

На правах рукописи

ВЫСОЦКАЯ Римма Ульяновна

**ЛИЗОСОМАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ У РЫБ
И ВЛИЯНИЕ НА НИХ ПРИРОДНЫХ,
АНТРОПОГЕННЫХ И ПАТОГЕННЫХ ФАКТОРОВ**

03.00.10 - ихтиология

03.00.04 - биохимия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

Петрозаводск 1999

1498581c

Работа выполнена в лаборатории экологической биохимии Института биологии Карельского научного центра Российской Академии наук

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор В. С. СИДОРОВ

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор Ю. Б. ФИЛИППОВИЧ, доктор биологических наук, профессор М. И. ШАТУНОВСКИЙ, доктор биологических наук, старший научный сотрудник С. П. КИТАЕВ.

Ведущая организация - Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН

Защита диссертации состоится "___" _____ 1999 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д.063.95.01 Петрозаводского государственного университета по адресу: 185640, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33, ПетрГУ, Биологический факультет.

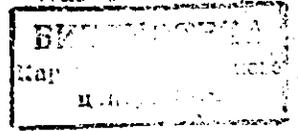
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Петрозаводского государственного университета.

Автореферат разослан "___" _____ 1999 г.

Ученый секретарь диссертационного совета кандидат биологических наук

1498581c

С. Д. УЗЕНБАЕВ



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Адаптация, представляющая собой способность живых организмов приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды с одновременным повышением вероятности выживания и самовоспроизводства (Харборн, 1985), на клеточном и тканевом уровнях осуществляется включением биохимических механизмов, перестраивающих метаболизм за счет количественных и качественных преобразований ферментных систем (Хочачка, Сомеро, 1988). Важная роль в поддержании сложных интегративных функций в организме принадлежит лизосомам – специализированным клеточным органеллам, при непосредственном участии которых в клетке осуществляются реакции ферментативного гидролиза (De Duve et al., 1955; De Duve, Wattiaux, 1966; Barrett, 1969; Tappel, 1969; Holtzman, 1976; Покровский, Тутельян, 1976; Баррет, Хит, 1980; Дин, 1981; Короленко, 1983). Открытие лизосом К. Де Дювом в 1949 году стимулировало интенсивное изучение их структуры и участия в выполнении разнообразных физиологических функций и в патологических механизмах при повреждающих воздействиях и заболеваниях (Покровский, Тутельян, 1976; Видершайн, 1980; Гуткин и др., 1984; Панин, Маянская, 1987; Тутельян и др., 1992; Gordon, 1978; Neufeld, 1991).

Обширный набор ферментов, способных расщеплять практически все компоненты живой материи, и обязательное присутствие почти во всех клетках животного и растительного происхождения указывают на важность выполняемых ими функций. Показана их причастность к таким процессам, как внутриклеточное пищеварение, оплодотворение, деление, дифференцировка и старение клеток, метаморфоз, иммуногенез и мн. др. (Браше, 1961; Зотиков, Пинчук, 1969; Штраус, 1971; Ванюшин, Бердышев, 1977; Нейфах, Тимофеева, 1977; Коничев и др., 1978; Кярнер, 1983; Olea, Nagata, 1991). Через эти органеллы осуществляется реализация эффекта многих гормонов (Юдаев, 1976; Сергеев, 1984; Иванова, 1996), регуляция метаболизма (Локшина, 1979; Орехович и др., 1983; Веремеенко и др., 1988). Особенно детально изучены лизосомы млекопитающих и человека. Работ об участии лизосомального аппарата в поддержании гомеостаза, приспособительных реакциях к меняющимся условиям среды и развитии различных патологий у рыб и других гидробионтов неизмеримо меньше (Бердышев и др., 1967; Сорвачев, 1982; Сидоров, 1984; Субботкина, 1990; Немова, 1992, 1996; Розенгарт и др., 1993; Milanese, Bird, 1972 a, b; Shaffi, 1972; Köhler, 1991). Между

тем, выяснение механизмов физиолого-биохимической адаптации у рыб – уникальной по видовому разнообразию, характеру питания, условий обитания группы позвоночных животных (Никольский, 1963; Уголев, Кузьмина, 1993), представляет несомненный интерес.

Вопросами изучения биохимических реакций, лежащих в основе приспособления организмов к экологическим условиям, как и аспектами механизмов детоксикации ксенобiotиков занимается экологическая биохимия – наука, сформировавшаяся на стыке экологии и биохимии (Остроумов, 1986). Актуальность исследований в области экологической биохимии рыб, являющейся самостоятельной дисциплиной ихтиологического профиля (Лукьяненко и др., 1991), определяется не только возможностью получения данных об особенностях биохимической организации у разных по экологии групп рыб и изменения биохимических показателей в пределах нормы реакции при адаптациях к изменяющимся условиям среды, но также и данных, свидетельствующих о возникновении патологии в связи со все усиливающимся и необратимым антропогенным воздействием на природу. Эти знания являются очень важными как 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 и для решения многих задач, связанных с охраной природы, рациональным природопользованием, искусственным разведением хозяйственно важных видов рыб, тестированием и мониторингом природных сред и многими другими (Шульман, 1972; Лав, 1976; Биргер, 1979; Маляревская, 1979; Остроумова, 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).

Цель и задачи работы. Основной целью настоящей работы было выяснение особенностей функционирования комплекса кислых гидролитических ферментов у рыб, сравнительное изучение роли лизосомального аппарата в выполнении физиологических функций, участия в биохимических механизмах приспособительных и защитных реакций экто- и эндотермных животных. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- используя единую методику в идентичных условиях провести широкое сравнительное изучение лизосомального аппарата у представителей различных таксонов, включая беспозвоночных, низших и высших позвоночных животных;

- изучить активность лизосомальных ферментов в разных органах рыб, отличающихся систематическим положением и особенностями биологии;

- изучить динамику активности ферментов лизосом у рыб в ходе эмбрионального и постэмбрионального развития;

- исследовать влияние природных факторов (температура, сезонность, количество кислорода, обеспеченность пищей и др.) на состояние лизосомального аппарата рыб;

- в природных условиях, экспериментах *in vivo* и *in vitro* изучить влияние на лизосомы и лизосомальные ферменты наиболее часто встречающихся различных по химической природе загрязняющих веществ;

- определить уровень активности ферментов и состояние мембран лизосом в разных органах при заболеваниях различной этиологии;

- на основании анализа полученных данных выяснить возможность использования показателя уровня активности лизосомальных ферментов в качестве теста при оценке качества воды, физиологического состояния рыб, их устойчивости и адаптивных потенций при воздействии неблагоприятных факторов среды.

Теоретическое значение и научная новизна. Большая часть представленных в настоящей работе данных о лизосомах и лизосомальных ферментах рыб получены впервые. Проведенное сравнительно-эволюционное изучение лизосом позволило выявить как общие черты, так и тонкие различия в структуре лизосом, определяемые систематическим положением источника. Широкое варьирование активности лизосомальных ферментов у одного вида рыб в зависимости от внешних и внутренних факторов намного перекрывает различия в уровне одноименных гидролаз у представителей разных таксонов. Активность лизосомальных ферментов характеризует не столько высоту уровня организации, сколько степень приспособляемости животного к меняющимся условиям среды, способность противостоять различным патогенам, соответствует образу его жизни и стадии жизненного цикла.

Эволюция лизосом шла по пути усложнения гетерогенности их структуры и параллельно с формированием и эволюцией функций у многоклеточных организмов происходило расширение функций лизосомального аппарата. Наряду с внутриклеточным пищеварением (основным и древнейшим предназначением лизосом) возростала роль этих органелл в осуществлении специализированных физиологических процессов. Это подтверждают полученные нами данные по распределению

активности лизосомальных ферментов в различных органах и тканях животных. Вовлечение лизосом в выполнение других функций произошло на ранних этапах эволюции. Довольно рано обозначилась роль комплекса кислых гидролаз не только в обеспечении необходимыми питательными веществами, но и в защите от чужеродных и патогенных факторов. Установлено, что наибольшая активность лизосомальных ферментов у рыб характерна для органов, в которых активно происходят процессы гидролитического расщепления, обезвреживания и выведения из организма чужеродных и токсических веществ. Для лизосом из разных органов выявлена энзиматическая гетерогенность.

Показано, что под влиянием половых и кортикостероидных гормонов лизосомы внутренних органов рыб вовлекаются в генеративный биогенез. Установлено непосредственное участие лизосомальных ферментов в гаметогенезе, оплодотворении и метаболических процессах, сопровождающих эмбриогенез. При этом динамика активности ферментов носит стадийноспецифичный характер. В соответствии с неравномерностью процессов роста и развития эмбрионов при переходе на новый этап наблюдается возрастание активности отдельных лизосомальных гидролаз. На разных стадиях онтогенеза наибольшее значение имеют разные ферментные системы лизосом. Важнейшая роль принадлежит лизосомальному аппарату в обеспечении организма рыб пластическими и энергетическими материалами в периоды, когда по тем или иным причинам происходит отключение экзогенного питания.

Ответная реакция лизосомального аппарата рыб на влияние разнообразных неблагоприятных факторов среды носит неспецифический характер, наряду с этим выявлены некоторые отличия в проявлении данной реакции.

Практическое значение работы. Полученные результаты могут найти широкое применение при решении многих практических задач, возникающих при искусственном рыборазведении, в ихтиотоксикологии, паразитологии и охране природы. Определение свободной и общей активности лизосомальных ферментов, модификаций множественных молекулярных форм некоторых из них рекомендуется использовать и качестве информативных показателей при оценке физиологического состояния и устойчивости выращиваемой молоди рыб, при диагностике токсикозов, паразитарных и других патологий; как один из тестов системы эколого-биохимического мониторинга и тестирования природных сред; при определении ПДК загрязняющих веществ и разработке экологически допустимых норм антропогенного воздействия на акватории.

