бактерий к природным условиям, но и отражать их физиологические особенности, а именно: микроорганизмам, обитающим в воде, окружающая среда предъявляет более высокие требования к двигательной активности, чем к бактериям, живущим в тканях хозяина. Подвижность микроорганизмов может быть определена величиной отношения суммы  $C_{16:1}$  и  $C_{18:1}$  кислот к сумме  $C_{16:0}$  и  $C_{18:0}$  (Зезеров и др., 1990) Соотношение  $\Sigma C_{16:1} + C_{18:1} / \Sigma C_{16:0} + C_{18:0}$  у штаммов из воды было в 1,4 раза выше, чем образцов из внутренних органов карпа, что подтверждает высказанное предположение.

#### 2.4. Жирнокислотный состав микроорганизмов, относящихся к разным родам сем. *Vibrionaceae*

Обнаружено, что по ЖК составу общих липидов представители сем. *Vibrionaceae* имеют достаточно четкие различия на уровне рода (*Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*) (табл. 2). Тем не менее наши и полученные другими исследователями данные (Hansen et al., 1991), указывают на то, что из-за высокой изменчивости состав ЖК бактерий может быть использован как таксономическая характеристика только в сумме с другими более устойчивыми признаками, например, данными по белковым спектрам.

Таблица 2

Жирнокислотный состав представителей разных групп сем. *Vibrionaceae*,  
M±m (CV)

Жирные кислоты	Подвижные аэромонады n=18	Вибрионы n=23	Неподвижные аэромонады n=8	Псевдомонады n=3
14 0	1,9±0,3 (56,1)	1,4±0,4 (58,2)	1,6±0,2 (35,3)	1,0±0,3 (45,7)
14 1	0,7±0,1 (75,0)	0,4±0,04 (18,8)	0,3±0,02 (14,4)	0,2±0,03 (24,7)
15 0	1,6±0,2 (41,1)	0,6±0,2 (46,3)	0,4±0,05 (32,5)	0,4±0,1 (41,7)
15 1	0,8±0,1 (64,9)	0,5±0,1 (29,3)	0,5±0,1 (65,3)	0,2±0,1 (69,3)
16 0	21,8±0,6 (10,4)	28,4±1,5 (16,8)	31,2±2,5 (16,0)	37,7±1,3 (6,1)
16 1	36,6±1,8 (20,6)	30,5±2,4 (34,7)	31,2±3,7 (29,1)	33,8±3,2 (16,4)
17 0	2,9±0,3 (42,3)	1,4±0,3 (65,6)	0,6±0,07 (29,0)	0,5±0,1 (28,6)
17 1	2,9±0,4 (53,7)	0,7±0,2 (34,2)	0,8±0,1 (38,8)	1,9±1,0 (79,0)
18 0	4,0±1,0 (105,2)	5,3±0,8 (22,2)	5,4±1,2 (32,2)	4,5±0,7 (25,6)
18 1	21,8±0,8 (14,8)	23,9±1,4 (8,0)	15,3±0,9 (13,8)	17,5±2,1 (20,9)
18 2	0,8±0,2 (85,9)	2,1±0,2 (11,5)	2,1±0,7 (70,3)	1,0±0,5 (88,0)
18 3	0,7±0,2 (90,1)	0,8±0,1 (23,2)	0,9±0,2 (40,2)	0,8±0,4 (78,0)
20 1	0,9±0,3 (110,9)	0,4±0,1 (44,6)	0,7±0,1 (31,9)	0,5±0,2 (60,0)
20 3	2,0±0,3 (48,4)	3,8±1,0 (37,9)	2,7±0,5 (45,3)	1,5±0,5 (43,9)
Σ <sub>насыщ</sub>	31,9±1,2 (14,8)	37,0±1,9 (13,0)	40,8±2,3 (13,7)	44,2±1,9 (7,5)
Σ <sub>16 1+18 1</sub>	2,3	1,6	1,3	1,2
Σ <sub>16 0+18 0</sub>				
Σ <sub>полиен</sub>	3,5±0,6 (86,5)	6,7±1,4 (57,9)	5,7±2,5 (82,0)	3,2±0,7 (46,5)

Выявленные отличия между разными представителями сем. *Vibrionaceae* возможно определяются уровнем двигательной активности. Так, общее содержание ненасыщенных кислот, соотношение 16:1+18:1/16:0+18:0 у подвижных аэромонад и вибрионов выше, чем у псевдомонад и неподвижных аэромонад.

У неподвижных аэромонад и вибрионов повышенная по сравнению с подвижными аэромонадами и псевдомонадами суммарная концентрация 18:2, 18:3, 20:3 кислот может быть связана с преадаптацией микроорганизма к определенному типу хозяина. Так, неподвижные аэромонады и вибрионы заражают лососевых рыб, а подвижные аэромонады и псевдомонады инфицируют карповых рыб. Если учесть, что концентрация полиеновых кислот в тканевых липидах карповых ниже, чем у лососевых рыб (Сидоров, 1983), то более высокая относительная доля полиеновых

кислот у неподвижных аэромонад и вибрионов по сравнению подвижными аэромонадами и псевдомонадами скорее всего обусловлена именно с преадаптацией к среде обитания (гостальной спецификой).

### 2.5. Температурная преадаптация ЖК спектров у вибрионов

В ЖК спектрах образцов *V. anguillarum*, собранных в зоне субтропиков (Геленджик), средней полосе (Выборг) и в арктическом регионе (Мурманск) и выделенных из различных тканей лососевых рыб (почки, кишечник, селезенка рыб, поверхностные язвы на их теле), а также из воды, выявлены различия, обусловленные, по-видимому, температурными условиями среды, в которых бактерии обитали до сбора (табл. 4).

Таблица 4

Липидный состав штаммов *V. anguillarum* в зависимости от региона сбора, М±m

Жирные кислоты	Геленджик n=6	Выборг n=8	Мурманск n=9
14 0	2,28±0,76	0,82±0,14	1,15±0,17
14 1	0,45±0,01	0,39±0,67	0,44±0,04
15 0	1,05±0,29	0,24±0,06	0,51±0,10
15 1	0,47±0,07	0,50±0,09	0,47±0,07
16 0	34,03±3,14	25,78±1,18	25,23±0,26
16 1	25,60±2,43	34,89±2,20	31,00±2,47
17 0	1,57±0,44	1,30±0,28	1,29±0,29
17 1	0,43±0,05	0,89±0,20	0,77±0,14
18 0	6,62±0,45	4,30±0,90	5,07±0,95
18 1	21,72±1,49	24,68±0,97	25,27±2,01
18 2	1,88±0,51	1,98±0,29	2,33±0,31
18 3	0,90±0,57	0,60±0,09	0,95±0,39
20 1	0,58±0,32	0,30±0,10	0,27±0,10
20 3	2,54±0,47	3,40±0,72	5,32±0,74
В том числе			
Насыщенных	45,55±3,61	32,33±1,38	33,24±0,84
Полиеновых	5,32±1,55	5,98±1,10	8,60±1,44

Несмотря на то, что в наших экспериментах все образцы были выращены в изотермическом режиме, в бактериальных мембранах штаммов, обитающих при более высокой температуре (Геленджик), на фоне повышенного уровня общих липидов выявлена достоверно большая относительная доля насыщенных жирных кислот, в основном за счет пальмитиновой, чем у бактерий из регионов, расположенных севернее. Кроме того, в спектрах штаммов по мере продвижения их на север (от Выборга к Мурманску) прослеживается тенденция к увеличению уровня полиеновых кислот в липидах, в основном за счет 20:3 кислоты, концентрация которой возросла в 1,3-2 раза, вследствие чего общая ненасыщенность жирных кислот вибрионов из Выборга и Мурманска оказалась выше, чем у таковых из субтропической зоны. Т.е. в данном случае наблюдается феномен преадаптации бактерий *V. anguillarum* температурным условиям региона обитания.

## 2.6. Стратегия создания вакцины против бактериальной геморрагической септицемии карповых рыб, вызываемой подвижными аэромонадами

Для получения большинства известных вакцин используются ослабленные или убитые бактерии и вирусы (Ada, 1997). В настоящее время такие вакцины - бактерины против ряда серьезных заболеваний рыб (стрептококкоза, вибриоза, фурункулеза, йерсиниоза) разрабатываются как у нас в стране, так и за рубежом (США, Канада, страны Скандинавии, Германия) (Сердюк, 1994; Katsuhiko et al., 1983; Newman, 1985). Степень их эффективности снижается под действием вторичной инфекции, возникающей за счет других грамотрицательных микроорганизмов, главным образом, подвижных аэромонад. В то же время все попытки получения высокоэффективных бактеринов против подвижных аэромонад не увенчались успехом. Это связано с большим разнообразием биохимического состава наружной мембраны бактерий, что препятствует созданию защиты у рыб против гетерологичных штаммов аэромонад.

Субклеточные препараты, содержащие один или несколько антигенов, могут снять многие проблемы, связанные с использованием целого организма как вакцины. Существует несколько подходов к получению таких вакцин. Один из них - выделение из микроорганизмов и вирусов факторов патогенности, которые различными биохимическими методами готовятся в препаративных масштабах и используются как вакцина (Malik, 1989).

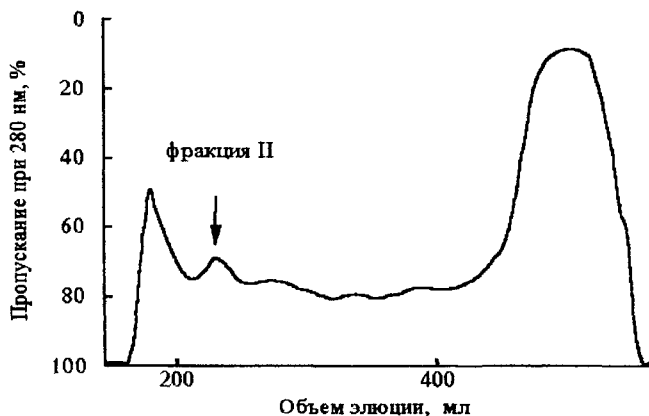


Рис. 1. Хроматограмма белкового экстракта *A. sobria* (штамм 77-18).

Методом гель-хроматографии на Sephadex G-100 из высоковирулентного штамма *A. sobria* (77-18) выделена белковая фракция (II) с молекулярной массой 50-70 кДа (рис. 1), которая при внутримышечной или внутривентральной инъекции вызывала появление клинических симптомов, характерных для данной инфекции (припухлость и гиперемия), а также стимулировала



максимальный защитный эффект при заражении культурой живых аэромонад, что и послужило основанием для использования белков этой фракции в работе над препаратом вакцины.

Исследование иммуногенных свойств фракции II показало, что она активирует такие факторы иммунитета у рыб, как антителообразование, синтез лизоцима, адгезию бактериальных патогенов к эпидермальной слизи, миграцию макрофагов в конечный отдел кишечника, фагоцитоз (Гусева, 1998). В ходе экспериментальной проверки фракции II как вакцины обнаружено выраженное терапевтическое действие у заболевших рыб (полностью исчезали все язвы, восстанавливался товарный вид рыбы) и выявлена ее поливалентность (Юхименко и др., 1998). Белки этой фракции защищали карпов как от гомологичных, так и гетерологичных штаммов подвижных аэромонад (*A. sobria*, *A. hydrophila*), стимулировали высокий уровень напряженности иммунитета у лососевых рыб к фурункулезу (*A. salmonicida*) и вибриозу (*Vibrio anguillarum*). Защитное действие фракции II продемонстрировано также на канальных сомах при энтеросептической инфекции смешанной этиологии, вызванной представителями семейств *Vibrionaceae* и *Enterobacteriaceae*.

Выявлены ее антидотные свойства при отравлении радужной форели T-2 микотоксином (Гусева, 1998). После производственной апробации полученный препарат запатентован как вакцина против бактериальной геморрагической септицемии рыб (ВЮС-2) (Юхименко, Смирнов, 1997).

### **Глава 3. Сравнительное изучение липидного и белкового составов гельминтов, паразитирующих у холоднокровных и теплокровных позвоночных**

#### **3.1. Сравнительный анализ липидов цестод и их хозяев**

Сравнительный анализ липидного состава цестод *E. crassum* и *D. dendriticum*, представителей отряда *Pseudophyllidea*, паразитирующих у разных по эволюционному положению и физиологическому статусу хозяев (лососевые рыбы и теплокровные позвоночные – птицы и млекопитающие), с определенной долей вероятности показал, что липидный состав этих гельминтов указывает на адаптацию этих гельминтов к своим хозяевам, как к среде обитания. В особенности это заметно у *E. crassum*, количественное соотношение между основными липидными фракциями которого занимает промежуточное положение по отношению к таковому тканей палии. Вектор изменения уровня липидов в тканях паразита соответствовал динамике липидного состава в ткани кишечника. Однако полученные нами результаты сравнительного изучения липидных составов гельминтов и их хозяев не дают однозначного ответа на вопрос о том, как температура окружающей среды влияет на количественные соотношения между липидными фракциями у паразитов.

#### **3.2. Жирнокислотный состав липидов гельминтов и их хозяев**

##### **3.2.1. Сравнительный анализ жирнокислотного состава *E. crassum*, *D. dendriticum* и тканей их хозяев**

Сравнительный анализ ЖК *E. crassum*, *D. dendriticum*, печени, мышц и химуса палии и клуши выявил отсутствие количественной идентичности ЖК спектров цестод и тканей их хозяев, что свидетельствует о наличии у паразитов механизмов избирательного поглощения ЖК (рис. 2).

В системах "паразит-холоднокровный хозяин" и "паразит-теплокровный хозяин" выявляется определенная направленность в количественном распределении ЖК, дающая в конечном итоге существенные различия между ЖК спектрами холоднокровных и теплокровных позвоночных, и их гельминтов.