Практическую реализацию полученных результатов осуществляли через отраслевые институты Министерства рыбного хозяйства (СевНИИРХ, г. Петрозаводск; ПИПРО, г. Мурманск; ВНПО по рыбоводству, пос. Рыбное Московской обл.) при выполнении хозяйственных и договоров о содружестве, а также при выполнении совместных работ со студентами и сотрудниками биофака Петрозаводского государственного естественно-географического факультета Карельского государственного педагогического университета.

Апробация работы. Материалы диссертации в виде научных докладов были представлены и обсуждены на научных симпозиумах, съездах, конференциях и совещаниях. Основные из них: III, IV, V, VI, VII и VIII Всесоюзные конференции по экологической физиологии и биохимии рыб (Киев, 1976; Астрахань, 1979; Севастополь, 1982; Паланга, 1985; Ярославль, 1989; Петрозаводск, 1992), I, II и III симпозиумы «Структура и функции лизосом» (Москва, 1976; Новосибирск, 1980; Тбилиси, 1986), III и IV конференции по биохимии мышц (Ленинград, 1978; Тбилиси, 1989), Всесоюзные конференции по эволюционной биохимии и происхождению жизни (Ереван, 1978; Петрозаводск, 1984), V Всесоюзный биохимический съезд (Киев, 1986), 16 конференция Федерации европейских биохимических обществ (Москва, 1984), III Всесоюзный симпозиум по влиянию магнитных полей на биологические объекты (Калининград, 1975), Всесоюзное совещание по экологической энергетике животных (Суздаль, 1988), VI Всесоюзный симпозиум по циклическим нуклеотидам (Петрозаводск, 1988), конференция биохимиков Белорусской, Литовской, Латвийской и Эстонской ССР по молекулярным механизмам регуляции метаболических процессов (Минск, 1987), Всесоюзное совещание по энергетическому обмену у рыб (Суздаль, 1986), VI Всесоюзное совещание эмбриологов (Москва, 1981), Всесоюзная конференция по биологии промысловых рыб и беспозвоночных на ранних стадиях развития (Мурманск, 1974), II Всесоюзное совещание по биологии и биотехнике разведения сиговых рыб (Петрозаводск, 1981), 9, 11, 13 сессии ученого совета и международная конференция по проблеме: «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского севера» (Петрозаводск, 1974, 1981, 1995; Сыктывкар, 1990), VII и X симпозиумы по биологическим проблемам Севера (Петрозаводск, 1976; Магадан, 1983), 18, 22 и 23 конференции по изучению внутренних водоемов Прибалтики (Вильнюс, 1975, 1986; Петрозаводск, 1991), конференция по проблемам рыбохозяйственных исследований внутренних водоемов Карелии (Петрозаводск, 1979), I и II

симпозиумы по экологической биохимии рыб (Ростов Великий, 1987, 1990), III и V Всесоюзные конференции по водной токсикологии (Петрозаводск, 1975; Одесса, 1980), III Всесоюзное совещание по лососевидным рыбам (Тольятти, 1988), IV международный конгресс по паразитологии (Варшава, 1978), IX конференция украинского паразитологического общества (Киев, 1980), IX Всесоюзное совещание по паразитам и болезням рыб (Петрозаводск, 1991), международный симпозиум по физиологическим основам повышения продуктивности хищных пушных зверей (Петрозаводск, 1991), 2-я международная научно-практическая конференция по экологии и охране окружающей среды (Пермь, 1995), I Всесоюзный симпозиум по методам ихтиотоксикологических исследований (Ленинград, 1987), I и II Всесоюзные конференции по рыбохозяйственной токсикологии (Рига, 1988; Санкт-Петербург, 1991), I конгресс ихтиологов России (Астрахань, 1997), симпозиум по теоретическим вопросам биотестирования (Борок, 1981), международное совещание по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 1996), международный симпозиум по экологической физиологии и биохимии осетровых рыб (Борок, 1997), I международная конференция Баренц Евро-Арктического региона по биоиндикации и оценке повреждения организмов и экосистем (Петрозаводск, 1997), международная конференция по крупным озерам Европы (Петрозаводск, 1996), Всероссийский симпозиум по возрастной и экологической физиологии рыб (Борок, 1998), Всероссийское совещание и научная сессия «Антропогенное воздействие на природу Севера и его экологические последствия» (Апатиты, 1998), III Всероссийская научно-практическая конференция «Новое в экологии и безопасности» (Санкт-Петербург, 1998), конференции молодых ученых и специалистов Карелии (Петрозаводск, 1975, 1978), отчетные и юбилейные конференции биологов Карелии (1974, 1978, 1996).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 155 работ, в том числе одна монография.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 473 страницах машинописного текста, содержит 81 таблицу и 85 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы и экспериментальной части, в которой приводится описание материала и методов исследования, 4 глав результатов исследования, заключения, выводов и указателя литературы. Список литературы включает 1070 названий, из них 477 на русском и 593 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Лизосомы, их структура, функции и роль в приспособительных реакциях организма

В обзоре литературы приведены самые современные сведения о структуре, ферментной организации, биогенезе лизосом и составляющих их компонентов. Рассматривается роль лизосом и лизосомальных ферментов в процессах эндо- и пиноцитоза, аутофагии, в иммунологических реакциях организма, а также условия, необходимые для нормального протекания всех этих процессов в клетке. Из анализа полученной к настоящему времени информации видна широкая вовлеченность и важная роль ферментного комплекса лизосом в большинстве проявлений жизнедеятельности организма как в норме, так и при воздействии разного рода неблагоприятных факторов, патогенезе многих заболеваний. Поскольку все эти данные получены главным образом при исследованиях, проведенных на высших позвоночных животных и человеке, получение новых знаний о лизосомах и лизосомальных ферментах, особенностях их функционирования у рыб и других гидробионтов представляется очень важным как в теоретическом, так и практическом аспектах.

2. Объекты и методы исследования.

Основными объектами исследований были 22 вида рыб, относящиеся к восьми семействам (осетровые *Acipenseridae*, лососевые *Salmonidae*, сиговые *Coregonidae*, хариусовые *Thymallidae*, щуковые *Esocidae*, карповые *Cyprinidae*, окуневые *Percidae*, тресковые *Gadidae*). Исследованные виды являются наиболее распространенными в пресных водоемах, отличаются образом жизни, характером питания, временем нереста и другими особенностями. Активность ферментов лизосомального аппарата и ряд других биохимических показателей изучали у некоторых гельминтов, паразитирующих на разных стадиях жизненного цикла у рыб (*Eubothrium crassum*, *Diphyllbothrium latum*); у видов, являющихся объектами питания рыб - жаброногого рачка *Artemia salina*, насекомых (слепней родов *Hybomitra*, *Tabanus* и *Chrysops*). Для сравнения использовали амфибий (лягушка травяная), птиц (чечетка обыкновенная, курица) и млекопитающих (белые лабораторные крысы и мыши, кролик, норка, песец, кошка, собака, корова).

Исследованы рыбы, обитающие главным образом в озерах и реках Карелии, а также в бассейне р. Волги, выращиваемые в прудовом хозяйстве ВНПО по рыбоводству (п. Рыбное Московской обл.), рыбхозе «Пара» Рязанской обл., Кубанском рыбопитомнике. Значительная часть экспериментов выполнена на базе карельских рыбозаводов, ПИРО (Мурманская обл.), СевНИИРХа, Петрозаводского госуниверситета. Биохимические показатели определяли на разных стадиях онтогенеза рыб: использовали икру, личинок, молодь разных возрастов и половозрелых особей. Материалы по другим объектам получены при совместных экспедиционных выездах и экспериментальных работах (в зверохозяйствах и на птицефабриках) с ихтиологами, паразитологами, орнитологами, фтизиологами и иммунологами института биологии КНЦ РАН.

Исследования осуществляли на организменном, тканевом, клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. Изучению подвергали различные органы названных животных (печень, почки, селезенку, жабры, мышцы, головной мозг, сыворотку крови).

Гомогенизацию тканей проводили в щадящих условиях, используя тефлоновый гомогенизатор Поттера-Эльвейма, в изотонической среде – 0,25 М растворе сахарозы с 0,001 М ЭДТА, pH 7,4, при температуре 2–4° С (Покровский, Тутельян, 1976). Фракцию лизосом получали методом дифференциального центрифугирования и в градиенте плотности сахарозы по схеме К. Де Дюва в модификации А.А. Покровского и В.А. Тутельяна (1968), используя ультрацентрифуги MSE-50 и VAC-601. Определяли свободную (но связанную с частицами), связанную (осаждающуюся с органеллами при центрифугировании) и общую активность лизосомальных ферментов. Для выявления последней в пробы добавляли неионный детергент тритой X-100.

Изучение температурного оптимума кислых гидролаз у рыб (окунь, плотва, форель), птиц (курица) и млекопитающих (крыса) выявило, что для всех исследованных видов оптимальной является температура инкубации от 36° до 48° С, поэтому определение активности ферментов при сравнительно-эволюционных исследованиях производили при температуре 37°, а в других случаях при 30° С. Для каждого лизосомального фермента был также определен и pH оптимум у изучаемых нами объектов (рис. 1).

Определение активности кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2) проводили по методу Бессей и др. (Bessey et al., 1946), используя в качестве субстрата п-нитрофенилфосфат натрия и по методу Баррета и Хита (1980) со специфичным для лизосомальной формы фермента субстратом

– β-глицерофосфатом, оценивая активность по количеству образовавшегося в результате реакции неорганического фосфора (Каповцова, Odavic, 1969). Активность β-глюкозидазы (КФ 3.2.1.21) выявляли по реакции с п-нитрофенил-β, D-глюкопиранозидом (Покровский и др., 1971), β-галактозидазы (КФ 3.2.1.23) – с п-нитрофенил-β, D-галактопиранозидом, гиалуронидазы (КФ 3.2.1.35) – с гиалуроновой кислотой (Баррет, Хит, 1980). Активность кислых нуклеаз определяли спектрофотометрически: кислой ДНКазы (КФ 3.1.4.6) – по методу А.А. Покровского и А.И. Арчакова (1968), кислой РНКазы (КФ 3.1.4.23) – по методу А.П. Левинского с соавт. (1973); катепсина D – по методу Ансона с гемоглобином (Алексеевко, 1968) и А.А. Покровского в модификации Н.Н. Немовой (1978) с субстратом – 2%-ным раствором альбумина.