На формирование ЖК спектров гельминтов, как эктотермных организмов, оказывают влияние несколько факторов – это генетический (видовая специфика), трофический (диета хозяина), термический режим среды обитания (температура внутренней среды хозяев). Последний из факторов имеет наибольшее значение.

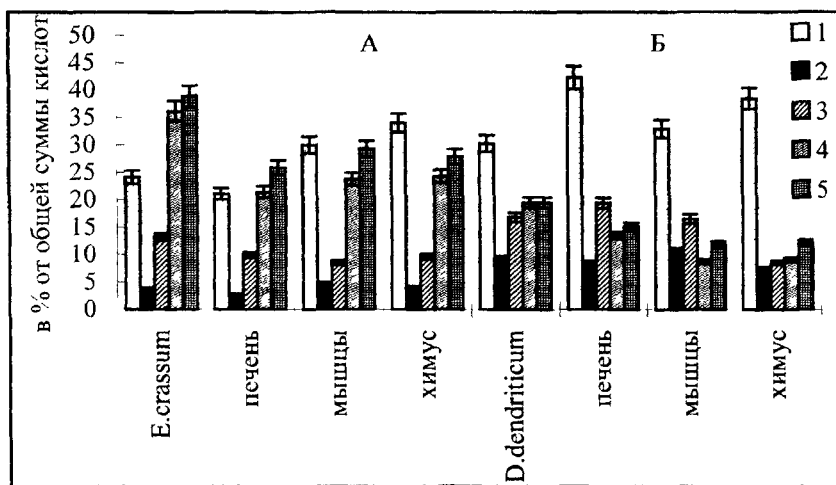


Рис. 2. Распределение жирных кислот *E. crassum*, *D. dendriticum*, печени, мышц и химуса палии (А) и клуши (Б) по степени ненасыщенности

1 – насыщенные; 2 – моноеновые; 3 – диеновые; 4 – тетраеновые; 5 – пента- и гексаеновые; 6 – ω3.

### 3.2.5. Сравнительный анализ жирнокислотного состава некоторых видов гельминтов от теплокровных и холоднокровных хозяев

Анализ ЖК спектров цестод *E. crassum* из кишечника палии (*Salvelinus lepechini*), *Triaenophorus nodulosus* из кишечника щуки (*Esox lucius*), плероцеркоида "D", являющегося личиночной стадией лентецов р. *Diphyllbothrium*, из печени колюшки трехиглой (*Gasterosteus aculeatus*), *D. dendriticum* из кишечника чаек, скребня *Metechynorhynchus salmonis* (Acanthocephala) из толстого кишечника сига (*Coregonus lavaretus*) и нематоды *Toxascaris leonina* из тонкого кишечника песчов (*Alopex lagopus*) показал, что наряду со специфическими различиями в ЖК спектрах, характерных для каждого из исследованных видов, обнаруживается зависимость относительного содержания ЖК от того, в каком хозяине паразитируют гельминты – холоднокровном или теплокровном (табл. 4).

Таблица 4

Жирно-кислотный состав гельминтов от эктотермных и эндотермных позвоночных (в % от общей суммы кислот)

Жирные кислоты	От эктотермных хозяев				От эндотермных хозяев	
	<i>E crassum</i>	<i>T nodulosus</i>	<i>M salmons</i>	Плероцеркоид	<i>D dendriticum</i>	<i>T leonina</i>
Н	24,1±1,8	24,1±1,8	19,6±1,6	44,9±2,4	30,2±2,3	26,3±1,1
М	18,5±0,6	18,5±0,6	27,2±2,2	24,7±1,3	24,4±1,4	41,8±0,7
Д	3,8±0,2	3,8±0,2	6,3±0,5	1,7±0,9	9,3±0,2	9,5±0,8
Т	13,2±0,6	13,2±0,6	13,5±1,9	5,7±0,6	16,8±0,5	7,3±0,6
П-Г	36,2±1,2	36,2±1,2	31,4±2,0	20,1±1,6	18,9±0,7	12,2±0,6
∑ ω3	38,9±1,5	38,9±1,5	37,8±3,4	22,3±1,7	19,5±0,9	15,7±1,0
∑ ω6	10,8±0,5	10,8±0,5	14,7±0,9	8,0±1,6	21,7±0,4	14,8±1,3
∑ω3/∑ω6	3,6	2,8	2,6	2,8	0,9	1,1
К	2,4	2,2	2,7	0,7	1,0	1,2

Н – Насыщенные, М – Моноеновые, Д – диеновые, Т – тетраеновые, П-Г пента- и гексаеновые, К – коэффициент ненасыщенности (Cossins, Prosser, 1978).

Для паразитов эктотермных позвоночных (рыб) был характерен более высокий уровень ненасыщенности липидов (К) по сравнению с гельминтами птицы и млекопитающего, который связан с количественным распределением насыщенных, диеновых, пента- и гексаеновых и ω3 кислот. Соотношение между кислотами семейств линоленовой (18:3ω3) и линолевой (18:2ω6) кислот у всех исследованных гельминтов подчинялось закономерности (Акулин и др., 1975), выражающейся в том, что в липидах эктотермных животных, обитающих в более холодных условиях, превалируют кислоты ω3 ряда. При анализе ЖК спектров гельминтов обнаружено нарушение аксиомы соответствия количественных соотношений ЖК температуре, которое выразилось в более высоком уровне полиненасыщенных ЖК у цестоды *D. dendriticum* по сравнению с *T. leonina*, хотя оба гельминта обитают в одинаковых термических условиях. А плероцеркоид "D", преимагинальная стадия дифиллоботриид по количественным соотношениям ЖК занимает промежуточное положение – по одним кислотам сходен с гельминтами рыб, что вполне закономерно для паразита, обитающего в среде с достаточно низкими температурами, а по другим – с гельминтами теплокровных позвоночных.

Выявленные особенности, на наш взгляд, связаны с феноменом "преадаптации" липидного метаболизма гельминта к быстрому изменению термического режима среды, как необходимому компоненту жизненного цикла паразитов, звеньями которого являются холоднокровные (эктотермные) и теплокровные (эндотермные) организмы.

### 3.2.6. Влияние температурного шока на липиды и жирные кислоты плероцеркоидов некоторых видов цестод

Исследовали влияние температурного шока (40°) на состав липидов и ЖК спектры мембранных и запасных липидов у плероцеркоидов трех видов псевдофиллидных цестод, относящихся к семействам *Ligulidae* и

*Diphyllobothriidae*: *Ligula intestinalis* из полости тела плотвы (*Rutilus rutilus*), *Schistocephalus solidus* и *Diphyllobothrium vogeli* (плероцеркоид "D") из колюшки трехиглой (*Gasterosteus aculeatus*), выловленных в озерах Карелии весной, когда температура воды не превышала +12° С.

Обнаружено, что воздействие термошока на плероцеркоидов исследованных гельминтов приводило к определенным альтерациям липидного состава, выразившимся в увеличении доли ТАГ и снижении содержания холестерина не только относительно других липидных фракций, но и в абсолютных значениях (в пересчете на сухой вес). Повышение уровня запасных липидов можно рассматривать как снижение скорости их метаболизма, показанное и для теплокровных животных при кратковременном действии высокой температуры и тепловой акклимации (Гурин, 1986).

При термошоке происходила перестройка ЖК состава в мембранных липидах. У паразитов повысилась общая насыщенность фосфолипидов, обусловленная ростом в их составе доли насыщенных кислот. У обоих видов ремнецов синхронно увеличивалось содержание пальмитиновой, стеариновой, олеиновой при снижении концентрации эйкозапентаеновой (20:5) и докозагексаеновой (22:6) кислот. У *D. vogeli* существенное изменение уровня отмечено только для двух кислот - 18:0 и эйкозатриеновой (20:3 $\omega$ 6).

Изменения в ЖК спектрах запасных липидов, происходившие под действием теплового шока, несколько отличалось от такового в фосфолипидах. В ТАГ плероцеркоидов всех исследованных цестод снижалась концентрация 18:0 кислоты при увеличении уровня линолевой (18:2 $\omega$ 6) и 22:6 кислот. Перераспределение доли остальных кислот или их групп носило отпечаток систематической принадлежности, т.е. было однонаправленным у *L. intestinalis* и *S. solidus* и отличалось от такового *D. vogeli*. Однако количественные вариации состава ЖК под воздействием термошока у плероцеркоидов при некоторых отличиях, связанных с биологией исследованных видов гельминтов, были однонаправленными и несущественными, что, вероятно, связано с преадаптацией их жирнокислотных спектров к высокой температуре окончательного хозяина.

### 3.3.3. Жирнокислотный состав мембран первичных лизосом *E. crassum* и *D. dendriticum*

ЖК составы мембран лизосом и общих липидов *E. crassum* количественно очень сходны, в то время как спектры ЖК мембран и общих липидов *D. dendriticum* имеют существенные различия. В липидах лизосом лентецов по сравнению с общими липидами обнаружено на 5,4% больше насыщенных кислот и в 1,5 раза моноеновых. Общая доля насыщенных и моноеновых кислот в мембранах лизосом составляла 71,1%, в то время как в суммарных липидах не превышала 55%. Кроме того, в тотальных липидах *D. dendriticum* выявлено в 1,4 – 2,2 раза больше диеновых, тетраеновых, пента- и гексаеновых кислот, чем в лизосомальных. Расчет  $K_{\text{ненасыщенности}}$  показал, что общие липиды в 2 раза более ненасыщенны, чем таковые в мембранах лизосом.

Обнаруженный феномен можно объяснить тем, что в процессе эволюции у цестод, цикл которых связан с последовательной сменой сред первого (хозяин) и второго (условия, окружающие свободноживущие стадии) порядков,

резко различающихся по температуре, возникли механизмы преадаптации тех стадий паразитов, которые переходят из среды с низкой температурой в среду с высокой и наоборот, причем смена термических условий происходит скачком, например, плероцеркоид – имаго, имаго – яйцо. Лентецы, следуя принципу *r*-стратегии, в колоссальных количествах воспроизводят яйца, жирнокислотные спектры которых преадаптированы к будущей более низкой температуре, чем таковая тела теплокровных позвоночных, поэтому относительное содержание ненасыщенных ЖК в общих липидах имагинальных стадий дифиллоботриумов превышает уровень, необходимый для нормальной жизнедеятельности в теплокровных хозяевах. Вот почему общие липиды всех исследованных к настоящему времени цестод от теплокровных хозяев более ненасыщенны, чем этого стоило ожидать, исходя из факта, что температура среды, окружающей имагинальные стадии этих паразитов, выше 35°C.

#### **3.4. Белковый комплекс гельминтов от холоднокровных и теплокровных позвоночных и тканей их хозяев**

Сравнительным анализом методом гель-хроматографии в составе цитоплазматических белков гельминтов *E. crassum* (от холоднокровного позвоночного) и *D. dendriticum* (от теплокровного позвоночного) выявлены специфичные для этих гельминтов фракции с М.м. 25,1 кДа – у зуботриумов, 19,5 и 13,7 кДа – у дифиллоботриумов. Белковые спектры исследованных видов цестод различались и по относительному содержанию белков. На долю фракций с молекулярными массами от 70 кДа и выше у *E. crassum* приходилось до 75% белков, а у *D. dendriticum* только 57%. Суммарная доля белков с М.м. ниже 70 кДа у паразита птиц в 1,7 раза превышала уровень таковых у паразита рыб.

Изучение фракционного белкового состава методом диск-электрофореза показало, что *E. crassum* и *D. dendriticum* отличались по числу быстро мигрирующих белковых зон ( $R_f$  – 0,5 и выше). У *E. crassum* (хозяин – палия, 10-15°) выявлено 6 фракций, а у *D. dendriticum* (хозяин – чайка, 40°) таких компонентов обнаружено 14.

В спектре мембранных белков первичных лизосом *E. crassum* и *D. dendriticum* 18 белковых зон имели сходные молекулярные массы. Пять белковых фракций были характерны либо для *E. crassum*, либо для *D. dendriticum*, что может быть связано с таксономической спецификой. У *D. dendriticum* самые подвижные фракции имели более низкие молекулярные массы по сравнению с *E. crassum* (9,6 и 12 кДа против 14 и 18 кДа). Кроме этого, у лентецов отмечено увеличение числа белковых компонентов альбуминовой группы (70 кДа и ниже) по сравнению с зуботриидами – альбуминглобулиновый коэффициент составил 0,92 и 0,64, соответственно.

Анализ белковых спектров гельминтов цестод, печени и мышц хозяев методами гель-хроматографии и диск-электрофореза показал, что цитоплазматические белки гельминтов проявляли большее сходство с белками печени хозяев, чем мышц. При этом для белковых спектров *E. crassum* характерен более высокий уровень сходства с таковыми тканей палии, чем у *D. dendriticum* и чайки, что может свидетельствовать о существенном

эволюционном возрасте системы "зуботриум-палия". Зуботрииды являются одними из наиболее древних представителей отряда *Pseudophyllidea* и в своей эволюции сопряжены с предками первых костистых рыб (Протасова, 1977), поэтому за столь длительный период становления этой системы белковый состав паразита и хозяина в значительной степени сблизился Система "лентец-чайка" эволюционно является более молодой, и возможно поэтому адаптация лентецов к своему хозяину менее глубока.

Таблица 5

**Фракционный состав белковых экстрактов эктогермной (гельминт-рыба) и эндотермной (гельминт-птица) систем "паразит-хозяин"**

Номера фракций	Эктогермная		Эндотермная	
	Гельминт	Рыба	Гельминт	Птица
I	+	+	+	+
II	+	-	+	+
III	+	-	+	+
IV	+	+	+	+
V	+	+	+	+
VI	+	+	-	+
VII	-	-	+	+
VIII	-	-	+	+

В белковых экстрактах эндотермной системы "лентец-чайка" найдены две низкомолекулярные фракции 19,5 и 13,7 кДа, которые отсутствовали в белковых экстрактах эктогермной системы "зуботриум-палия" (табл. 5). Та же тенденция обнаруживается и по содержанию белков с молекулярными массами 70 кДа и ниже. Их количество у сочленов теплокровной системы "паразит-хозяин" было выше, чем в холоднокровной системе. Весьма показательным в этом плане является альбумин-глобулиновый коэффициент (отношение количества белков с молекулярными массами 70 кДа и ниже к уровню белков с молекулярными массами свыше 70 кДа). У *E. crassum* и в печени палии он был равен 0,81 и 0,87 соответственно, а у *D. dendriticum* и в печени клуши – 1,02 и 1,29.

Существует феномен увеличения доли низкомолекулярных белков в общем белковом пуле по мере эволюционного усложнения организмов, установленный А.В. Благовещенским (1966) и подтвержденный другими авторами (Шульман, Куликова, 1966; Груздев и др., 1972; Смирнов, 1977). Если этот феномен можно считать справедливым в отношении разницы в эволюционном положении рыбы и птицы, то факт более высокого содержания низкомолекулярных белков в гелях лентецов по сравнению с зуботриумами нельзя относить к различиям в эволюционном положении этих цестод, считая дифиллоботриумов более прогрессивными, так как они входят в состав одного отряда. Нельзя также ставить на одну ступень эволюционной лестницы гельминта и рыбу или гельминта и птицу по признаку сходства альбумин-глобулиновых коэффициентов белковых экстрактов из гельминта и печени хозяина.

Представляется вероятным, что наличие в теплокровной системе "паразит-хозяин" двух низкомолекулярных фракций, отсутствовавших в холоднокровной системе, и увеличение доли белков с молекулярными массами 70 кДа и ниже

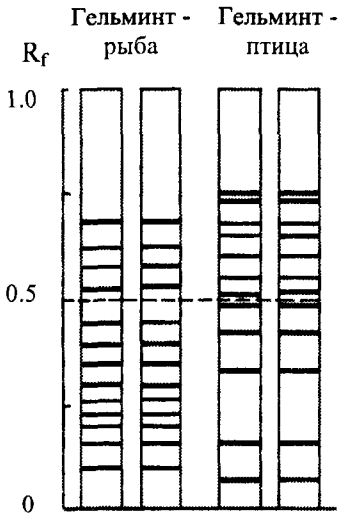


Рис. 3. Распределение белков с одинаковой электрофоретической подвижностью в эктотермной и эндотермной системах "паразит-хозяин".  $R_f$  – подвижность относительно подвижной границы Кольерауша.

се гельминта связано с функционированием клеток этих животных в условиях постоянно высокой температуры ( $40^{\circ}\text{C}$ ), резко отличающихся от условий существования рыбы и ее паразита ( $< 15^{\circ}\text{C}$ ).

Эти предположения базируются на гипотезе об адаптивном значении соответствия уровня конформационной гибкости белковых молекул температурным условиям жизни вида (Александров, 1975, 1985). В процессе адаптации видов к различным температурным режимам существования поддерживается соответствие между термическим режимом среды и уровнем термостабильности белков у особей в активный период жизни. Это соответствие, по-видимому, сопряжено с теми свойствами белковых макромолекул, которые необходимы для их нормального функционирования при температуре, оптимальной для данного вида, и поэтому эти свойства находятся под постоянным контролем естественного отбора.

## Глава 4. Влияние некоторых факторов среды на липиды и белки рыб

### 4.1. Жирнокислотный состав икры некоторых рыб, размножающихся при разных температурах

Эффективность процессов жизнедеятельности каждого вида рыб определяется термическим диапазоном, простирающимся от нижних до верхних летальных лимитов (Голованов и др., 1997). В цепи осуществления эколого-физиологических функций критическим моментом является размножение, поскольку из всех физиологических процессов оно имеет наименьший полигон толерантности, то

может быть связано не только с адаптацией гельминтов к хозяевам по принципу молекулярной мимикрии, но и с большими различиями в температурах внутренних сред хозяев (палия –  $10-15^{\circ}$ , клуша –  $40^{\circ}\text{C}$ ).

Сравнительный анализ белкового состава эктотермной (*E. crassum*-палия) и эндотермной (*D. dendriticum*-клуша) систем "паразит-хозяин" по электрофоретической подвижности белковых фракций показал, что в экстрактах из лентцев и печени чайки содержалось больше компонентов с относительной подвижностью ( $R_f$ ), превышавшей 0,5 (у *E. crassum* и в печени палии – 6 и 8, у *D. dendriticum* и клуши – 14 и 11). Отмеченное явление наблюдалось и при сравнении белковых зон с одинаковой электрофоретической подвижностью в системах "паразит-хозяин" (рис. 3). В теплокровной системе выявлено 8 общих компонентов, в холоднокровной – только 4.

Исходя из полученных результатов мы можем предположить, что увеличение числа белковых зон с высокой электрофоретической подвижностью в белковых спектрах птицы и

есть успешно протекает только в условиях незначительных колебаний температуры (Elliot, 1981; Бигон и др., 1989).

Обнаружено (табл 6), что количественно набор ЖК в липидах икры плотвы, нерестящейся при +7-8°C, отличался от такового икры карпа (нерестовая температура – +16-22°C) несколько менее высокой (на 2-5%), суммарной концентрацией насыщенных ЖК, как и следовало ожидать, исходя из аксиомы о соответствии ЖК спектров организма температурным условиям существования его клеток (Проссер, 1964; Hazel, 1973). Однако эта разница статистически недостоверна ( $p < 0,05$ ). По всей вероятности, для осуществления нормального функционирования мембранных структур икры в диапазоне температур 5-30° необходимо, чтобы сумма насыщенных ЖК была в интервале от 28 до 35%. Ненасыщенность липидов в икре плотвы поддерживается за счет более высокой концентрации таких полиненасыщенных кислот, как арахидоновая (20:4 $\omega$ 6), эйкозапентаеновая (20:5) и докозагексаеновая (22:6), уровень которых был в 1,4 – 4 раза выше, чем в икре карпа. В свою очередь ненасыщенность липидов икры карпа определяется более высоким уровнем менее ненасыщенных - эйкозодиеновой (20:2) и эйкозатриеновой (20:3) кислот. В икре плотвы доля кислот линоленового ряда ( $\omega$ 3) была в 1,4 – 1,7 раза выше чем в таковой карпа. Рост концентрации  $\omega$ 3 кислот в условиях обитания при более низких температурах показан на икре других видов рыб и краях некоторых экотермных беспозвоночных (Акулин и др., 1975; Сидоров, 1983; Болгова и др., 1985).

Таблица 6

**Жирнокислотный состав липидов икры плотвы из Каскесозера (Карелия) и карпа (п. Рыбное, ВНИИПРХ, Московская обл.) (M $\pm$ m, n=6)**

Жирные кислоты	Плотва, IV-V стадия зрелости (начало мая, +4°C)	Плотва, VI стадия зрелости (июнь, +7°C)	Карп, IV-V стадия зрелости (апрель)	Карп, VI стадия зрелости (май)
14 0	0,8 $\pm$ 0,08	0,8 $\pm$ 0,09	7,3 $\pm$ 0,5	10,9 $\pm$ 0,9
16 0	21,0 $\pm$ 1,7	21,9 $\pm$ 1,6	18,1 $\pm$ 1,6	18,9 $\pm$ 1,5
16 1	4,9 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,3
18 0	7,8 $\pm$ 0,5	7,1 $\pm$ 0,6	6,0 $\pm$ 0,4	4,8 $\pm$ 0,3
18 1	15,3 $\pm$ 0,9	15,5 $\pm$ 1,0	16,5 $\pm$ 1,3	15,1 $\pm$ 1,2
18 2 $\omega$ 6	6,9 $\pm$ 0,5	5,5 $\pm$ 0,5	5,8 $\pm$ 0,5	3,1 $\pm$ 0,2
18 3 $\omega$ 3	1,5 $\pm$ 0,09	1,5 $\pm$ 0,08	1,0 $\pm$ 0,09	1,5 $\pm$ 0,1
20 2 $\omega$ 6	1,2 $\pm$ 0,08	1,1 $\pm$ 0,08	3,0 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,3
20 3 $\omega$ 6	1,6 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,09	12,0 $\pm$ 0,9	5,8 $\pm$ 0,3
20 4 $\omega$ 6	10,6 $\pm$ 0,8	9,8 $\pm$ 0,7	2,6 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 0,3
20 5 $\omega$ 3	6,6 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,3	3,3 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,4
22 5 $\omega$ 3	1,7 $\pm$ 0,08	1,1 $\pm$ 0,06	2,2 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,2
22 6 $\omega$ 3	16,4 $\pm$ 1,1	18,1 $\pm$ 1,2	10,8 $\pm$ 0,9	10,8 $\pm$ 0,8
$\Sigma$ пента- и гексаеновых	24,7	26,4	15,6	17,1

У обоих видов рыб переход от преднерестовой стадии зрелости икры к нерестовой сопровождался однонаправленными изменениями в жирнокислотном составе липидов, связанными с увеличением содержания пента- и гексаеновых кислот (у плотвы – 20:5 и 22:6 кислот, а у карпа менее существенный – 20:5 и 22:5 кислот) на фоне роста температуры окружающей среды (парадокс Коссинса) (Cossins, 1977). Этот парадокс можно объяснить с



позиций учета разной степени зависимости геометрических размеров углеводородного радикала жирной кислоты от температуры. Математическое компьютерное моделирование показало, что коэффициент линейного расширения докозагексаеновой кислоты практически нулевой (почти в 100 раз меньше, чем у линолевой и насыщенных кислот) (Рипатти и др., 1985). Следовательно, длинноцепочечные полиненасыщенные кислоты (в особенности с 22 углеродными атомами) играют существенную роль в температурной стабилизации липидной матрицы мембран и выступают в роли "биохимического демпфера", препятствующего возникновению нарушений в их функционировании, что очень важно для эктотермного организма, размножающегося в весьма нестабильных температурных условиях. Поэтому рост уровня длинноцепочечных полиеновых кислот в липидах икры по мере ее созревания имеет адаптивную природу, как способ нивелировки негативного влияния скачков температуры, то есть расширяет диапазон термотолерантности половых продуктов, что в конечном итоге повышает шансы у зародышей успешно пройти стадию эмбриогенеза.

Существует еще один аспект адаптивных изменений жирнокислотного состава липидов икры, который заключается в том, что в условиях одинаковых температур липиды генеративных тканей могут заметно отличаться от таковых соматических тканей по содержанию пента- и гексаеновых кислот. Пример несоответствия количественных соотношений жирных кислот в липидах температуры окружающей среды выявлен при сравнительном анализе ЖК составов соматических и генеративных тканей карпа (рис. 4).

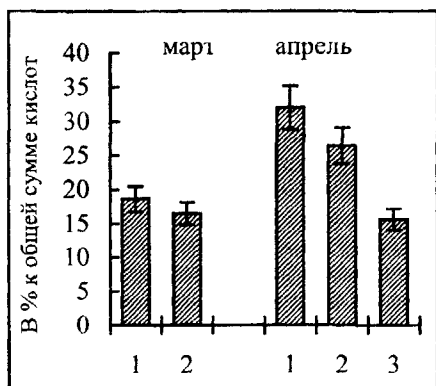


Рис. 4. Уровень пента- и гексаеновых кислот в гепатопанкреасе (1), мышцах (2) и икре (3) карпа.

Кarp – теплолюбивая рыба, которая, не размножается, если температура воды в нерестовый период ниже 17°C. На широте Москвы в прудах рыбоводных хозяйств такие условия обычно бывают не раньше конца мая – начала июня. В марте, когда температура воды в прудах держится в пределах 3-5°, уровень пента- и гексаеновых кислот в липидах соматических тканей не превышает 16-18%. Физиологическим следствием падения доли этих кислот до необычно, на первый взгляд, низких значений, носящих очевидный адаптивный характер, является малоподвижность и пребывание в состоянии полуанабиоза, которое достаточно четко определяется по уровню дыхания и частоте сердечных сокращений (Дьяконов, Бабасв, 1985).

В апреле зимовальный период заканчивается. Температура воды приближается к 10°. Карп начинает активно двигаться, питаться и готовится к нересту. Степень зрелости половых продуктов достигает V стадии. Относительная концентрация

пента- и гексаеновых кислот в липидах мышц и гепатопанкреаса увеличивается в 1,6-1,7 раза, достигая 26-32% от общей суммы кислот. В то же время доля пента- и гексаеновых кислот в липидах икры не превышает 15%, что явно не отвечает термическому режиму, в котором карп пребывает в апреле, а больше соответствует температуре размножения. Данные, приведенные выше в табл. 7, показывают, что в нерестовой икре (VI стадия) не происходит заметных изменений в количественных соотношениях жирных кислот по сравнению с предыдущей стадией, в частности, доля пента- и гексаеновых кислот увеличивается всего на 1,5%. Исходя из полученных результатов можно предположить, что в Подмоскowie карп уже в апреле готов к нересту, но температура окружающей среды тормозит этот процесс до тех пор пока не поднимется до нижней границы термотолерантности размножения.

Произведенные нами расчеты по данным, полученным в лаборатории экологической биохимии (Болгова, 1978; Болгова и др., 1981; Сидоров, 1986) на лососе из рек бассейна Онежского озера, показали наличие определенных отличий по уровню пента- и гексаеновых кислот между гонадами с одной стороны и печенью и мускулатурой – с другой. Уровень этих кислот в образцах икры, взятых в августе ( $t = 15-20^{\circ}\text{C}$ ), в 1,6 раза превышал таковые печени и мышц. Кроме того, их доля в общей сумме кислот  $\omega 3$  семейства в икре достигала 90%, в то время как в мышцах и печени была на уровне 64 и 81%. Из этого факта следует, что если в печени и мышцах наблюдается акклиматизация мембранных структур клеток к температуре воды через изменение количественных соотношений пента- и гексаеновых кислот в липидах, то созревающая икра толерантна к температуре. В ней идет процесс накопления этих кислот в соотношениях, которые необходимы для последующей реализации программы эмбрионального развития, протекающего в узком диапазоне термических условий, специфичном для лосося ( $4-6^{\circ}$ ). Таким образом, в процессе развития икры у рыб количественный состав жирнокислотных радикалов липидов формируется в соотношениях, которые соответствуют диапазону термотолерантности размножения, и в определенной степени независим от реальных температурных условий, существующих на момент развития. Это свидетельствует в пользу существования у рыб феномена преадаптации половых продуктов на уровне липидного метаболизма к температуре размножения, специфичной для того или иного вида.