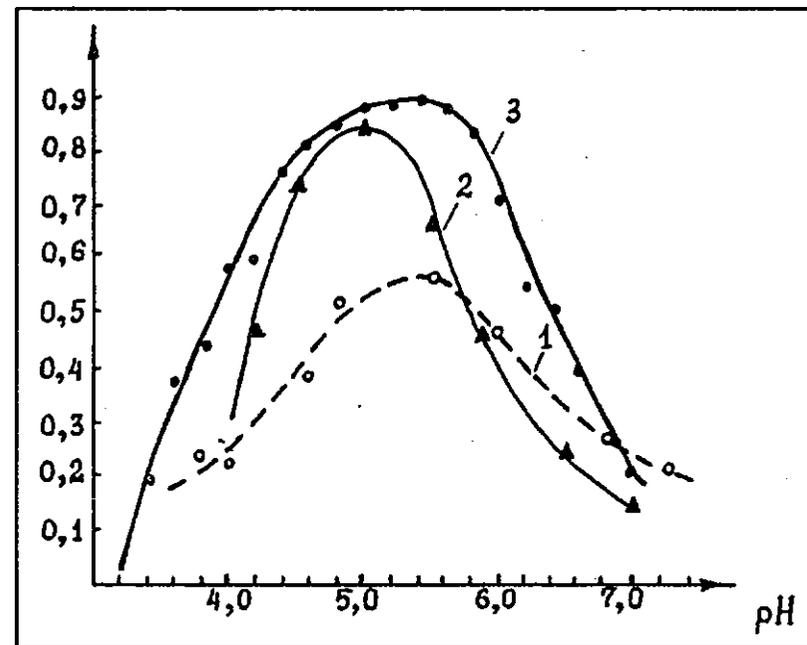


Рис. 1. Оптимальные значения pH среды действия лизосомальных ферментов из печени радужной форели.

1 – ДНКаза, 2 – РНКаза, 3 – кислая фосфатаза.

По оси ординат – активность фермента.

Активность щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) выявляли по расщеплению п-нитрофенилфосфата натрия (Bessey et al., 1946), альдо-

лазную активность (фруктозодифосфатальдолаза, КФ 4.1.2.13) – с использованием фруктозо-1,6-дифосфата в качестве субстрата (Филиппович и др., 1982).

Фракционирование множественных молекулярных форм кислой фосфатазы осуществляли методом ионообменной колоночной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (Руоколайнен и др., 1983) и методом гель-фильтрации на сефадексе G200 (Дэвени, Гергей, 1976) с использованием стандартной аппаратуры фирм LKB и «Fagtasia» (Швеция).

Активность ферментов обмена циклических нуклеотидов – аденилатциклазы (КФ 4.6.1.1) и фосфодиэстеразы цАМФ (КФ 3.1.4.17); гуанилатциклазы (КФ 4.6.1.2.) и фосфодиэстеразы цГМФ (КФ 3.1.4.18) – определяли с использованием радиоактивных субстратов по методам, разработанным для клеток белой крови (Третьяков и др., 1988). Продукты реакций анализировали при помощи тонкослойной хроматографии на пластинках с ДЭАЭ-целлюлозой (Гуркало, Третьяков, 1979).

Фракционный состав гемоглобина исследовали методами ионообменной хроматографии на колонках с ДЕ-32 (Третьяков и др., 1988) и электрофореза в полиакриламидном геле (Маурер, 1971).

Жирные кислоты определяли в виде их метиловых эфиров на газовых хроматографах «Хром-4»; для выделения гликогена из тканей животных использовали метод, описанный А.Н. Смолиным с соавторами (Смолин и др., 1969), количество образовавшейся глюкозы определяли с ортотолуидиновым реактивом; содержание белка в пробах – по методу Лоурн (Lowry et al., 1951) и микробиуретовым методом (Кочетов, 1971).

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами, оценивая достоверность различий по *t* критерию Стьюдента или непараметрическому критерию U Вилкоксона - Манна - Уитни (Гублер, Генкин, 1969; Ивантер, Коросов, 1992).

3. Сравнительно-эволюционные исследования лизосом

Сравнение уровня активности лизосомальных ферментов у разных видов животных. Изучение общей и свободной активности трех лизосомальных гидролаз (в печени, селезенке, сердечной и скелетных мышцах) у 29 видов, представляющих животных различного эволюционного уровня, показало, что активность этих ферментов имеет довольно высокие значения у всех исследованных объектов. В целом, у беспозвоночных активность кислых гидролаз несколько ниже, чем у позво-

ночных, что может быть результатом того, что у первых выявлялся уровень активности в целостном организме, а у позвоночных были взяты на анализ отдельные органы. С другой стороны, более низкая активность лизосомальных ферментов у паразитических плоских червей по сравнению со свободноживущими, объясняется утратой первыми в ходе эволюции пищеварительного канала, их приспособлением поглощать пищу поверхностью тела, в результате чего отпадает надобность в мощном арсенале разнообразных гидролаз (Флоркэн, 1947). Однако всеми исследователями признается важная роль гидролаз у гельминтов и прочих паразитических организмов в процессах инвазии и расщепления тканей хозяина в местах локализации паразита, равно как и в процессах внутриклеточного пищеварения (Varute, Patil, 1972; Reader, 1976; Aikawa, Kilejian, 1979; Шишова-Касаточкина, Леутская, 1979; Сидоров и др., 1989).

Среди позвоночных животных можно выделить высокую активность лизосомальных ферментов у налима, причем не только в печени, где активизация гидролитических ферментов объясняется обычно высокой степенью ее зараженности гельминтами, но и в других органах: в сердце, мышцах, селезенке. Повышенный уровень активности ферментов в органах налима следует, видимо, связать с активизацией метаболизма в преднерестовый период, когда и были взяты на анализ представители этого вида. Из других классов животных такой же уровень активности лизосомальных ферментов определяется у представителя птиц – курицы, а из млекопитающих – у крысы.

В таблице 1 представлены усредненные по сезонам года данные. Следует учитывать, что в зависимости от физиологического состояния, меняющихся экологических условий, циркадных и других ритмов активность лизосомальных ферментов и состояние лизосомальных мембран заметно изменяется (Штраус, 1971; Покровский, Тутьельян, 1976; Brattacharya, 1985; Немова, 1992). Нами показано, что близкие виды, находящиеся в одном физиологическом состоянии, имеют сходные величины активности ферментов (Высоцкая и др., 1978). Наблюдающиеся различия у видов, принадлежащих к одному классу, связаны с их биологическими особенностями. Так, различия в активности гидролаз у двух видов цестод могут объясняться тем, что они взяты из разных хозяев: *Eubothrium crassum* – от холоднокровного (палли), а *Diphyllobothrium* – от теплокровного (песца). Адаптация к среде I порядка, в частности, к ее термическому режиму, накладывает существенный отпечаток на все стороны метаболизма паразита, в том числе и на состояние

используемого в лизисе тканей (или содержимого кишечника) хозяина лизосомального аппарата (Дубовская, Шишова-Касаточкина, 1984; Сидоров и др., 1989; Смирнов, Богдан, 1992). Сопоставляя данные по активности гидролаз у рыб, относящихся к одному семейству, можно сказать, что они близки по значению. Между отдельными семействами больших различий нет, четкой зависимости от расположения вида в эволюционной иерархии и уровнем активности лизосомального аппарата не обнаружено. Следует однако указать, что у осетровых и лососевых активность изученной группы ферментов несколько ниже, чем у представителей более высокоорганизованных рыб.

Для млекопитающих и беспозвоночных характерна более высокая стабильность лизосомальных мембран, так как в большинстве случаев у них отношение свободной активности ферментов к общей составляет меньшую величину, чем у рыб. Этот факт вместе с выявленными различиями в липидном составе лизосомальных мембран из печени разных видов позвоночных (Лизенко и др., 1981), свидетельствует о том, что существуют тонкие различия в структуре лизосом, определяющиеся систематическим положением источника. Однако широкое варьирование активности лизосомальных гидролаз у одного вида рыб в зависимости от внешних и внутренних факторов намного перекрывает различия в уровне одноименных гидролаз у представителей разных таксонов.

Высокий средний уровень активности кислой фосфатазы в печени налима и карпа объясняется еще и тем, что эти виды на определенной стадии годового цикла переходят на эндогенное питание, в этот момент активно функционирует лизосомальный аппарат. Обнаружение высокой активности лизосомальных ферментов у птиц согласуется с известным положением о высокой интенсивности стандартного метаболизма у этого класса позвоночных, что связано, прежде всего, с экологическими особенностями этой группы животных (Озернюк, Булгакова, 1997). А заметно выделяющаяся по уровню кислых гидролаз крыса, характеризуется как вид, обладающий необычайно высокой способностью адаптироваться к самым разнообразным условиям существования.

Активность лизосомальных ферментов в разных тканях рыб.

Немногочисленные исследования, проведенные на рыбах, показали, что распределение активности лизосомальных ферментов по тканям имеет тот же характер, что и у других животных: в большом количестве лизосомы обнаруживаются в тканях, имеющих отношение к фагоцитозу, всасыванию, экскреции и секреции.

Таблица 1

Общая активность лизосомальных ферментов в печени или целостном организме у разных видов животных (на 1 г сырого веса ткани/ мин).