### **4.3. Влияние биотических факторов на липидный и жирнокислотный состав различных тканей карпа**

#### **4.3.1. Влияние микроорганизмов на фосфолипиды крови годовиков карпа**

Ответные реакции организмов на атаку микроорганизмами осуществляются через изменение разных сторон метаболизма, в том числе, путем количественных вариаций в липидах. В аквариальных условиях у годовиков карпа реакция на культуру аэромонад, внесенных в воду в конечной концентрации 146 млн/л, на уровне фосфолипидов цельной крови начиналась через 4 часа и выражалась в снижении их доли ниже значений, установленных для контрольной группы карпов. Более низкий уровень сохранялся до 3-х суток, затем начинался рост содержания фосфолипидов.

Эти изменения связаны с вариацией количества элементов белой крови -- лейкоцитов и лимфоцитов.

Состав ЖК фосфолипидов цельной крови первые 24 часа после контакта рыб с микроорганизмами существенно не менялся. Затем концентрация полиненасыщенных кислот стала возрастать и достигла максимума к 36 часам (рис. 5). В этой группе кислот максимальный рост отмечен для арахидоновой и докозагексаеновой, соответственно в 2,7 и 63 раза относительно контрольных значений. Доля насыщенных кислот, в основном пальмитиновой(16:0) и стеариновой (18:0), варьировала фактически в противофазе динамики изменений полиеновых кислот.

В фосфолипидах гепатопанкреаса карпа уже через 12 часов после контакта с аэромонадами увеличивалась концентрация полиеновых кислот (табл. 7). Синтез фосфолипидов у позвоночных осуществляется в основном в печени и существует их обмен между печенью и кровью, поэтому рост уровня полиеновых кислот в печени начинается после получения соответствующего сигнала и сопровождается их выбросом в кровь с последующим включением в мембраны форменных элементов. Этот процесс в значительной степени синхронизирован, поэтому изменения ЖК соотношений в липидах лимфоцитов, происходившие через 24-32 часа после контакта с микроорганизмами, были сходны с таковыми в цельной крови и печени, количественно совпадая по кислотам, сгруппированным по степени ненасыщенности. Полученные результаты свидетельствуют об адаптивной реакции всего организма на воздействие биотического фактора

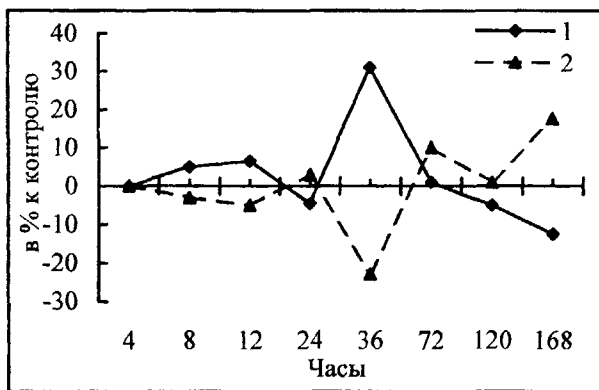


Рис. 5 Динамика жирнокислотного состава фосфолипидов крови карпа при воздействии аэромонад

1 – полиненасыщенные кислоты, 2 – насыщенные  
По оси ординат – отклонение от контрольных значений ( $\pm\Delta\%$ )

Таблица 7

**Жирнокислотный состав фосфолипидов лимфоцитов, крови и гепатопанкреаса карпов, контактировавших с аэромонадами (% от суммы кислот)**

Жирные кислоты	Лимфоциты		Кровь		Печень	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Насыщенные	42,5	29,0	34,1	26,9	36,1	29,0
Моноеновые	16,2	12,3	24,0	17,3	28,6	20,4
Полиеновые	41,3	58,7	41,9	55,8	36,3	50,6

**4.3.2. Влияние аэромонад на разных по физиологическому состоянию карпов**

В искусственно воспроизводимых микропопуляциях карпа после окончания периода зимовки появляются особи с физиологической разнокачественностью. Отличия между "сильными" и "слабыми" рыбами обнаруживаются не только на уровне тканевых липидов (Богдан, 1986), но и по липидам и ЖК форменных элементов белой крови.

Клетки белой крови "сильных" и "слабых" особей на уровне липидов и жирных кислот по разному реагируют на воздействие микроорганизмов. Проведенные исследования показали, что степень активации лимфоцитов у разных по физиологическому состоянию рыб в ответ на микробиологический прессинг связана с изменениями в уровне липидов и соотношениях жирнокислотных радикалов в мембранных липидах. Под влиянием аэромонад у "сильных" рыб значительно увеличивается доля суммарной фракции липидов и относительное содержание полиеновых жирных кислот в фосфолипидах за счет арахидоновой и докозагексаеновой кислот, в то время как у "слабых" эти альтерации количественно менее выражены.

**4.3.3. Влияние микроорганизмов на мембранные липиды питающихся и голодающих годовиков карпа**

Были проведено исследование изменений фосфолипидного и ЖК статуса в гепатопанкреасе и крови у голодающих и питающихся годовиков карпа при внутримышечной инъекции диспергированной в мясоептонном бульоне культуры высокопатогенного штамма 77-18 *A. sobria*.

Выявленный в этой серии экспериментов вектор количественной варибельности состава жирных кислот у голодающих карпов был аналогичен таковому "сильных" годовиков карпа, в то время как у питающихся рыб она была аналогична "слабым" рыбам, что может свидетельствовать о более высоких адаптивных возможностях у рыб, находящихся в состоянии физиологического голодания.

Из вышеизложенного следует, что уровень полиненасыщенных ЖК в мембранных липидах в известной мере является индикатором состояния адаптивных возможностей рыб. При снижении доли полиеновых кислот в липидах происходит, по-видимому, ослабление защитных функций организма, а при ее повышении – усиление. Оптимизация структурной организации в первую очередь таких систем, как печень и кровь, определяет устойчивость рыб к неблагоприятному воздействию различных факторов среды, в том числе и к факторам биогенного происхождения.

#### 4.3.4. Влияние разных видов микроорганизмов на липидный и жирнокислотный состав крови карпа

Исследование липидного состава крови карпов, подвергнутых в экспериментальных условиях интенсивному воздействию микроорганизмов (внутримышечной инъекции бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*) показало, что несмотря на сходный вектор динамики количественных изменений в составе липидов крови при разных типах микробиологического воздействия, можно отметить ее специфику заключавшуюся, во-первых, в более позднем развитии ответной реакции рыб при контакте с псевдомонадами и, во-вторых, в типе изменяющейся компоненты суммарных липидов (мембранные или запасные). Тот факт, что у карпов, контактировавших с аэромонадами, был достаточно ровный отрицательный относительно контроля уровень мембранных липидов на протяжении всего эксперимента может свидетельствовать в пользу большей патогенности этого фактора по сравнению с псевдомонадами.

Сравнительное изучение динамики липидного состава крови карпов в начальный период их взаимодействия с аэромонадами разной патогенности (7 - 36 часов) показало, что ответная реакция рыб на контакт с микроорганизмами (в случае воздействия высоковирулентного штамма 77-18 *A. sobria*) наблюдалась уже через 7 часов и выражалась в снижении уровня липидов (в пересчете на сухой вес) на 80 - 160% от уровня контрольных значений. Ответная реакция на внедрение непатогенного штамма (78-16 *A. hydrophila*) проявлялась к 24 часам, и уровень липидов (особенно запасных) снижался, а к 36 часам возвращался к значениям, составляющим 60 - 90% от контрольных показателей.

При исследовании динамики ЖК состава липидов крови годовиков карпа при контакте с аэромонадами разной патогенности обнаружены количественные различия, связанные с типом воздействующего фактора. Через 7 часов после внесения в воду аэромонад отмечено некоторое повышение относительной доли полиеновых кислот на фоне уменьшения насыщенных и моноеновых, более выраженное при воздействии высоковирулентного штамма. Через 24 часа обнаружено значительное снижение концентрации полиненасыщенных кислот, но количество арахидоновой (20:4) осталось более высоким у рыб, контактировавших с непатогенным штаммом (78-16). Увеличивалась доля моноеновых, главным образом 16:1 и 20:1 кислот. При 36-часовой экспозиции уровень длинноцепочечных ненасыщенных кислот резко увеличился за счет ДГК и, в меньшей степени, АК при снижении доли моноеновых кислот. При этом патогенный штамм (77-18) вызывал повышение концентрации ДГК в 6,5 раза, а непатогенный (78-16) - в 3,5 раза, хотя суммарное содержание полиеновых кислот было выше у рыб, находившихся в контакте с непатогенным штаммом.

Результаты исследований показали, что на уровне липидов крови ответные реакции карпов на начальном этапе взаимодействия с биотическим фактором (микроорганизмами) имеют общие черты, заключающиеся в снижении концентрации как суммарных липидов, так и их составляющих - мембранных и запасных липидов, а также доли, входящих в их состав

полиненасыщенных ЖК, вне зависимости от типа (вида микроорганизма) и силы (степень патогенности) воздействующего фактора. Это свидетельствует в пользу того, что на уровне липидного метаболизма ответная реакция рыб на прессинг микробиологического биотического фактора носит неспецифический характер.

#### **4.3.5. Влияние гельминтов на липидный статус тканей рыб**

Показано, что инвазия рыб гельминтами сопровождается значительными изменениями в содержании липидов их тканей. В органах зараженных рыб уменьшается содержание общих липидов. Инвазирование плероцеркоидами *D. vogeli* печени колюшки вызывает снижение в ней уровня суммарных липидов до 25% против 31% в незараженной ткани. Аналогично этому количество общих липидов в печени налима при заражении плероцеркоидами *D. latum* уменьшается с 60 до 54%. Совместное паразитирование в печени налима личиночных форм *D. latum* и *T. nodulosus* приводит ее к особенно сильной "делипидизации" – с 60 до 31% в сухом веществе ткани. Снижение концентрации суммарных липидов в зараженных тканях рыб происходит преимущественно за счет уменьшения доли структурных липидов – фосфолипидов. Так, в печени колюшки в результате инвазии плероцеркоидами *D. vogeli*, уровень фосфолипидов снижался на 21%, у налима при заражении личинками широкого лентеца - в 1,1 раза, а при совместном паразитировании *D. latum* и *T. nodulosus* - в 2,3 раза. Аналогичным образом заражение гельминтами сказывается и на липидном составе других тканей налима. Уменьшение доли суммарных липидов в мышцах и брыжейке происходило за счет такового фосфолипидов, однако достоверная разница ( $p < 0,05$ ) показана только для мускулатуры рыб.

Таким образом, ответной реакцией рыб на воздействие таких биотических факторов, как микроорганизмы или гельминты, является снижение уровня суммарных липидов, главным образом, за счет уменьшения доли их фосфолипидной компоненты. Уменьшение концентрации фосфолипидов в тканях обнаруживается также и при длительном воздействии разнообразных абиотических факторов (Лизенко и др. 1972; Лизенко, 1973; Шульман, 1978; Яржомбек, Пинчуков, 1979; Богдан, 1986). Все эти сведения дают основание думать, что обнаруженный феномен является универсальной неспецифической ответной реакцией организма рыб на воздействие факторов окружающей среды

#### **4.4. Белки и пептиды рыб при действии различных факторов**

##### **4.4.1. Белковый состав сыворотки крови и гепатопанкреаса карпа при аэромонозе**

У двухлеток карпа исследовано изменение белкового состава сыворотки крови при бактериальном заражении штаммом 77-18 *A. sobria*. В белковом спектре методом диск-электрофореза выявлялось до 20-24 белковых полос. Они условно были разделены на 5 групп в соответствии с общепринятой классификацией (Маурер, 1971). У инфицированных карпов, как и у контрольных, не выявлено качественных различий в белковых составах в течение всего периода наблюдений. При развитии инфекции наблюдались

количественные изменения. Концентрация альбуминов оставалась без изменений первые 24 часа, затем снизилась почти в 2 раза (табл. 8), что, вероятно, связано с интоксикацией гепатопанкреаса карпа, в котором синтезируются альбумины, продуктами жизнедеятельности аэромонад. В зоне трансферринов (фракция 2) уровень белка снизился на 40% уже через 24 часа после инъекции аэромонад. В зоне  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинов отмечено увеличение концентрации белков до 4-кратного.

Таблица 8

**Динамика относительного содержания белка во фракциях сыворотки крови карпа, зараженных аэромонадами ( $M \pm m$ ,  $n = 16$ )**

Номер фракции	Время с момента заражения, час		
	0	24	48
1	6,3 $\pm$ 2,2	6,4 $\pm$ 0,4	2,9 $\pm$ 0,2
2	59,9 $\pm$ 4,6	41,9 $\pm$ 4,5	43,8 $\pm$ 2,9
3	14,4 $\pm$ 0,6	20,7 $\pm$ 2,5	24,3 $\pm$ 2,3
4	3,5 $\pm$ 0,2	14,4 $\pm$ 0,7	13,6 $\pm$ 1,8
5	14,8 $\pm$ 1,0	14,9 $\pm$ 0,9	15,9 $\pm$ 0,8

В гепатопанкреасе в зоне быстро мигрирующих зон во всех исследованных образцах выявлялось 3 фракции с подвижностью, соответствующей альбуминам в сыворотке крови, что было подтверждено электрофорезом соответствующего метчика. Концентрация белка в этих зонах первоначально (контроль) составила 4,5 $\pm$ 0,7% ( $n=16$ ), а через 48 часов после заражения снизилась до 2,9 $\pm$ 0,3%. Этот факт свидетельствует об угнетающем действии продуктов жизнедеятельности микроорганизмов на белковый метаболизм в гепатопанкреасе карпа. В начальный момент взаимодействия аэромонад с карпами концентрация белков с подвижностью  $\gamma$ -глобулинов была незначительной (не превышала 2%), а через 48 часов резко возросла и ее уровень приблизился к 10% от общего количества белка в экстракте. Подвижность этих белков совпадала с таковой белков фракции 4 в сыворотке крови. Также совпадала и динамика их относительного содержания. Очевидно, белки этой фракции, синтезированные в гепатопанкреасе, участвуют в организации пула  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинов в сыворотке крови. Вероятно, гепатопанкреас карпа участвует в развитии ответной реакции организма на воздействие биотического фактора, каковым являются для карпа патогенные аэромонады.

#### 4.4.2. Белковый состав гепатопанкреаса карпа при ихтиофтириозе

Пресноводные рыбы являются для паразитической равновесничной инфузории *Ichthyophthirius multifiliis* средой обитания. В аквакультуре часто создаются условия для ее активного размножения.

Был проведен сравнительный анализ методом диск-электрофореза белкового состава гепатопанкреаса контрольных и контактировавших с ихтиофтириусом в течение недели годовиков карпа (количество трофонтов – 700-1000 на рыбу). Качественных различий между вариантами эксперимента не обнаружено. Выявлена количественная разница по некоторым фракциям. Так, уровень гемоглобина, разделившегося в процессе электрофореза на 2 зоны, в каждой полосе у контрольных рыб был на уровне 9-10% от общего количества белка в

геле, а у зараженных особей относительное содержание гемоглобина во фракциях не превышало 6-7%. Белковая полоса, двигавшаяся сразу за гемоглобиновыми зонами, у здоровых годовиков представляла собой узкую полосу, окраска которой незначительно превышала фоновую. У пораженных инфузорией карпов эта фракция была хорошо выражена, ярко окрашена и сканировалась отдельным пиком на денситограмме. Концентрация белка в этой зоне достигала 4,5% от общего количества. Кроме этих отличий, хотелось бы обратить внимание на факт снижение уровня белков, подвижность которых соответствовала таковой альбуминов сыворотки крови. Полученные данные свидетельствуют о том, что биотические факторы среды, которыми для рыб являются микроорганизмы рода *Aeromonas* и инфузория рода *Ichthyophthirius*, вероятно, оказывают одинаковое токсическое воздействие на белковый метаболизм в гепатопанкреасе карпа, выразившиеся в изменении отмеченных выше фракций.

#### 4.4.3. Влияние зимовки и активного плавания на количественное распределение водорастворимых белков мускулатуры карпа

Условия аквакультуры являются для рыб неблагоприятным фактором окружающей среды антропогенного происхождения, так как в технологическом процессе рыборазведения существует немало негативных моментов, которые чаще проявляются в критические периоды жизненного цикла, например, при голодании в зимний период. Это обстоятельство наиболее актуально для южных видов, в том числе для карпа, которые введены в аквакультуру в средних широтах и севернее. Проведено исследование влияния зимовки и продолжительного вынужденного активного плавания на количественное распределение водорастворимых белков (миогенов) мускулатуры годовиков карпа.

Сравнительный анализ этих фракций выявил количественные изменения в относительном содержании белка, которые носили выраженный сезонный характер (табл. 9). В начальный период зимовки не выявлено каких-либо заметных отличий по относительному содержанию белка во фракциях миогенов между отдельными особями. В январе проявилась некоторая разница в уровне белка во фракции 4 у "сильных" и "слабых". Различия между "сильными" и "слабыми" годовиками по концентрации белка во фракции 4 сохраняются с момента обнаружения в январе и до окончания зимовки в мае.

Таблица 9

**Изменение концентрации главных фракций миогенов сеголеток карпа в процессе зимовки (в % от общей суммы белков на электрофореграмме)**

Номера фракций	Декабрь	Январь		Март		Апрель		Май
		1	2	1	2	1	2	
1	1,2	0,5	0,4	1,1	1,2	0,9	0,7	0,3
2	2,7	2,3	2,5	2,2	1,5	1,8	1,9	1,0
3	12,5	14,0	12,3	13,1	13,2	12,1	12,3	13,6
4	3,9	3,9	5,6	4,4	5,3	3,0	4,2	4,0
5	9,3	9,8	10,1	10,5	9,9	9,0	9,2	10,5
6	19,4	16,0	14,7	16,1	16,5	16,5	17,7	17,9

1 - "сильные", 2 - "слабые" Ошибка среднего (m) не превышала ±10%



Изучение количественного состава миогенов годовиков карпа контрольной группы (спонтанное плавание) и находившихся в состоянии вынужденного активного плавания в потоке – показало, что тенденция увеличения уровня белков во фракции 4 у "активно плававших" рыб, сходна с вектором изменений, происходившим в комплексе миогенов в период зимовки у "слабых" карпов.

Из полученных нами результатов можно сделать вывод о том, что длительное вынужденное активное плавание, не характерное для карпа в естественных условиях, является выраженным негативным фактором, снижающим адаптивный потенциал, так как карп эволюционно не приспособлен к повышенным мышечным нагрузкам.

#### **4.4.4. Влияние техногенного загрязнения на состав водорастворимых белков мускулатуры сига**

С целью выявления изменений в белковых спектрах гканей рыб под влиянием комплекса тяжелых металлов (ТМ) было проведено изучение фракционного состава водорастворимых белков мускулатуры сегов. Исследована рыба, выловленная в водоемах с разным уровнем загрязнения ТМ на территории Мурманской области.

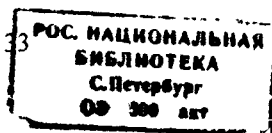
Сравнительный анализ миогенов сегов методом диск-электрофореза не показал качественных различий между вариантами эксперимента, обнаружены только количественные модификации спектра водорастворимых мышечных белков. Исследования показали, что, изменения происходящие в мускулатуре сегов в условиях хронического воздействия высоких концентраций ТМ связаны с существенным увеличением концентрации белка практически во всех фракциях экстракта миогенов, выявляемых методом диск-электрофореза.

#### **4.4.5. Влияние различных факторов среды на фракционный состав низкомолекулярных пептидов печени и мускулатуры различных видов рыб**

Как известно (Замятнин, 1992), низкомолекулярные пептиды характеризуются чрезвычайно широким функциональным разнообразием. Тканевые пептидные пулы представляют собой элемент информационной системы организма, а изменение компонентного состава пептидов может рассматриваться как информационный сигнал о биохимическом статусе той или иной ткани (Карелин, 2003), что указывает на существенную роль низкомолекулярных пептидов в адаптивных реакциях организма.

##### **4.4.5.1. Применение спектрофотометрии при 250 нм вместо метода Элмана для заключения о наличии сульфгидрильных групп в пептидах при решении задач эколого-биохимического тестирования**

Сравнительное определение количества SH-групп методом Элмана и по их оптической активности при 250 нм в тканевых пептидах окуня и плотвы продемонстрировало высокий уровень сходства динамики распределения оптической активности по фракциям пептидов, выявляемой этими методами.



#### 4.4.5.2. Качественные и количественные вариации состава низкомолекулярных пептидов мускулатуры окуня и карася при аккумуляции разных концентраций ртути

Определение фракционного состава низкомолекулярных пептидов проведено у окуней и карасей, выловленных из озер Ярославской обл. и подвергнутых в аквариальном эксперименте хроническому воздействию солей ртути в разных концентрациях. Концентрация ртути в тканях окуней и карасей в конце эксперимента составила в контроле  $0,31 \pm 0,02$  и  $0,54 \pm 0,03$  мг/кг, опыте -  $0,59 \pm 0,05$  и  $1,21 \pm 0,04$  мг/кг соответственно.

При сравнительном анализе пептидов мускулатуры окуней и карасей не выявлено видимых качественных различий в пептидном спектре. Характер изменения концентрации пептидов во фракциях в процессе эксперимента у окуней и карасей был различным (рис. 6).

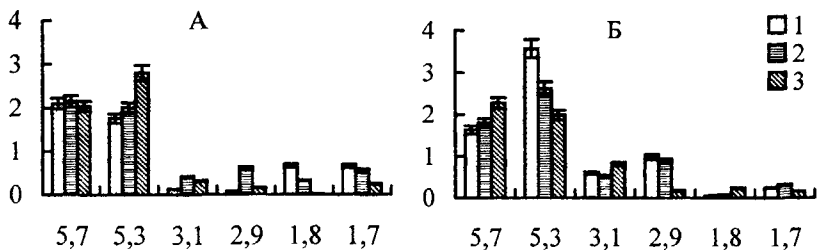


Рис. 6. Изменение уровня пептидов во фракциях экстракта мускулатуры окуней (А) и карасей (Б) при интоксикации ртутью

1 – "исходная" точка, 2 – контроль, 3 – опыт, по оси ординат – экстинкция при 207 нм, по оси абсцисс – молекулярные массы фракций, кДа

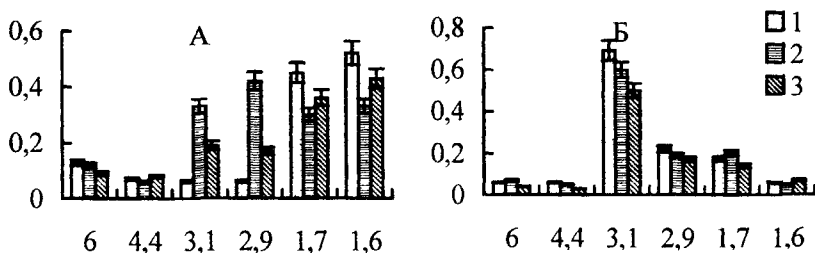


Рис. 7. Изменение уровня пептидов во фракциях экстракта мускулатуры окуней (А) и карасей (Б) при интоксикации ртутью

1 – "исходная" точка, 2 – контроль, 3 – опыт, по оси ординат – экстинкция при 250 нм, по оси абсцисс – молекулярные массы фракций, кДа

Различия между окунями и карасями найдены и в группе пептидов, оптически активных при 250 нм (рис. 7). Обнаруженные нами в ходе эксперимен-

та различия в изменении в мышцах окуней и карасей количественных показателей содержания низкомолекулярных пептидов как общей группы (207 нм), так и в группе компонентов, поглощающих при 250 нм, связаны, вероятно, с реакцией рыб на хроническую интоксикацию ртутью и свидетельствуют в пользу существования отличий, которые связаны с видовой спецификой и особенностями экологии этих видов.

#### **4.4.6. Влияние факторов окружающей среды на состав низкомолекулярных пептидов мускулатуры окуней из естественных условий**

Сравнительный анализ количественных вариаций фракций пептидов в мускулатуре окуней, отловленных в светловодных олиготрофных озерах Чучьярви (Карелия), Мотыкино (Дарвиновский заповедник) и темноводных мезотрофных озерах Вуонтеленьярви (Карелия), Дубровское и Змеиное (Дарвиновский заповедник) показал, что исследованные окуни имели как географические и половые особенности в реакции пептидного пула мускулатуры на процесс эвтрофикации, так и общие тенденции (рис. 9). Географические различия проявились во фракциях с Мм 6,0; 5,3 и 1,7 кДа. Тенденция в изменении концентрации пептидов у рыб из эвтрофицированных водоемов Дарвиновского заповедника в этих фракциях была противоположной таковой показателей рыб из аналогичных водоемов Карелии. Региональное сходство и одновременно половые различия выявлены во фракциях с Мм 1,8 и 1,6 кДа. В первом случае одинаковая реакция была характерна для самцов из карельских озер и озер Дарвиновского заповедника, а во втором – для самок. Во фракциях с Мм 5,7 и 4,8 кДа в мускулатуре рыб из светлых или темных озер вне зависимости от региона вылова выявлена однонаправленность в изменении концентрации пептидов.

На наш взгляд, эти данные свидетельствуют о том, что изменение экологических условий водоема, связанное с нарастанием уровня эвтрофикации, вызывает у окуней ответную реакцию биохимических систем, в частности, белкового метаболизма, которая проявляется в вариации концентраций пептидов в разных фракциях, но, общим для данного вида рыб является изменение именно во фракциях с Мм 5,7 и 4,8 кДа.

##### **4.4.6.1. Возрастные и половые вариации состава низкомолекулярных пептидов мускулатуры окуней из озер Чучьярви и Вуонтеленьярви**

Фракционный состав низкомолекулярных пептидов мышц окуней обоих полов во всех возрастных группах качественно был идентичен. Самцы окуней из светловодного олиготрофного оз. Чучьярви (контрольный водоем) имели более высокий уровень пептидов во фракциях, чем таковые из темноводного мезотрофного оз. Вуонтеленьярви (опытный водоем). Возрастные количественные изменения в составе низкомолекулярных мышечных пептидов у окуней из Чучьярви в большинстве фракций отсутствовали. У рыб из оз. Вуонтеленьярви зарегистрирована отрицательная динамика уровня пептидов.

Сравнительный анализ концентраций пептидов во фракциях мускулатуры самок показал меньший по сравнению с самцами уровень различий между образцами из разных по экологическим условиям озер.