Вид	КФаза, мкМ п-нитрофенола	ДНКаза, ΔE_{260}	РНКаза, ΔE_{260}	n
<i>Eubothrium crassum</i>	2,07±0,04	2,25±0,28	0,56±0,06	6*
<i>Diphyllobothrium latum</i>	1,37±0,13	1,77±0,12	0,75±0,10	5*
<i>Artemia salina</i> , науплии	1,18±0,25	1,17±0,33	0,98±0,13	24*
<i>Hybomitra bimaculata</i>	0,64±0,10	0,54±0,03	1,22±0,09	18*
Осетр	1,29±0,32	2,16±0,48	1,33±0,30	19
Стерлядь	1,10±0,12	1,51±0,28	0,61±0,33	21
Лосось	3,08±0,45	2,00±0,54	1,45±0,30	14
Форель радужная	3,16±0,83	1,26±0,36	1,25±0,38	37
Сиг	2,87±0,79	1,86±0,56	1,16±0,43	33
Пелядь	2,48±0,18	1,15±0,10	0,56±0,03	6
Хариус	2,17±0,11	1,59±0,13	1,08±0,15	8
Щука	3,10±0,28	2,93±0,29	3,57±0,18	10
Плотва	3,70±0,28	1,59±0,47	2,14±0,74	27
Лещ	4,15±0,62	1,19±0,32	1,80±0,37	24
Карп	6,90±1,02	2,09±0,56	1,71±0,39	66
Налим	8,05±1,67	2,08±0,81	0,86±0,29	5
Окунь	3,80±0,77	1,69±0,42	1,75±0,46	42
Судак	4,18±0,37	2,29±0,37	3,16±0,29	6
Ерш	6,99±0,80	-	-	10
Лягушка	1,58±0,37	4,18±0,11	1,86±0,08	8
Чечетка	4,82±0,56	1,28±0,19	0,94±0,06	7
Курица	8,23±0,89	1,65±0,29	1,13±0,20	38
Мышь	3,46±0,69	0,43±0,07	0,35±0,06	12
Крыса	7,52±0,33	1,06±0,15	3,66±0,67	14
Кролик	2,37±0,34	0,53±0,16	1,55±0,30	36
Норка	2,82±0,33	0,20±0,07	0,54±0,17	22
Корова	3,55±0,50	0,58±0,08	0,67±0,13	7
Кошка	3,10±0,23	1,24±0,16	0,99±0,11	6
Собака	2,40±0,32	0,55±0,14	1,33±0,24	5

Примечание. * - число исследованных проб, в каждой из которых в зависимости от размеров было от 3 до 100 экземпляров. В остальных случаях приведено число исследованных животных.

Подробное изучение тканевого распределения активности пяти лизосомальных ферментов у трех видов лососевых рыб (лосося, радужной форели и пеляди) и четырех видов осетровых (русского осетра, стерляди, белуги и севрюги) выявило, что по уровню общей активности лизосомальных ферментов исследованные органы рыб можно разделить на три группы. Самая высокая активность кислой фосфатазы отмечается, как правило, в почках, печени, селезенке, а также в гонадах самцов V стадии зрелости; довольно высока активность этого фермента – в жабрах, сердце, красных мышцах и головном мозге; а в яичниках и скелетной мускулатуре – ниже, чем в других органах. По активности других лизосомальных ферментов распределение будет несколько иным. Отмечены некоторые вариации у разных видов.

К органам, в которых активно происходит аутолиз и перераспределение метаболитических потоков, а также обезвреживание различных чужеродных соединений, прежде всего следует отнести печень, почки, селезенку, жабы (Парк, 1973; Аминева, Яржомбек, 1984). Это соответствует высокому уровню активности лизосомальных ферментов в названных органах лососевых и осетровых рыб. Кроме того, в отсутствие у рыб костного мозга и лимфатических узлов функцию кроветворения у исследованных видов наряду с селезенкой выполняют почки и лейдигов орган, частично поджелудочная железа и кишечник. А в генерируемых этими органами лимфоидных клетках содержится большое число кислых гидролитических ферментов. Еще одной особенностью рыб является то, что селезенка у них, в частности у лососевых, является не только органом кроветворения (включая депонирование до 25 % эритроцитарной массы), но и местом, где осуществляется деструкция старых эритроцитов (Маслова, Тавровская, 1991; Солдатов, 1994, 1998). Этот процесс происходит с участием лизосом.

Особенно высока активность кислых гидролаз в гонадах самцов V стадии зрелости. На более ранних стадиях созревания (II-III) активность этих ферментов в семенниках гораздо ниже. По мере созревания половых продуктов у самцов происходит активный синтез большого количества лизосомальных гидролаз (в том числе гиалуронидазы), которые концентрируются в специфическом органе сперматозоида – акросоме. С помощью этих высокоактивных ферментов производится разрушение защитных структур на поверхности яйцеклетки при оплодотворении (Браше, 1961; Dott, 1973; Morton, 1976; Barrett, Heath, 1977). В яичниках рыб активность изученных ферментов была гораздо ниже, исключение составляло значительное ее увеличение (особенно нуклеаз

в резорбирующей икре осетра по сравнению с уровнем при III-IV стадии зрелости гонад.

Лизосомальные ферменты в процессах гаметогенеза и эмбриогенеза рыб. Данные о роли лизосом и лизосомальных ферментов в процессах гаметогенеза и эмбриогенеза были получены на млекопитающих, птицах, амфибиях, морском еже. Сведений об участии лизосом в этих процессах у рыб очень немного (Немова, 1996). Особый интерес представляют такие данные по ценным промысловым рыбам – осетровым и лососевым, у которых созревание гонад происходит в процессе перестовой миграции на фоне выключенного экзогенного питания. Нами было проведено изучение активности лизосомальных ферментов в тканях озёрного лосося *Salmo salar* L. в процессе созревания гонад от III до V стадии зрелости.

Результаты показали, что общая активность ферментов заметно увеличивалась во всех органах самок лосося, за исключением гонад (табл. 2).

Одновременно происходило снижение содержания в органах рыб белка (до 40 %) и липидов (до 50 %), исключение составляли яичники (Сидоров и др., 1981). Свободная активность лизосомальных гидролаз, также как и отношение свободной активности к общей, практически во всех исследованных органах лососей возрастали. Наблюдающиеся изменения свидетельствуют об активном включении лизосомального аппарата в процессы формирования половых продуктов (желточных гранул и необходимых структур яйцеклетки) за счет эндогенных резервов других тканей. Вовлечение лизосомальных гидролаз в катаболические процессы в разных органах готовых к нересту лососей происходит под влиянием как половых, так и кортикостероидных и других стрессовых гормонов, содержание которых в крови значительно повышено в этот период полового цикла в связи с генетически обусловленным голоданием, происходящим по механизму длительного стресса (Покровский, 1974). Известно, что гормоны надпочечников (у рыб это хромоаффиновые и интерреналовые железы), выделяющиеся при стрессовых состояниях, оказывают лабилизирующее влияние на мембраны лизосом. Выявленная количественная асинхронность увеличения активности каждого лизосомального фермента свидетельствует об индивидуальной регуляции их биосинтеза на генном уровне. Кроме того, возможно, оказывает влияние включение в определенной ситуации активаторов и ингибиторов этих ферментов в клетках той или иной ткани. Повышенный уровень некоторых ферментов (ДНКазы) в зрелых яичниках лососей свидетельствует о

149858к



том, что эти ферменты синтезируются заранее и будут использованы при дальнейшем развитии яйцеклетки.

Таблица 2

Общая активность лизосомальных ферментов в органах и тканях самок лосося шуйского стада (на 1 г сырого веса ткани в 1 мин при 37°)

Орган или ткань	Стадия зрелости гонад	КФаза, мкМ нитрофенола	ДНКаза, ΔE_{260}	РНКаза, ΔE_{260}
Печень	III	3,0±0,3	1,2±0,1	0,8±0,1
»	V	3,0±0,2	2,8±0,6	2,0±0,5
»	-	(0)	(+133)	(+150)
Селезенка	III	2,7±0,2	0,6±0,1	1,7±0,2
»	V	4,3±0,1	2,5±0,5	2,3±0,1
»	-	(+59)	(+317)	(+35)
Почки	III	4,2±0,4	2,9±0,3	1,7±0,1
»	V	4,6±0,5	3,9±0,5	2,1±0,4
»	-	(+10)	(+34)	(+24)
Мышцы красные	III	1,0±0,1	1,9±0,3	0,4±0,1
»	V	1,2±0,1	2,2±0,3	1,1±0,1
»	-	(+20)	(+16)	(+175)
Мышцы белые	III	0,6±0,1	1,0±0,1	0,4±0,1
»	V	0,7±0,1	1,1±0,2	0,6±0,2
»	-	(+17)	(+10)	(+50)
Гонады	III	1,0±0,3	0,9±0,1	0,5±0,1
»	V	0,5±0,1	1,5±0,2	0,3±0,1
»	-	(-50)	(+67)	(-40)

Примечание. В скобках указано изменение активности фермента (ΔA), %.

Лизосомальные ферменты принимают участие в многочисленных морфогенетических преобразованиях, начинающихся в яйцеклетке сразу после оплодотворения (Нейфах, Тимофеева, 1977, 1978). Исследования, проведенные нами на икре сига, радужной форели, семги и нарвской кумжи, показали, что как и у других животных, уровень ферментов в процессе эмбрионального развития подвержен значительным изменениям. Выявлены некоторые видовые отличия в динамике активности лизосомальных ферментов в ходе эмбрионального развития рыб. У сига общая и свободная активность кислых гидролаз несколько возросла сразу после оплодотворения икры и затем от стадии гаструлы до стадии

пигментации глаз изменения были незначительными. Очень резко увеличивался уровень активности лизосомальных ферментов на стадии подвижного эмбриона. Перед вылуплением и у однодневных личинок сохранялся высокий уровень активности изученных ферментов, в несколько раз превышающий таковой на начальных стадиях развития. Несколько иная динамика активности ферментов выявлена у радужной и озерной форели, нарвской кумжи. У этих видов наблюдалось несколько пиков активности кислых гидролаз в ходе эмбриогенеза: на начальной стадии дифференцировки – гаструляции, пигментации глаз и хвостовой почки; второй на стадии дифференцировки непарных плавников и третий на завершающих стадиях эмбрионального развития – «пигментной шапочки» у ладожской форели, перед выклевом эмбриона у других видов. Для разных ферментов отмечено асинхронное максимальное повышение активности: кислой фосфатазы – на ранних, ДНКазы – на более поздних этапах развития. Скачкообразное возрастание активности ферментов находится в полном соответствии с известным положением о неравномерности роста на протяжении раннего онтогенетического развития зародышей и личинок рыб (Рыжков, 1976; Воинова, Дмитриева, 1991).

Известно, что на начальных стадиях развития у рыб синтез белка если и происходит, то очень медленно, в основном, используются белки и нуклеиновые кислоты, запасенные в оогенезе (Нейфах, Тимофеева, 1977). По нашим данным, высокий уровень активности лизосомальных гидролаз отмечается на стадиях органогенеза, когда одни эмбриональные органы подвергаются регрессии, другие закладываются. Реконструкция органов в процессе эмбрионального развития осуществляется при участии лизосом. Клетки органов, выполнивших свою функцию, подвергаются аутофагоцитозу, деградациии во вторичных лизосомах. Составляющие их макромолекулы расщепляются на фрагменты, которые могут быть использованы в качестве исходных материалов для построения новых специфических соединений, необходимых организму на следующей стадии развития. Наряду с гидролизом отработавших макромолекул протеазы, гликозидазы и фосфатазы могут выполнять регуляторную функцию, превращая неактивные предшественники в активные, кроме того, участвовать в обеспечении зародыша энергией. Роль ДНКазы в этот период проявляется в процессах репарации молекул ДНК. Повышение активности лизосомальных ферментов перед выклевом эмбрионов объясняется участием лизосом (в виде так называемых

ферментов вылупления) в расщеплении оболочек яйца перед выходом личинок (Браше, 1961; Тимейко, 1979; Немова, 1996).

Высокий уровень активности ферментов лизосом в раннем постнатальном периоде расценивается как средство адаптации к резко изменяющимся условиям среды (Покровский, Тутельян, 1976; Тутельян, Васильев, 1982). При изменении внешних условий в организме осуществляются приспособительные перестройки обменных процессов. Этим, а также участием в процессах гидролиза питательных компонентов желточного мешка до перехода на внешнее питание, объясняется высокая активность лизосомальных ферментов у личинок рыб. На динамике активности лизосомальных и других ферментов особенности окружающей среды сказываются уже на самых первых этапах жизни личинок и мальков рыб (Manfredi et al., 1969).

4. Влияние экологических факторов на функционирование лизосомального аппарата животных

Участие лизосом в адаптациях рыб к температуре среды. Температура окружающей среды является важнейшим экологическим фактором, оказывающим глубокое влияние как на отдельные физиологические и биохимические процессы, так и на поведенческие реакции на уровне организмов, популяций и сообществ (Шмидт-Нильсен, 1982; Одум, 1986; Кауфман, 1989; Озернюк, 1992). Особое значение имеет температура внешней среды для эктотермных животных.

Изучение реакции лизосомального аппарата молоди карпа на акклимацию к разным температурам показало, что амплитуда и направленность изменения активности лизосомальных ферментов в разных тканях зависела как от вида ткани, так и от начальной температуры акклимации рыб. При долгосрочной (24 дня) и кратковременной (12 час) холодной акклимации активность кислых гидролаз в печени возрастала, а в мышцах заметно снижалась по сравнению с уровнем активности у рыб, акклимированных к температуре 7° С. Известно, что адаптация к холоду приводит к смещению метаболизма в анаболическую сторону, происходит интенсивный синтез белка, повышается содержание ферментов в клетке (Александров, 1975), что и отмечено нами в печени карпов.

Для выявления особенностей в механизмах температурных адаптаций было проведено сравнительное изучение ферментных систем лизосом у разных по экологии рыб – теплолюбивого карпа и холодно-

водной радужной форели. При тепловой акклимации у радужной форели, как и у карпа, активность кислых гидролаз в печени несколько снижалась (табл. 3), а в мышцах, почках и селезенке – возрастала. Направленность в изменении общей активности изученных ферментов в одноименных органах у разных видов была одинаковой.

Таблица 3
Зависимость активности кислой фосфатазы в печени карпа от температуры окружающей среды (акклимация в течение 24 сут).

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

Получены данные, свидетельствующие о том, что кроме количественных изменений в содержании ферментов у рыб при температурных адаптациях происходят сдвиги и в качественном составе отдельных ферментов: у карпа при акклимации к холоду происходит перераспределение активности кислой фосфатазы между множественными молекулярными формами в сторону увеличения активности гетероформы с массой 110 кДа и снижению высокомолекулярной формы массой 300 кДа, а также усиление активности анионных форм фермента.

Особенно велико значение температурного режима для рыб на ранних этапах их развития. Темпы роста молоди атлантического лосося, их способность переходить в миграционное состояние прямо зависят от длительности периода с оптимальными температурами (Шустов, 1983).

В условиях рыбоводного завода было проведено изучение влияния температуры воды в период выдерживания и подращивания личинок лосося на активность фермента-маркера лизосом – кислой фосфатазы. В опытном варианте температуру воды в лотке искусственно повышали с 0,5° до 10-12°, в то время как в контроле она поднималась естественным образом до 4,5°. Показано (табл. 4), что с повышением температуры в сторону оптимальных значений у сеголеток активизировалась работа лизосомального аппарата, а следовательно и защитные функции организма. Более того, продукты расщепления являются материалом для синтеза новых молекул биополимеров. В результате мальки растут быстрее, повышаются их защитные силы, они в меньшей степени подвержены заболеваниям, то есть обеспечивается их лучшая выживаемость.

Таблица 4

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

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

Высокая чувствительность лизосомального аппарата рыб на ранних этапах развития к экстремальным значениям температуры продемонстрирована нами в экспериментах и на других лососевых (нарвской кумже, ладожском лососе и радужной форели).

Сезонная динамика лизосомальных ферментных систем. Вопрос о температурных адаптациях теснейшим образом связан с сезонными колебаниями метаболизма, для пойкилотермов именно температура является ведущим фактором, определяющим ритмичность биологических процессов (Озернюк, 1992). Значительные колебания температуры водоема в течение года сказываются на состоянии кормовой базы рыб, на их пищевой активности (Шустов, 1983), а следовательно, и на интенсивности обмена веществ.

Изучение динамики активности лизосомальных ферментов у пяти видов рыб, находившихся в естественных условиях, показало, что в зимне-весенние месяцы общая их активность в печени рыб в 2 – 4 раза выше, чем в летние (рис. 2). Отмечены сезонные различия и во фракционном составе кислой фосфатазы: в летнее время увеличивалась относительная активность высокомолекулярных и анионных форм фермента. Выявлено также, что зимой синтезируется больше лизосом, а их мембраны обладают иными качествами, чем летом.

Отмеченные факты могут служить указанием на активизацию процессов аутофагии у рыб в зимний период, о переходе организма с понижением температуры на эндогенное питание.

Влияние других экологических факторов на активность лизосомальных ферментов. Важным экологическим фактором, с которым связано удовлетворение энергетических потребностей организма рыб, является наличие кислорода в воде. Потребности в кислороде меняются в

процессе онтогенеза рыб, существенно различаются у представителей разных видов и экологических групп (Рыжков, 1976; Кляшторин, 1982; Столбов и др., 1995, 1996; Polat et al., 1995).

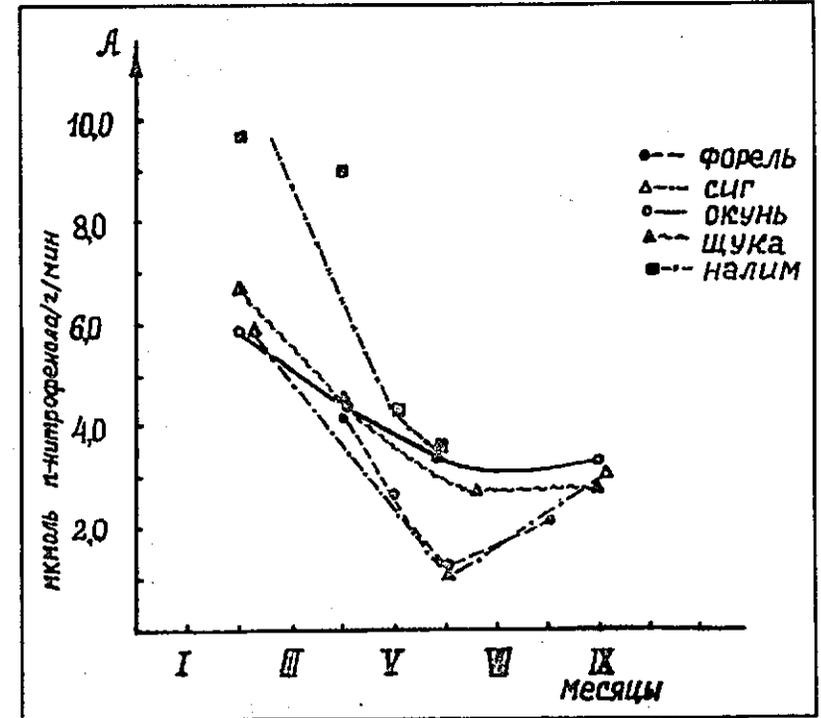


Рис. 2. Сезонная динамика активности кислой фосфатазы в печени рыб.

В наших работах показано влияние этого фактора на активность лизосомальных ферментов у рыб. У молоди карпа наблюдалось возрастание активности кислой фосфатазы и катепсина D в ответ на кратковременную гипоксию и снижение активности лизосомальных ферментов в печени и мышцах рыб, живших в условиях с повышенным содержанием кислорода. Более высокий уровень активности кислой фосфатазы и глюкозидазы был выявлен у годовиков карпа из прудовых хозяйств в вариантах с увеличенной плотностью посадки. Одним из негативных факторов в этой ситуации является дефицит кислорода. О высокой чувствительности к нехватке кислорода говорят и результаты садкового опыта с годовиками радужной форели, которых содержали в различных

акваториях озера, имевших в момент проведения опыта пониженное содержание кислорода. При этом в мышцах рыб в несколько раз увеличивалась активность гликолитического фермента – альдолазы, что говорит о включении при недостатке кислорода компенсаторных анаэробных механизмов производства энергии.