В мускулатуре самок двухлетнего возраста, выловленных из оз. Чучъярви, концентрация пептидов с молекулярными массами 4,6 и 1,8 кДа была в 5 – 8 раз выше, чем у самцов. В мышцах самок из более эвтрофицированного и загрязненного ртутью оз. Вуонтеленъярви выявлен более высокий по сравнению с самцами уровень пептидов во всех фракциях.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что самцы, по-видимому, более чувствительны, чем самки, к ухудшению экологической ситуации в водоеме, которая в темноводном оз. Вуонтеленъярви связана с усилением гумификации, повышением кислотности и, соответственно, с ростом концентрации водорастворимых форм ртути по сравнению со светловодным оз. Чучъярви. Следует отметить, что в процессе сбора материала обнаружено преобладание самок в уловах из оз. Вуонтеленъярви.

#### **4.4.6.2. Сравнительный анализ динамики изменения состава низкомолекулярных пептидов печени самцов и самок в возрасте 2+ из оз. Чучъярви и Вуонтеленъярви**

Выявлены половые различия в реакции окуней в возрасте 2+ на экологические условия озер Чучъярви и Вуонтеленъярви. У самцов более существенная, чем у самок, разница выявлена в 6 фракциях из 11. А у самок значительное снижение концентрации пептидов относительно контроля выявлено во фракциях с Мм 6,9 и 5,7 кДа (в 21 и 35 раз, соответственно). Обращает на себя внимание факт 15-тикратного роста уровня пептидов во фракции с Мм 5,0 кДа у самок из загрязненного водоема по сравнению с таковыми из чистого озера, что можно связать с ответной реакцией печени рыб на ухудшение экологической ситуации в воде.

Из результатов сравнительного исследования низкомолекулярных соединений пептидной природы печени окуней, выловленных из оз. Чучъярви и Вуонтеленъярви, следует вывод о том, что различные по степени комфортности экологические условия, такие как уровень трофности, закисление водоема и, следовательно, связанный с этим более высокий уровень накопления ртути в тканях, вызывают количественные изменения фракционного состава. Данные, полученные для печени рыб-двухлеток, подтверждают вывод, полученный на мышцах, что самцы, по-видимому, более чувствительны к ухудшению экологической ситуации в водоеме, чем самки.

#### **4.4.7. Влияние техногенного загрязнения водоемов на фракционный состав низкомолекулярных пептидов тканей рыб**

##### **4.4.7.1. Вариабельность состава пептидов печени сигов в условиях загрязнения тяжелыми металлами и флотореагентом**

Для исследования были использована рыба, выловленная в осенний сезон в озерах на территории Мурманской области: оз. Куэтсиярви (постоянное воздушное загрязнение тяжелыми металлами в результате деятельности медно-никелевого комбината в г. Никель); губа Белая озера Имандра (в жидких сбросах апатит-нефелиновой обогатительной фабрики г. Апатиты содержатся тяжелые металлы, а также технологический флотореагент). Озеро

Умбозеро в настоящее время не подвержено интенсивному загрязнению, поэтому образцы из этого водоема использовались в качестве контрольных (Лукин, Кашулин, 1991).

Фракционный состав пептидов при качественной стабильности имел выраженные количественные различия (рис. 8). Полученные результаты позволяют сделать предположение о том, что уровень ТМ в водоемах превысил некий пороговый уровень и стал достаточным для проявления четкого биохимического ответа в печени сига на существенное ухудшение экологической ситуации в озерах, подвергшихся массивному техногенному прессу. В особенности это касается оз. Куэтсиярви, которое в настоящее время по мнению Н.А. Кашулина с соавторами (Кашулин и др., 1999) является зоной экологического кризиса. Несмотря на существенные патоморфологические изменения, регистрируемые в органах рыб, численность сига в озере поддерживается на уровне, достаточном для существования популяции в целом. Полученные результаты, на наш взгляд, свидетельствуют в пользу более высоких, чем представлялось ранее, адаптивных возможностей этой рыбы в условиях нарастания давления абиотических факторов техногенного происхождения. Доля пептидов во фракциях экстракта из печени сига, обитающих в губе Белой оз. Имандра, одинакова, но чаще была ниже чем в образцах не только из оз. Куэтсиярви, но и контрольных значений. Только во фракции с Мм 4,2 кДа она преобладает над этими вариантами в 1,4-2,9 раза.

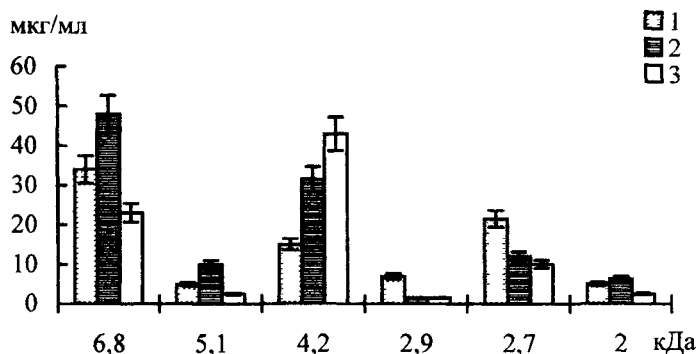


Рис. 8. Концентрация пептидов во фракциях печени сига из водоемов с разной степенью загрязнения ТМ

1 – оз. Умбозеро, 2 – оз. Куэтсиярви, 3 – оз. Имандра, по оси ординат – концентрация пептидов, по оси абсцисс – молекулярные массы фракций, кДа

Исходя из принципа адекватности ответа можно было бы предположить более высокий уровень низкомолекулярных пептидов во фракциях у сига из губы Белой, чем у рыб из Умбозера, хотя на самом деле это не так. Обнаруженный феномен скорее всего связан с типом загрязнителей в сточных водах апатит-нефелинового обогащенного комплекса,

поступающих в губу. Эта вода содержит флотореагенты, которые могут состоять из разнообразных веществ органической природы, являющихся мощными детергентами. С одной стороны эти токсиканты препятствуют накоплению ТМ в организме рыб (поэтому нет выраженного ответа у сигах из губы Белой на повышенную концентрацию ТМ), а с другой – при растворении в воде превращаются в сильные мембранные яды, повреждающие не только клеточные стенки, но и внутриклеточный мембранный комплекс, что в результате может приводить к частичной блокировке разных звеньев белкового метаболизма, что мы и наблюдаем на сигах из губы Белой.

Косвенно более острая, чем на тяжелые металлы, реакция сигах на флотореагент подтверждается показателем соотношения оптических плотностей  $D_{250}/D_{280}$  (Woodworth, Pascoe, 1983), используемым для измерения относительной концентрации металлоионенинов в тканях рыб, в двух фракциях пептидного экстракта с Мм 4,2 и 2,7 кДа (табл. 10). Максимальные значения этого параметра показаны для пептидного экстракта печени сигах из губы Белой, хотя уровень меди, никеля и цинка в которой был ниже, чем в Куэтсиярви.

Таблица 10

Исследованный водоем	Соотношение оптических плотностей ( $D_{250}/D_{280}$ ) пептидов печени сига	
	Молекулярные массы фракций	
	4,2 кДа	2,7 кДа
Умбозеро	1,7	1,7
Куэтсиярви	2,8	7,0
губа Белая оз Имандра	11,4	11,5

#### 4.4.7.2. Сравнительный анализ фракционного состава низкомолекулярных пептидов мускулатуры плотвы и щуки из Каскесозера и хвостохранилища Костомукшского ГОКа

Источником загрязнения Костомукшского ГОКа являются, главным образом, техногенные воды системы оборотного водоснабжения. Главной особенностью их ионного состава следует считать аномально высокое содержание калия ( $129 \pm 9$  мг/мл – превышение фоновой концентрации в 40 раз), которое мало менялось с течением времени. Кроме калия в воде хвостохранилища превышены предельно допустимые концентрации для рыбохозяйственных водоемов по сульфатам и литию. Необычной является величина отношения эквивалентных концентраций K:Na, равная 5,62 в 1998 г., а также преобладание группы щелочных металлов над щелочно-земельными (2,3:1) (Лозовик и др., 2001), что приводит к заметному защелачиванию воды (рН - 8–8,5).

В составе низкомолекулярных пептидов, экстрагированных из мышц плотвы из чистого водоема в большинстве фракций уровень пептидов был выше, чем у рыб из загрязненного. Во фракциях с Мм  $3,3 \pm 0,2$  и  $1,7 \pm 0,1$  кДа уровень различий был очень высоким (20 – 100 раз). А во фракциях с Мм 4,2 и 2,1 кДа концентрация пептидов у особей из хвостохранилища была в 5 – 7 раз выше, чем у таковых из контрольного озера.

Анализ оптической плотности при 250 нм показал очень низкую оптическую активность пептидов на этой длине волны у плотвы из хвостохранилища по сравнению с рыбами из контрольного водоема. Кратность различий между вариантами эксперимента по разным фракциям составляла 1,4 – 22 раза.

У щук из контрольного водоема концентрация пептидов в мышцах в низкомолекулярной части спектра была выше, чем у таковых из загрязненного водоема в 2,2 – 5,2 раза (фракции с Мм 4,4; 4,2; 2,2 и 2,1 кДа). В высокомолекулярной части спектра (фракции с Мм 4,8 – 5,7 кДа) у щук из Каскесозера выявлено в 1,1 – 3,6 раза меньше пептидов, чем у таковых из хвостохранилища. Наиболее сильные отличия выявлены во фракции с Мм 3,7 кДа. У рыб из загрязненного водоема концентрация пептидов была в 79 раз выше, чем у особей из чистого.

Анализ компонентов пептидного пула мускулатуры щук при 250 нм показал, что в мышцах рыб из хвостохранилища, во всех фракциях уровень оптически активных на этой длине волны соединений был в 1,6 – 6 раз выше, чем у особей из Каскесозера.

Полученные результаты по нашему мнению, свидетельствуют о неблагоприятном воздействии на белковый метаболизм плотвы гидрохимического состава водной среды, сложившегося в хвостохранилище Костомукшского ГОКа. Щуки, в отличие от плотвы, оказались более толерантными. Суть разного характера ответной реакции этих рыб на тип загрязнения, существующий в данном водоеме не вполне понятна и, возможно, кроется в экологической специфике исследованных видов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основной целью настоящей работы было выяснение особенностей изменений в липидных и белковых составах у эктотермных организмов разной организации – прокариотов (микроорганизмов) и эукариотов (гельминтов, рыб), под действием различных факторов окружающей среды абиотического (температура), биотического (взаимодействие рыб с паразитическими организмами) и антропогенного происхождения.

Эктотермные (пойкилотермные) организмы в большей степени, чем эндотермные (гомойотермные), зависимы от особенностей среды. Необходимость приспосабливаться к постоянно меняющимся условиям среды сформировала в процессе эволюции у эктотермов способность адекватно реагировать на колебания экологических факторов путем использования различных биохимических адаптивных механизмов. Одним из таких механизмов является количественная варибельность липидного состава. Именно липиды в силу особенностей химического состава, жидкокристаллической структуры молекул наилучшим образом подходят на роль главных участников адаптивных реакций на биохимическом уровне. Недаром Е.М. Крепс (1981) называл липиды "молекулами адаптации". Как показали исследования проведенные нами и другими авторами на эктотермных организмах разного уровня организации, их липидный состав отличается высоким уровнем варибельности под действием разнообразных

факторов среды. В частности, нами обнаружены изменения в липидных спектрах микроорганизмов сем. *Vibrionaceae*, связанные с определенной экологической приуроченностью – обитанием в воде или полости тела рыбы. Выявлены различия между штаммами микроорганизмов, собранными в разных географических зонах. Учитывая темпы размножения бактерий и, соответственно, скорость, с которой масса генетических вариантов вступает в поле эволюционных преобразований, логично прогнозировать нивелировку количественных липидных соотношений в процессе продолжительного культивирования штаммов в лабораторных условиях. Тем не менее, полученные нами данные показывают, что количественная вариабельность липидных спектров у разных штаммов имеет отличия, определяемые спецификой той среды, из которой микроорганизмы были выделены, несмотря на выращивание в стандартизованных условиях. Это можно объяснить с позиций биохимической преадаптации липидных спектров бактерий к условиям существования, постулирующей, что количественная изменчивость липидных фракций колеблется в границах, закрепленных в процессе эволюции естественным отбором и контролируется геномом. Если генетически закрепленные границы вариабельности не выходят за пределы нормы реакции генов, отвечающих за метаболизм липидов и не нарушают нормальной жизнедеятельности бактериальной клетки в новых условиях, например, при культивировании на искусственных средах, то они, по-видимому, продолжают поддерживаться естественным отбором, что косвенно подтверждается нашими исследованиями.

Эффект преадаптации обнаруживается и при исследовании состава жирнокислотных радикалов липидов. Количественные соотношения жирных кислот изменяются под влиянием различных факторов, среди которых главным фактором является термический режим среды обитания. Несмотря на то, что процессы жизнедеятельности у пойкилотермных организмов сохраняются при температурах от  $-50$  до  $+100^{\circ}\text{C}$  (Озернюк, 1992), подавляющее большинство экотермных животных адаптировано к термическому режиму, изменяющемуся от  $0$  до  $+45^{\circ}\text{C}$ . При этом каждый вид обычно характеризуется определенным эволюционно сформированным диапазоном термотолерантности. Исследованные нами представители сем. *Vibrionaceae* – это обычный микробиологический компонент водных биоценозов. Они являются факультативными психрофилами и обитают при температурах от  $0$  до  $+30^{\circ}\text{C}$ . Проведенные нами исследования показали, что жирнокислотные спектры у микроорганизмов вида *Vibrio anguillarum* в значительной степени преадаптированы к термическому режиму региона обитания того или иного штамма. Информация о температурнозависимой специфике количественных соотношениях жирных кислот может, по-видимому, сохраняться неопределенно долго в геноме этих бактерий, поскольку не элиминируется при продолжительном лабораторном культивировании штаммов в стабильных условиях.