Участие лизосомального аппарата в процессах питания. Важнейшим фактором среды, играющим первостепенную роль в биохимической, морфологической и экологической адаптации видов является пища (Никольский, 1963; Сорвачев, 1982; Одум, 1986). Согласно современной концепции питания усвоение пищи происходит с помощью трех основных: внеклеточного, внутриклеточного и мембранного, и двух дополнительных: индуцированного и симбионтного типов пищеварения (Уголев, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993). В большинстве из названных типов большой или меньший вклад в процессы расщепления компонентов пищи вносит ферментативный аппарат лизосом. Внутриклеточное пищеварение – основная функция лизосом. У простейших и беспозвоночных животных этот механизм ассимиляции пищи является основным. У позвоночных, в том числе и рыб, он имеет большое значение на ранних этапах развития (о чем упоминалось выше), а также в те периоды жизненного цикла, когда обеспечение организма веществом и энергией осуществляется за счет эндогенного питания. В наших исследованиях было показано, что такие объекты питания рыб, как ракообразные, личинки и куколки насекомых, содержат в большом количестве лизосомальные ферменты. Попадая в условия, оптимальные для их действия (кислая среда в желудке хищника), ферменты жертвы осуществляют аутолитическое расщепление своих тканей, то есть в этом случае речь идет об участии лизосом в индуцированном пищеварении. И наконец, в кишечнике рыб, даже при голодании содержатся очень много микроорганизмов, вклад которых в снабжение макроорганизма питательными веществами складывается как за счет работы их ферментных систем (в том числе лизосомальных), так и того, что сами симбионты являются ценным компонентом питания. Таким образом, на разных стадиях онтогенеза и годового цикла гидробионтов в процессы питания, осуществляющиеся с помощью разных сменяющихся и дополняющих друг друга механизмов, вовлекаются лизосомальные гидролазы.

Учитывая важное значение корма для роста, развития и выживаемости рыб, оценивали по биохимическим показателям состояние выращиваемой на рыбозаводе молоди лососей, содержащейся на разных кормах. Исследования показали, что молодь семги тесно реагирует на

характер кормления. При улучшении рационов в организме повышается активность лизосомальных ферментов, мальки быстрее набирают вес, формируется крепкая жизнестойкая молодь.

Лизосомы выполняют важную функцию по поддержанию необходимого уровня метаболизма у голодающих по тем или иным причинам рыб, обладающих в отличие от большинства высших позвоночных способностью длительное время обходиться без экзогенно поступающей пищи, сохраняя при этом высокую активность (Коржуев, 1979). Сравнительное изучение активности лизосомальных ферментов и некоторых других биохимических показателей у рыб при генетически закрепленных формах голодания – нерестовых миграциях у лосося, зимовке у леща и карпа и при вынужденном голодании у радужной форели, карася и других животных (кур, кроликов, норок) показало, что одним из проявлений адаптации на уровне клетки является значительная активация ферментов лизосом и нарушение стабильности их мембран. У птиц и млекопитающих, не приспособленных к длительному голоданию, активация лизосомальных ферментов происходит быстрее и на большую величину, чем у рыб. У последних наблюдается растянутость адаптивных процессов во времени.

При вынужденном голодании у рыб приспособительные реакции со стороны лизосомального аппарата разных органов проявляются в неравномерном повышении активности отдельных ферментов на ранних сроках голодания, затем активность ферментов начинает снижаться. Как правило, на более поздних сроках голодания возрастает активность кислых гидролаз в скелетной мускулатуре.

При генетически закрепленном голодании (нерестовые миграции, зимовки) отмечено своеобразие изменчивости биохимических показателей в зависимости от вида, физиологического состояния, особенностей экологии рыбы. У идущих на нерест лососей во всех тканях резко возрастает активность гидролаз. За счет эндогенного питания происходит обеспечение энергией на движение и одновременно усиливаются процессы катаболизма, направленные на перераспределение веществ для образования гамет. Активация лизосомального аппарата в тканях сеголеток карпа отмечена в начале зимовального периода, на его протяжении наблюдались максимумы активности отдельных ферментов на разных сроках зимовки. В целом же, метаболизм карпа и леща, обеспечиваемый во время зимовки главным образом за счет активной работы внутриклеточных ферментных систем, носит поддерживающий характер.

Выявлена тканевая специфика как в расходовании вещества, так и в степени активации изученных ферментов (рис. 3). Значительное повышение общей и связанной активности лизосомальных ферментов у голодающих рыб может свидетельствовать о синтезе лизосом *de novo*, а наблюдающаяся при этом возрастание свободной активности кислых гидролаз говорит о структурных преобразованиях мембран органелл, их интенсивном вовлечении в процессы аутофагии.

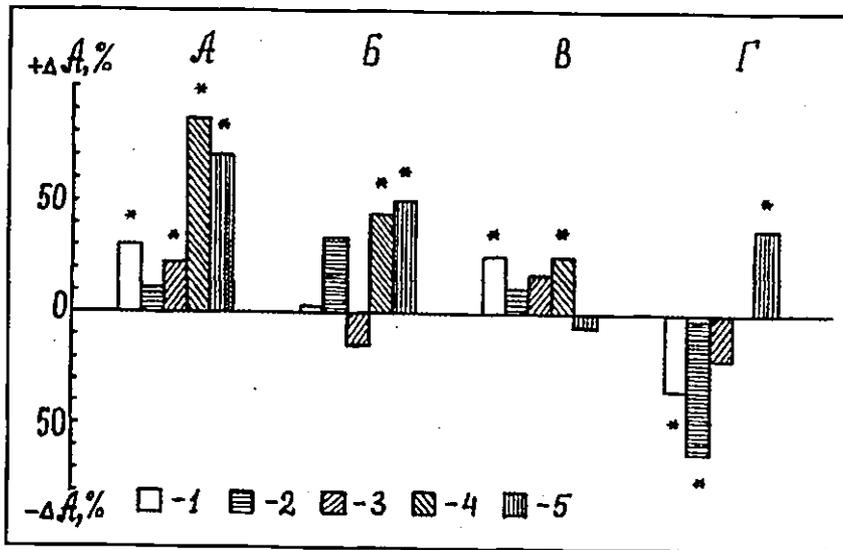


Рис. 3. Изменение активности (ΔA) лизосомальных ферментов в органах леща за время зимовки (в % к уровню в предзимовальный период).

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

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

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

Адаптивные перестройки внутриклеточного метаболизма на молекулярном уровне выражаются в сдвигах активности множественных молекулярных форм ферментов: при вынужденном голодании у форели наблюдалось повышение относительной активности гетероформы кислой фосфатазы с молекулярной массой 100 кДа, а в процессе зимовки у карпа увеличивалась активность высокомолекулярной (300 кДа) формы этого фермента.

Выработанная в процессе эволюции способность многих видов рыб в определенные периоды переключать метаболизм на эндогенные источники пластического и энергетического материала позволила им в конкурентной борьбе за выживание занять подходящую экологическую нишу и в конечном счете обеспечить сохранение вида. Важнейшая роль в перераспределении питательных веществ и обеспечении необходимого уровня обменных процессов в этот период принадлежит лизосомальному аппарату клетки.

5. Влияние некоторых токсикантов на функционирование лизосомального аппарата рыб и других животных

Во многих исследованиях, проведенных на теплокровных, было показано, что в развитии патологических процессов, детоксикации ядов активное участие принимают лизосомы. Любые чужеродные вещества, попав в клетку захватываются лизосомами, им отводится одна из ведущих ролей в механизмах клеточной защиты. Этот подход применен нами при исследованиях по влиянию сточных вод целлюлозно-бумажного комбината (ЦБК) на лизосомальный аппарат рыб. В опытах *in vivo* (садковые и аквариальные эксперименты) было показано, что стоки ЦБК и основные их компоненты (сульфатный щелок, смоляные кислоты, фенол) являются токсичными для рыб. Характер изменения активности лизосомальных ферментов в органах рыб, подвергавшихся воздействию испытанных веществ, зависел от концентрации действующего агента и времени выдерживания рыб в условиях опыта, но в целом, напоминал кривую изменения функций при адаптационном синдроме Селье. Инкубация изолированных (выделенных из тканей) лизосом с различными концентрациями названных химических веществ позволила установить их мембранотропные свойства. Сравнительное изучение свободной, связанной и общей активности ферментов при воздействии сульфатного щелока, а также входящих в его состав фенола и абietиновой кислоты, оказывают лабильзирующее действие на мембрану лизосом и способствуют выходу ферментов из частиц (рис. 4). В то же время токсикант, вероятно, взаимодействует непосредственно с молекулами высвобождающихся из лизосом ферментов, изменяет их каталитические свойства. Об этом можно судить по снижению активности лизосомальных ферментов в вариантах с высокими концентрациями действующих агентов и по результатам прямых опытов по влиянию токсикантов на экстракт ферментов. Разные лизосомальные гидролазы неодинаково реагировали

на действие испытанных в опытах веществ: по мере роста концентрации фенола в среде инкубации активность кислой фосфатазы угнеталась, а кислых нуклеаз – возрастала. Кроме того, под влиянием исследованных химических агентов выявлены сдвиги в активности множественных молекулярных форм некоторых ферментов. Показана разная чувствительность к токсикантам у разных видов рыб, на разных стадиях онтогенеза, в зависимости от сезона года.