В настоящее время общепризнанна аксиома о соответствии степени ненасыщенности жирнокислотных радикалов липидов температуре внутренней среды организма (Крепс, 1981). Однако полученные в этой работе данные



работе данные свидетельствуют о существовании у исследованных нами эктотермных эукариотов (гельминтов и рыб) отклонений от данного постулата, заключающиеся в несоответствии количественных соотношений пула ненасыщенных жирных кислот в тканях реальному термическому режиму, которое, по нашему мнению, связано с эффектом преадаптации. Существование феномена биохимической преадаптации количественных соотношений жирнокислотного пула липидов представляется совершенно необходимым для тех групп организмов, онтогенез которых сопряжен с очень быстрой, по сути мгновенной, сменой термических условий внешней среды. Например, у некоторых видов паразитов со сложным циклом развития чередование стадий сопровождается последовательной сменой сред, резко различающихся по температуре (холоднокровные и теплокровные хозяева). Например, состав жирных кислот у преимагинальных стадий цестод подотряда *Diphyllobothriata*, развивающихся в холоднокровных хозяевах, в значительной мере соответствует температурам не промежуточных (рыбы – 10–15°C), а дефинитивных хозяев (птиц и млекопитающих – 40°C), то есть по этому биохимическому показателю инвазионная личинка преадаптирована к будущему термическому режиму среды обитания. Ранее рядом исследователей был установлен факт высокой ненасыщенности жирнокислотных радикалов тотальных липидов у ленточных гельминтов, паразитирующих у теплокровных позвоночных, не отвечающий вышеуказанной аксиоме. Нами на имагинальных стадиях цестод р. *Diphyllobothrium* было установлено, что кажущееся несоответствие связано с преадаптацией количественных соотношений жирнокислотных спектров к низкой температуре будущей среды обитания у половых продуктов, синтезируемых в колоссальных количествах, поскольку существование этих видов ленточных гельминтов в природе обеспечивается путем реализации r-стратегии.

Для пресноводных рыб умеренных и северных широт России полигон термотолерантности ограничен значениями температур приблизительно от 0 до +25–38°C (Голованов и др., 1997). Размножение является уязвимым процессом, поскольку происходит в более узком термическом диапазоне, чем это необходимо для питания, роста и развития (Бигон и др., 1989). В процессе эволюции у рыб на уровне липидного обмена выработались механизмы согласования процесса воспроизводства со специфичными для каждого вида температурными условиями размножения, одним из которых является преадаптация состава жирных кислот липидов генеративных тканей. Например, у карпа (нижний предел температуры размножения +17–18°C) жирнокислотный состав икры перед нерестом становится более насыщенным, чем таковой соматических органов, а у озерного лосося (верхний лимит +7°C) ненасыщенность липидов икры начинает превышать таковую других тканей.

Липиды, как "молекулы адаптации", участвуют в ответных реакциях организма на воздействие различных факторов среды абиотической и биотической природы у всех живых существ – прокариотов и эукариотов, эктотермных и эндотермных организмов путем альтерации жирнокислотного

компонента. Нами установлено, что у рыб при взаимодействии с биотическими факторами среды (паразитические про- и эукариоты) адаптивные реакции различного временного масштаба сопряжены в значительной мере с вариацией количественных соотношений эйкозапентаеновой ( $C_{20:5}$ ) и докозагексаеновой ( $C_{22:6}$ ) кислот в тканевых липидах в отличие от таковых теплокровных млекопитающих, для которых в аналогичной ситуации характерна модуляция уровня арахидоновой ( $C_{20:4}$ ) кислоты.

В отличие от липидов, набор белков с молекулярными массами 10 - 200 кДа исследованных нами методами гель-хроматографии и диск-электрофореза видов прокариотов и некоторых групп эктотермных эукариотов отличались высокой качественной стабильностью. На рыбах также продемонстрирована низкая количественная вариабельность этих соединений. По-видимому, высокомолекулярные полипептиды должны быть отнесены к группе веществ, слабо реагирующих на быстрые изменения экологической обстановки в окружающей среде, потому что именно на белки эволюцией возложена задача поддержания постоянства функционирования метаболических систем организма в нестабильных внешних условиях. Это фундаментальное свойство белковых молекул было использовано нами при выделении из высоко вирулентного штамма аэромонад группы белков с молекулярными массами 50-70 кДа и создании на их базе эффективной биохимической вакцины против бактериальной геморрагической септицемии карповых и лососевых рыб, стимулирующей высокой протективный эффект также при фурункулезе, вибриозе и интоксикации  $T_2$ -микотоксином.

При сравнительном изучении белковых составов гельминтов от холоднокровных и теплокровных позвоночных и их хозяев получены данные, свидетельствующие в пользу гипотезы В.Я. Александрова (1975) о конформационном соответствии белков температуре окружающей среды, а именно: процесс эволюционной адаптации видов при освоении экологических ниш с разными температурными условиями сопровождается изменением размеров белковых молекул - уменьшением при высоких температурах или увеличением при низких.

В наших исследованиях была выявлена высокая чувствительность состава низкомолекулярных пептидов к воздействию разнообразных внешних факторов (включая наиболее часто встречающиеся загрязняющие вещества), что позволяет рекомендовать качественный и количественный анализ фракционного состава этих веществ в качестве одного из информативных показателей для системы эколого-биохимического мониторинга и тестирования водоемов. Несомненно полезным может быть такой подход при установлении токсичности промышленных стоков, выявлении основных загрязнителей, оценке физиологического состояния гидробионтов в водоемах, испытывающих антропогенную нагрузку.

Таким образом, проведенные исследования подтверждают факт, что в основе взаимоотношений организма и среды лежат биохимические адаптационные механизмы, в реализации которых липиды и соединения пептидной природы (белки и олигопептиды) играют важную роль. Изучение

биохимических особенностей приспособительных реакций на уровне метаболизма липидов и белков позволяет глубже понять такое фундаментальное свойство живых существ, как персистенция в сильно изменчивых условиях среды обитания.

## ВЫВОДЫ

1. Показан эффект биохимической преадаптации количественных соотношений жирнокислотных радикалов липидов к будущему термическому режиму среды обитания у эктотермных организмов разной организации от прокариот (микроорганизмов) до низших позвоночных эукариот (рыб), обитающих в средах с высокой вариабельностью температурных условий, либо онтогенез которых связан со сменой условий резко различающихся по температуре.

2. На разных группах микроорганизмов из сем. *Vibrionaceae* (подвижных и неподвижных аэромонадах, вибрионах, псевдомонадах), типичных представителях бактериальной флоры водоемов, подтвержден факт таксономической значимости состава тотальных липидов, установленный ранее для других видов бактерий. Различия по липидным спектрам между исследованными микроорганизмами связаны также и с феноменом преадаптации к условиям окружающей среды, из которых они были изъяты, и сохраняются при длительном культивировании в лабораторных условиях.

3. Выявлена экологическая вариабельность состава жирных кислот у аэромонад, псевдомонад и вибрионов, но ее размах незначителен, поэтому количественная характеристика жирнокислотных спектров может быть использована как дополнительный хемотаксономический критерий родового ранга. Обнаружено, что доленое распределение между кислотами (в пределах таксономических границ), отражает, подобно составу тотальных липидов, экологическую приуроченность вида.

4. Сравнительный анализ электрофоретических белковых спектров 73 штаммов бактерий р. *Aeromonas*, собранных в разных регионах России и Молдавии, показал, что набор белков с М.м. ниже 30 кДа является таксономической особенностью этого рода. Видовыми характеристиками являются качественные и, в основном, количественные различия в группе белков с М.м. 30-60 кДа.

5. Обнаружено, что вирулентность подвижных аэромонад связана с комплексом биохимических признаков, а именно: более высоким по сравнению с непатогенными или слабопатогенными штаммами уровнем печетных жирных кислот в липидах, протеолитической активностью в широком диапазоне pH, концентрацией белков с молекулярными массами 30-60 кДа. Экспериментальное использование препаративно выделенного набора белков с М.м. 30-60 кДа в качестве протективных антигенов стимулировало у рыб развитие защиты против аэромонад. На базе этих исследований была создана поливалентная бесклеточная вакцина, показавшая высокую эффективность не только при бактериальной геморрагической септицемии, вызываемой подвижными аэромонадами, но и при фурункулезе и вибриозе лососевых, энтеросептических инфекциях смешанной этиологии, а также при отравлении T<sub>2</sub>-микотоксином.

6. На разных уровнях (тканевом и мембранном) у гельминтов, паразитирующих у экто- и эндотермных позвоночных, показана четкая зависимость количественного состава жирных кислот суммарных липидов паразитов от температуры внутренней среды хозяев и подтвержден постулат о соответствии степени ненасыщенности липидов биомембран клеток окружающей температуре, абсолютно необходимым для эктотермных организмов, подавляющее большинство видов которых полностью зависит от термического режима среды обитания.

7. Показано, что фракционный состав водорастворимых тканевых белков гельминтов и их хозяев, определяемый методами гель-хроматографии и электрофореза, отражает таксономическую специфику. У паразитов и позвоночных, образующих систему "паразит-хозяин" существует сходство по физико-химическим свойствам белковых фракций, определяемое сопряженной эволюцией сочленен системы. Между "низкотемпературной" и "высокотемпературной" системами "паразит-хозяин" выявлены различия, которые связаны с термических режимом внутренней среды исследованных организмов (уменьшение молекулярных масс белков, увеличение числа быстро мигрирующих компонентов) и подтверждают гипотезу о том, что эволюционный процесс направлен на поддержание соответствия конформационной гибкости белковых молекул температурным условиям существования вида через модификацию их строения.

8. Показано, что у рыб в процессе развития генеративных тканей количественный состав жирных кислот в липидах половых продуктов формируется в соотношениях, которые соответствуют генетически детерминированному диапазону термотолерантности воспроизводства, и в определенной степени, в отличие от такового соматических тканей, независим от реальных температурных условий, а преадаптирован к температуре размножения, специфичной для того или иного вида.

9. Адаптации рыб на уровне липидного и белкового метаболизма к воздействию биотических факторов среды (микроорганизмы, паразитические эукариоты) реализуются через быструю количественную вариабельность основных фракций тотальных липидов и входящих в их состав жирных кислот, главным образом арахидоновой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой. Изменения в белковых спектрах происходят при длительном влиянии биотических факторов.

10. Установлено, что у рыб набор тканевых низкомолекулярных пептидов в диапазоне молекулярных масс 1 - 10 кДа имеет половую и таксономическую специфику, а их количественная вариабельность зависит от действия разнообразных факторов окружающей среды. Показано, что низкомолекулярные пептиды участвуют как в быстрых ответных реакциях организма на изменение условий внешней среды, так и при адаптациях к хроническому влиянию тех или иных факторов. Количественные модификации фракционного состава тканевых низкомолекулярных пептидов можно использовать как дополнительный индикатор состояния гидробионтов при эколого-биохимическом мониторинге и тестировании водоемов.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Смирнов Л.П., Немова Н.Н. Сравнительная оценка белковых спектров печени и мускулатуры рыб, птиц и млекопитающих, получаемых методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле // Сравнительная биохимия рыб и их гельминтов. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. 1977. С 85-92.
2. Смирнов Л.П. Гель-хроматография белков печени и мышц некоторых позвоночных животных // Сравнительная биохимия рыб и их гельминтов, Петрозаводск Карельский филиал АН СССР. 1977. С. 92-99.
3. Смирнов Л.П., Богдан В.В. О липидном составе некоторых тканей песцов в норме и при дифиллоботриозе // Новое в физиологии и биохимии пушных зверей Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. 1977. С. 115-118.
4. Смирнов Л.П., Сидоров В.С. Сравнительное изучение белковых составов цестоды *Eubothrium crassum* и некоторых органов ее хозяина - палии *Salvelinus lepechini* Gmclin методом гель-хроматографии // Экологическая биохимия животных Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. 1978 С 46-53.
5. Смирнов Л.П., Сидоров В.С. Жирнокислотный состав цестод *Eubothrium crassum* и *Diphyllobothrium dendriticum* // Паразитология, 1979 Т.13. N5. С.522-529.
6. Сидоров В.С., Смирнов Л.П. Жирнокислотный состав некоторых гельминтов холоднокровных и теплокровных позвоночных // Ж. эвол. физиол. и биохимии. 1980. Т.16, N6. С. 551-555.
7. Смирнов Л.П., Сидоров В.С. Изучение белкового состава цестод *Eubothrium crassum* и *Diphyllobothrium dendriticum* методами гель-хроматографии и диск-электрофореза // Сравнительные аспекты биохимии рыб и некоторых других животных. Петрозаводск. Карельский филиал АН СССР. 1981 С. 80-87.
8. Смирнов Л.П. Гель-хроматография и диск-электрофорез белков гельминтов // Сравнительные аспекты биохимии рыб и некоторых других животных, Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР 1981. С. 87-103.
9. Смирнов Л.П. Липиды гельминтов //Экология паразитических организмов в биогеоценозах Севера. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. 1982. С. 128-145
10. Смирнов Л.П., Богдан В.В. Сравнительное изучение липидных составов некоторых цестод и их хозяев // Экология паразитических организмов в биогеоценозах Севера. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР 1982. С. 145-151
11. Смирнов Л.П., Сидоров В.С., Болгова О.М., Гурьянова С.Д. К вопросу о качественной и количественной изменчивости жирнокислотных спектров эктотермных животных // Генетика промысловых рыб и объектов аквакультуры, М.: Легкая и пищевая пром-сть. 1983. С. 43-47.
12. Смирнов Л.П. Сравнительное изучение белкового состава мембран лизосом *Eubothrium crassum* и печени хозяина - палии *Salvelinus lepechini* - методом электрофореза в полиакриламидном геле // Сравнительная биохимия водных животных Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. 1983 С. 150-154.
13. Смирнов Л.П. Диск-электрофорез белков мышц карпа // Сравнительная биохимия водных животных. Петрозаводск. Карельский филиал АН СССР. С 155-159
14. Смирнов Л.П., Сидоров В.С. Сравнительное изучение белковых спектров цестод и их хозяев методами гель-хроматографии и диск-электрофореза // Паразитология 1984. Т.18, N3. с. 430-435.