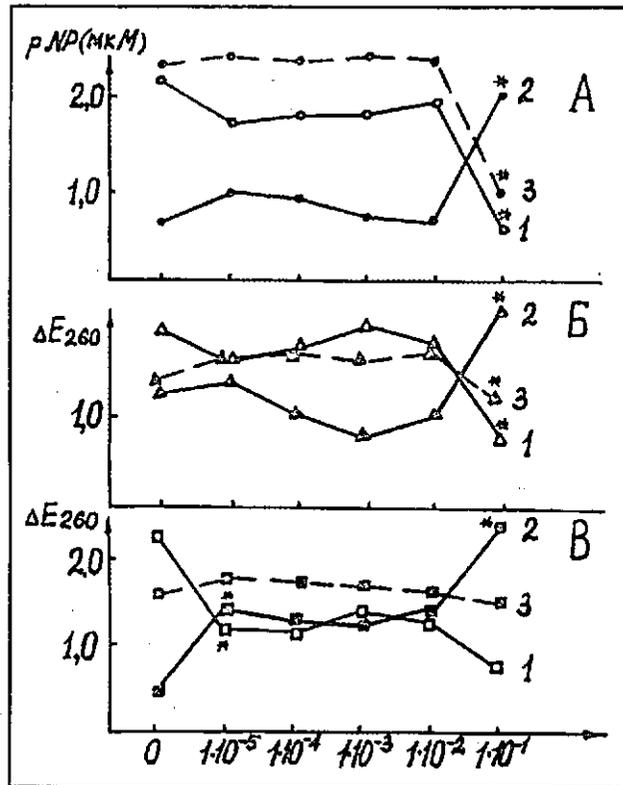


Рис. 4. Изменение свободной (1), связанной (2) и общей (3) активности ферментов из печени радужной форели под влиянием абиегиновой кислоты.

А – кислая фосфатаза, Б – ДНКаза, В – РНКаза. По оси абсцисс концентрация абиегиновой кислоты в М.

* – различия по сравнению с контролем достоверны при $p \leq 0,05$, число опытов – 13.

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

В диссертации приводятся материалы по влиянию на лизосомальный аппарат рыб различных распространенных загрязняющих веществ: природных (желчные кислоты) и синтетических детергентов, флотореагентов, органических и неорганических веществ, используемых в самых различных производствах; тяжелых (Pb, Zn, Co, Ni, Cu, Mo) и легких (K) металлов, металлоидов (Te, Se) в сочетании с разнообразными анионами (нитратами, нитритами, фосфатами, сульфатами, карбонатами, бикарбонатами, хлоридами), солей аммония.

Токсикологические эксперименты, проведенные на развивающейся икре рыб (сига, нарвской кумжи, ладожской форели, онежской палии, радужной форели, лосося) показали, что наиболее чувствительны к воздействию химических веществ зародыши на ранних этапах эмбриогенеза и перед выклевом личинок (рис. 5). Как правило, токсиканты провоцируют активизацию лизосомальных ферментов на более ранних этапах эмбриогенеза, чем это наблюдается в норме.

Разные по химической природе агенты оказывают разное по силе влияние на активность изученных ферментных систем. У рыб от вредного воздействия токсикантов страдают прежде всего почки, печень, жабры, селезенка. В экспериментах отмечена зависимость активности ферментов лизосом и проницаемости лизосомальных мембран от сезона года: в зимне-весенний период наблюдается их лабильность и большая повреждаемость под влиянием различных факторов. Вещества, обладающие детергирующими свойствами, селективно солибилизируют мембранные липиды, содержащие главным образом полиненасыщенные жирные кислоты. В отличие от органических веществ многие ионы металлов (Zn, Co, Ni) способствуют стабилизации лизосомальных мембран. Токсичность металлов усиливается в сочетании с нитрат- и сульфат-ионами.

Под воздействием испытанных химических веществ происходят перестройки и в других ферментных системах: токсиканты вызывают активацию фермента гликолитического ансамбля – альдолазы, а также

щелочной фосфатазы и циклазных систем. – ферментов, регулирующих многие метаболические реакции организма.

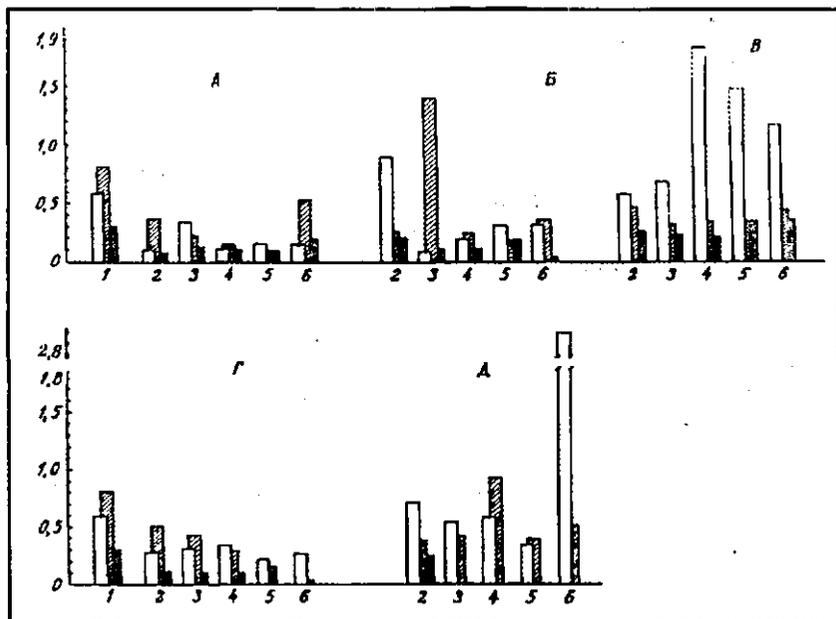


Рис. 5. Изменение активности кислой РНКазы под влиянием различных концентраций (1 – 0, 2 – 10, 3 – 50, 4 – 100, 5 – 500, 6 – 1000 мг/л) калийных солей (А – KNO_3 , Б – K_2SO_4 , В – KCl , Г – K_2CO_3 , Д – $KHCO_3$ на разных стадиях эмбриогенеза радужной форели (□ – гастрюла, ▨ – IV этап органогенеза, ■ – личинки)

Учитывая ключевую роль лизосом в ликвидации очагов повреждения, вызванных ксенобиотиками, предложено использовать определение активности лизосомальных ферментных комплексов в качестве составной части системы эколого-биохимического мониторинга и тестирования природных сред.

6. Изменения в функционировании лизосомального аппарата у животных при заболеваниях разной этнологии

Местом приложения повреждающих факторов в клетке являются белковые рецепторы и в качестве главнейшего регулятора адаптивных реакций выступает аденилатциклазная система. Опосредованно

через циклические нуклеотиды гормоны действуют на энергетический обмен и, как показано, одними из первых среди других ультраструктур клетки на действие повреждающих факторов отвечают лизосомы. Имеется достаточно сообщений об участии лизосом в стресс-реакции клетки при различных патологиях у высших животных и человека. Биохимические механизмы таких состояний у рыб изучены слабо. В этой главе приведены данные по изменению биохимических показателей при паразитарных инфекциях, некрозе плавников, расслоении мышц и других патологиях.

Нами исследовано изменение ряда биохимических показателей (активность ферментов лизосом и энергетического обмена, содержание белка в тканях) у карася при травматическом стрессе. Сопоставление полученных данных с теми же показателями у длительно голодавших карасей позволило сделать вывод об определенных различиях в функционировании изученных ферментных систем при разных стрессовых состояниях и наличии у рыб широких возможностей приспосабливаться в зависимости от природы стрессора.

Показано, что важное значение при прогнозировании компенсаторных возможностей организма (особенно молоди рыб после зимовки) имеет его изначальное состояние в момент действия раздражителя. Плохо перенесшие зимовку, выращиваемые при неблагоприятных условиях рыбы подвержены различным заболеваниям.

Изучение активности ряда ферментов у карпа и карася при экспериментальном ихтиофтириозе показало значительную вовлеченность лизосомальных гидролаз в развитие патологического процесса, что объясняется важной ролью лизосом в защите клетки от внешних воздействий, в частности, по захвату и обезвреживанию чужеродных частиц и токсинов. Установлена характерная динамика ферментов углеводного обмена и фосфатаз в процессе патогенеза, которая показала, что выраженные адаптивные изменения биохимических показателей у зараженных рыб происходили в начальный момент заражения и в период интенсивного роста паразита.

Выявленный в данных экспериментах фазный характер изменения в функционировании ферментных систем совпадает с кривой изменения функций при стрессовых реакциях и подобен картине метаболических изменений, отмеченных нами при воздействии таких повреждающих факторов, как экстремальные температуры, токсиканты и др. Все это позволяет рассматривать реакцию хозяина на заражение паразитом как общий адаптивный синдром, при котором в качестве стрессора

выступает паразитарный фактор. Приспособительные возможности хозяина, напряженность его иммунитета зависят как от индивидуальных особенностей рыбы, так и от условий окружающей среды.

Активное участие лизосом в развитии патологического процесса показано нами и при заражении карпа культурой *Aeromonas hydrophila*. Результаты экспериментов показали, что резкая активация лизосомального аппарата, лизис и деградация всех структур происходит не только в мышцах, но и в других органах больных рыб.

О глубокой перестройке жизненно важных биохимических систем, выполняющих защитные и регуляторные функции в организме, свидетельствуют результаты изучения ряда биохимических показателей у больных плавниковым некрозом двух- и трехгодовалых лосося. У больной молодежи рыб лизосомы наиболее активны в очаге патологического процесса – спинных плавниках и в органе, ответственном за иммунобиологические реакции – селезенке. Показано достоверное увеличение активности аденилатциклазы и снижение активности фосфодиэстеразы цАМФ в эритроцитах больной молодежи лосося (то есть возрастание в клетках количества цАМФ). Кроме того, выявлено снижение интенсивности гликолиза и изменения физико-химических свойств гемоглобина у больных рыб. Сравнивая полученные данные с собственными и имеющимися в литературе, можно заключить, что подобные изменения происходят у животных под влиянием многих альтертирующих воздействий, поэтому некроз плавников следует признать генерализованным заболеванием, при котором в адаптивные реакции вовлекаются мембранные структуры и органеллы, стоящие в первом ряду механизмов клеточной защиты.