15. Высоцкая Р.У., Смирнов Л.П., Ванятинский В.Ф. Влияние инвазии ихтифтириуса на белковый состав и активность лизосомальных ферментов годовиков карпа // Биохимия молоди пресноводных рыб Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. 1985. С. 40-44.
16. Смирнов Л.П. Применение двойного окрашивания гелей после диск-электрофореза для количественного определения белка на денситометре "Хромоскан" // Биохимия молоди пресноводных рыб Петрозаводск Карельский филиал АН СССР. 1985. С. 85-88.
17. Смирнов Л.П. Влияние зимовки и активного плавания на количественное распределение водорастворимых белков мускулатуры сеголеток карпа // Биохимия молоди рыб в зимовальный период, Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР 1987. С. 46-49.
18. Смирнов Л.П., Юхименко Л.Н. Временные методические рекомендации по сравнительному анализу штаммов аэромонад методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия // ВНИИПРХ, 1988. 14 с.
19. Smirnov L. P. Biochemical aspects of helminth adaptation to host temperature // Parasites of freshwater fishes of North-West Europe, Petrozavodsk. 1989. P 145 – 153
20. Смирнов Л.П., Богдан В.В. Лизосомы цестод // Паразитология. 1989. Т. 23, №3. С.260-263.
21. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., Смирнов Л.П., Гурьянова С.Д. Сравнительная биохимия гельминтов рыб: Аминокислоты, белки, липиды Л. Наука 1989. 152 с
22. Смирнов Л.П., Тойвонен Л.В. Анализ сывороточных белков карпа методом электрофореза в гомогенном и градиентном полиакриламидном гелях // Биохимия экто- и эндотермных организмов Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР 1989. С. 144-148
23. Богдан В.В., Смирнов Л.П., Рипатти П.О. Сравнительный анализ жирнокислотных спектров бактерии *Aeromonas hydrophyla*, выращенной на разных средах // Биохимия экто- и эндотермных организмов Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. 1989. С. 75-79
24. Смирнов Л.П., Юхименко Л.Н. Белковые спектры различных штаммов аэромонад // Биохимия экто- и эндотермных организмов в норме и при патологии Петрозаводск: Карельский научный центр АН СССР 1990. С. 111-115
25. Богдан В.В., Смирнов Л.П. Изменение фосфолипидного состава крови у разных по физиологическому состоянию карпов при аэромонозе // Биохимия экто- и эндотермных организмов в норме и при патологии Петрозаводск: КНЦ АН СССР, 1990. С. 116-120
26. Богдан В.В., Головина Н.А., Смирнов Л.П., Юхименко Л.Н. Влияние аэромонадной инфекции на фосфолипиды крови годовиков карпа // Сборник научных трудов. Болезни рыб. М.- ВНИИПРХ. 1991. Вып 63. С. 33-39.
27. Богдан В.В., Смирнов Л.П., Крупнова М.Ю., Немова Н.Н., Юхименко Л.Н. Динамика некоторых биохимических показателей крови карпа при аэромонадной и псевдомонадной инфекции // Эколого-популяционный анализ паразитов и кровососущих членистоногих. Петрозаводск: Карельский научный центр АН СССР, 1991. С. 75-81
28. Смирнов Л.П., Юхименко Л.Н. Изменение белковых спектров в некоторых тканях карпа при экспериментальном аэромонозе // Биохимические особенности болезней рыб Петрозаводск: Карельский научный центр АН СССР, 1991. С. 84-89.

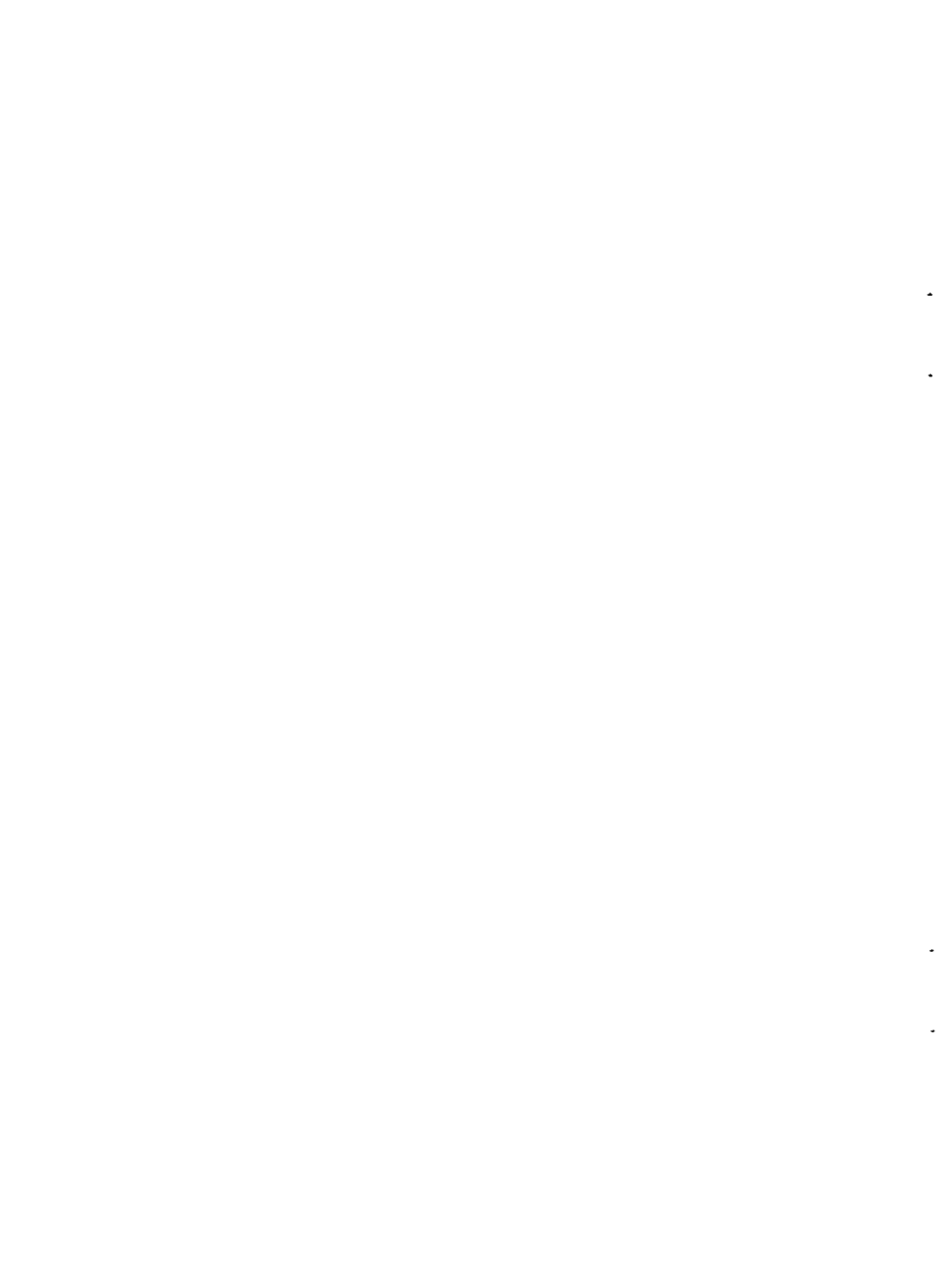
29. Кирилук С.Д., Смирнов Л.П. Электрофоретические спектры водорастворимых белков мышц сигов из различных районов Кольского полуострова // Биологические исследования растительных и животных систем. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 1992. С. 124-130.
30. Кирилук С.Д., Смирнов Л.П. Влияние различных факторов окружающей среды на белковый и полипептидный состав различных тканей рыб. I. Исследование методом жидкостной хроматографии // Биохимические методы в экологических и токсикологических исследованиях. Петрозаводск: КНЦ РАН. 1993. С. 41-46.
31. Кирилук С.Д., Смирнов Л.П. Влияние различных факторов окружающей среды на белковый и полипептидный состав различных тканей рыб. II. Исследование электрофоретическими методами // Биохимические методы в экологических и токсикологических исследованиях. Петрозаводск: КНЦ РАН. 1993. С. 47-52.
32. Смирнов Л.П. Влияние экологических факторов на белковый состав эктотермных животных // Теоретические аспекты экологической биохимии. Петрозаводск: КНЦ РАН. 1993. С. 139-146.
33. Смирнов Л.П., Кирилук С.Д. Влияние загрязнения окружающей среды на фракционный состав низкомолекулярных пептидов из различных тканей сигов // Изв. РАН, сер. биол. 1994. №4. С. 617-622.
34. Немова Н.Н., Смирнов Л.П., Крупнова М.Ю., Сидоров В.С. Активность протеиназ лизосом в тканях карпа при аэромонозе // Прикл. биохимия и микробиология. 1994. Т. 30, №3. С. 454-457.
35. Смирнов Л.П., Богдан В.В. Жирнокислотный состав лизосомальных мембран цестод *Eubothrium crassum* и *Diphyllobothrium dendriticum* // Паразитология. 1992. Т. 26, №3, с. 234-239.
36. Смирнов Л.П., Богдан В.В. Влияние температуры хозяина на жирнокислотный состав общих и лизосомальных мембранных липидов цестод *Eubothrium crassum* и *Diphyllobothrium dendriticum* // Ж. эвол. физиол. и биохимии. 1995. Т. 31, № 3. С. 11-13.
37. Смирнов Л.П., Богдан В.В. Влияние термошока на липидный состав плероцеркоидов некоторых цестод // Паразитология. 1997. Т. 31, вып. 6. С. 543-551.
38. Юхименко Л.Н., Смирнов Л.П., Викторова В.Ф., Богдан В.В., Немова Н.Н. Штамм бактерии *AEROMONAS SOBRIA* - продуцент протективного антигена // Патент (19) SU (11) 1839458 A1 (51) 5 C 12 N1/20, A61K 39/02. 23.01.1995.
39. Юхименко Л.Н., Смирнов Л.П. Вакцина для профилактики бактериально-геморрагической септицемии рыб // Патент (19)RU (11) 2080874 (13)C1 (51) 6 A61K39\02 Бюлл. №16. 10.06.1997.
40. Богдан В.В., Смирнов Л.П., Сидоров В.С. Жирнокислотный состав бактерии *Vibrio anguillarum* // Прикладная биохимия и микробиология. 1998. Т. 34, № 2. С. 183-185.
41. Smirnov L.P., Bogdan V.V. The phenomenon of the temperature preadaptation of fatty acids spectra of lipids of some cestodes // Karelia and Norway. the main trends and prospects of scientific cooperation. Petrozavodsk. 1997. P. 51-54.
42. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Гусева Н.В., Смирнов Л.П. Специфическая профилактика бактериальной геморрагической септицемии (аэромоноза) рыб // Рыбное хозяйство, серия Аквакультура (информационный пакет), вып. 2. М.: ВНИЭРХ. 1998. С. 14 – 21.

43. Богдан В.В., Смирнов Л.П., Сидоров В.С. Влияние аэромонад разной патогенности на жирнокислотный состав фосфолипидов карпа // Прикладная биохимия и микробиология. 1999. Т. 35, № 2. С.236-238.
44. Богдан В.В., Смирнов Л.П. Влияние аэромонадной инфекции на мембранные липиды некоторых тканей питающихся и голодающих годовиков карпа *Cyprinus carpio* // Вопросы ихтиологии. 2000. Т. 40, № 1 С 128-132.
45. Смирнов Л.П., Богдан В.В., Немова Н.Н., Юхименко Л.Н. Цитоплазматическая белковая вакцина против бактериальной геморрагической септицемии (аэромоназ) рыб // Прикладная биохимия и микробиология 2000. Т.36, №5. С. 592-596
46. Богдан В.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н., Крупнова М.Ю., Юхименко Л.Н. Сравнительное изучение некоторых биохимических показателей у патогенного и непатогенного штаммов аэромонад // Известия АН. Серия биологическая. 2000. № 5 С 533-537.
47. Суховская И.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н., Комов В.Т. Влияние ртути на фракционный состав низкомолекулярных пептидов мускулатуры окуней *Perca fluviatilis* L. // Вопросы ихтиологии, 2001 Т.41, №5. С. 699-703.
48. Suhovskaya I.V., Smirnov L.P., Nemova N.N., Ostashkova V.V. The effect of mercury salt on low-molecular peptide composition of rat tissues // Proceedings Book of 3<sup>rd</sup> international symposium on trace elements in human: new perspectives. Athens, Greece. 2001 P. 106-114.
49. Богдан В.В., Смирнов Л.П., Сидоров В.С. Липидный состав лимфоцитов крови карпа при бактериальной инфекции // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т. 38, №2. С. 190-193.
50. Nemova N.N., Bogdan V.V., Gurjanova S.D., Smirnov L.P., Krupnova M.Yu. et al. Effect of mercury and water acidification on fish biochemical status // Modern Problems of Bioindication and Biomonitoring. Syktyvkar. 2003 P. 308-318.
51. Богдан В.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н., Крупнова М.Ю. Биохимическая характеристика разных по патогенности штаммов аэромонад // Прикладная биохимия и микробиология. 2003 Т. 39, № 6. С. 670-675.
52. Смирнов Л.П., Суховская И.В., Немова Н.Н. Влияние различных факторов среды на низкомолекулярные пептиды рыб (обзор) // Экология. 2005. № 1.



Изд. лиц. № 00041 от 30.08.99 Подписано в печать 30.11.04. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Бумага офсетная. Гарнитура «Times». Печать офсетная  
Уч.-изд. л. 3,1. Усл. печ. л. 2,9. Тираж 100 экз. Изд. № 77. Заказ № 461

Карельский научный центр РАН  
185003, Петрозаводск, пр. А. Невского, 50  
Редакционно-издательский отдел





**№ - 6 266**

РНБ Русский фонд

2006-4

4164