Некоторые тонкие отличия в биохимической картине на фоне, типичном для неспецифических адаптивных реакций, выявлены нами при изучении такого заболевания, как катаракта у заводской молодежи лосося. В то время как в печени и мышцах больных рыб активность кислых гидролаз снижалась, в хрусталике глаза повышалась активность одной из кислых гликозидаз – гиалуронидазы. Система гиалуронидаза – гиалуроновая кислота весьма чувствительна к действию гормонов, в частности, кортикостероидов, содержание которых, как известно, резко изменяется в стрессовых ситуациях.

Гиалуроновая кислота (протеогликаны) может быть основной мишенью гидролитических ферментов при развитии недавно появившейся патологии осетровых, характеризующейся расслоением мышечной ткани и уменьшением прочности оболочки икры. Выявленные изме-

нения в метаболизме больных рыб, такие как активация (в том числе гиалуронидазы в мышцах в несколько раз), а затем снижение активности лизосомальных ферментов, гидролиз фосфорных соединений, снижение биосинтетических процессов, увеличение роли гликолиза в энергообеспечении представляют собой симптомы неспецифического адаптационного синдрома, то есть указывают на то, что осетровые в сложившихся условиях испытывают стресс (табл.5).

Таблица 5

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

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

Характер изменения активности изученных ферментов в жабрах, почках, печени позволяют сделать предположение о том, что одной из возможных причин заболевания является загрязнение воды токсикантами, что соответствует и данным литературы (Лукьяненко, 1990).

ВЫВОДЫ

1. Сравнительное изучение лизосомального аппарата у червей, ракообразных, насекомых, рыб, птиц и млекопитающих выявило довольно высокий уровень активности лизосомальных гидролаз у представителей всех таксонов. Как правило, у беспозвоночных активность изученных ферментов ниже, чем у позвоночных животных. Высокий уровень гидролаз найден в тканях карпа и налима. Из других классов животных на таком же уровне активность у представителя птиц – курицы, а из млекопитающих – у крысы. В классе рыб более низкие значения исследованных показателей у осетровых и лососевых. Широкое варьирование активности ферментов в зависимости от внешних и внутренних факторов значительно перекрывает различия в уровне одноименных гидролаз у представителей разных семейств. Четкой зависимости между уровнем активности ферментов лизосом и филогенетическим положением вида не найдено. Активность лизосомальных ферментов характеризует степень приспособляемости животного к меняющимся условиям среды, способность противостоять повреждающим воздействиям, соответствует образу его жизни и физиологическому состоянию.

2. Значительное повышение активности лизосомальных ферментов по мере созревания гонад во всех органах самок лосося (кроме яичников) и в семенниках самцов V стадии зрелости свидетельствует о непосредственном участии лизосомального аппарата в процессах перераспределения внутриклеточных материалов из других органов для формирования гонад, а также в оплодотворении.

3. Изменение активности лизосомальных ферментов в раннем онтогенезе носит стадийноспецифический характер, при этом возрастание активности гидролаз при переходе на новый этап развития происходит, как правило, скачкообразно. Выявлены некоторые видовые отличия в динамике активности изученных ферментов в ходе эмбриогенеза. Для разных ферментов отмечено асинхронное повышение активности. Кислые гидролазы выполняют важные функции не только в деградации отработавших молекул и структур, но и в регуляции процессов метаболизма, снабжении зародыша энергетическими и пластическими материалами и в других процессах, обеспечивающих нормальное развитие организма.

4. Распределение активности лизосомальных гидролаз в разных органах и тканях рыб определяется спецификой выполняемых органами функций. Наибольшая активность кислых гидролаз выявлена в почках,

печени, селезенке и зрелых гонадах самцов; несколько меньшая – в жабрах, сердце, красных мышцах и головном мозге; самая низкая – в яичниках и скелетной мускулатуре. Отмечена энзиматическая гетерогенность лизосом из разных тканей рыб.

5. Показана важная роль лизосомального аппарата в адаптивных реакциях рыб к изменяющимся абиотическим факторам среды на всех этапах развития. Выявлена тканевая и видовая специфичность компенсаторных изменений метаболизма при температурных и других адаптациях. Полученные данные свидетельствуют о том, что кроме количественных изменений в содержании ферментов при этих преобразованиях происходят сдвиги и в качественном составе отдельных гидролаз – перераспределение активности между множественными молекулярными формами ферментов. Изучение сезонной динамики активности лизосомальных ферментов показало значительное возрастание их общей и свободной активности в зимне-весенние месяцы. Зимой лизосом синтезируется больше, а их мембраны менее стабильны, что свидетельствует об их интенсивном вовлечении в процессы аутофагии.

6. Сравнительное изучение активности лизосомальных ферментов и ряда других биохимических показателей у рыб при генетически закрепленных формах голодания – нерестовых миграциях у лосося, зимовке у леща и карпа и при вынужденном голодании у радужной форели, карася и других животных (кур, кроликов, норок) показало, что у птиц и млекопитающих, неприспособленных к длительному голоданию, активация лизосомальных ферментов происходит быстрее и на большую величину, чем у рыб. При генетически детерминированном голодании отмечено своеобразие изменчивости биохимических показателей в зависимости от вида, физиологического состояния, особенностей экологии рыбы.

7. Лизосомы выполняют ведущую роль в механизмах защиты клетки от воздействия токсикантов. Изменения в активности лизосомальных ферментов и состоянии мембран, возникающие под влиянием различных токсических веществ, зависят от химической природы действующего агента, его концентрации, вида и стадии онтогенеза рыбы, специфичности функций исследуемого органа, сезона года. Органические вещества, входящие в стоки ЦБК, оказывают лабильное, а металлы стабилизирующее воздействие на мембраны лизосом. Наиболее чувствительны (в том числе и их лизосомальный аппарат) к воздействию химических веществ зародыши на ранних этапах эмбриогенеза и перед

выклевом личинок. У рыб наиболее активен в детоксикации ядов лизосомальный аппарат печени, почек, жабр, селезенки.

8. По активности лизосомальных и других исследованных ферментов можно диагностировать состояние предпатологии еще до наступления видимых признаков заболевания. При неспецифических адаптивных реакциях, вызванных разными стресс-факторами, выявляются тонкие различия, определяемые филогенетическим положением рыб, их физиологическим состоянием, силой действующего патогена (интенсивностью инвазии), функциональными и метаболическими особенностями страдающего при патологии органа. Специфичность реакции отражается в динамике отдельных ферментных систем, причем качественные различия могут быть выявлены на начальных фазах лизосомальной реакции.

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

Список использованных обозначений и сокращений

Δ А – изменение активности фермента
цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат
ДНКаза – дезоксирибонуклеаза
РНКаза – рибонуклеаза
КФаза – кислая фосфатаза
ЩФаза – щелочная фосфатаза
кДа – килодальтон
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

Список основных работ по теме диссертации

1. Высоцкая Р.У., Сидоров В.С. О содержании липидов у некоторых гельминтов пресноводных рыб // Паразитология. 1973. Т. 7, № 1. С. 51-57.
2. Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р., Сидоров В.С. Влияние различных концентраций фенола на активность лизосомальных ферментов печени животных // Сравнительная биохимия рыб и их гельминтов. Петрозаводск. 1977. С. 73-77.
3. Высоцкая Р.У., Богдан В.В., Руоколайнен Т.Р. Сравнительное изучение активности лизосомальных ферментов в печени, сердечной и скелетных мышцах некоторых рыб // Сравнительная биохимия рыб и их гельминтов. Петрозаводск. 1977. С. 68-73.
4. Высоцкая Р.У., Сорокина В.В. Активность лизосомальных ферментов у личинок и куколок слепней родов *Tabanus*, *Hybomitra* и *Chrysops* в различные сезоны года // Экологическая биохимия животных. Петрозаводск, 1978. С. 104-109.
5. Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р., Сидоров В.С. Изменение активности кислых гидролаз при действии на изолированные лизосомы рыб сульфатного щелока // Гидробиология Выгозерского водохранилища. Петрозаводск, 1978. С. 156-165.
6. Руоколайнен Т.Р., Высоцкая Р.У., Крупнова М.Ю. Влияние абнетиновой кислоты на изолированные лизосомы рыб // Экспериментальные исследования влияния загрязнителей на водные организмы. Апатиты, 1979. С. 122-127.
7. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., Костылев Ю.В. Активность лизосомальных ферментов у взрослых самок озерного лосося *Salmo salar* L. в период преднерестового созревания // Вопросы ихтиологии. 1980. Т. 20, вып. 4(123). С. 713-718.
8. Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р., Чеченков А.В. Изучение активности кислой фосфатазы у молоди лосося при разных условиях выращивания // Биохимия пресноводных рыб Карелии. Петрозаводск, 1980. С.41-47.
9. Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р., Крупнова М.Ю. Кислые нуклеазы пресноводных рыб // Биохимия пресноводных рыб Карелии. Петрозаводск, 1980. С. 47-52.
10. Высоцкая Р.У., Сидоров В.С. Участие лизосомального аппарата в ответной реакции организма на воздействие антропогенных фак-

торов внешней среды // Сравнительные аспекты биохимии рыб и некоторых других животных. Петрозаводск, 1981. С. 5-18.

11. Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р., Крупнова М.Ю. Лизосомальные ферменты в разных органах и тканях лососевых рыб // Сравнительные аспекты биохимии рыб и некоторых других животных. Петрозаводск, 1981. С. 18-24.

12. Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р., Крупнова М.Ю., Болотников И.А. Лизосомальные ферменты при температурном стрессе у кур // Биохимические и морфологические основы иммунологии птиц. Петрозаводск, 1982. С. 97-103.

13. Руоколайнен Т.Р., Высоцкая Р.У., Сидоров В.С. Влияние смоляных кислот на молекулярную гетерогенность кислой фосфатазы печени форели // Теоретические вопросы биотестирования. Волгоград, 1983. С. 60-64.

14. Высоцкая Р.У., Лялькин В.С. Изменение активности лизосомальных ферментов в процессе развития *Artemia salina* под влиянием постоянного магнитного поля // Сравнительная биохимия водных животных. Петрозаводск, 1983. С. 79-85.

15. Руоколайнен Т.Р., Высоцкая Р.У. Активность лизосомальных ферментов в печени окуня из разных зон Онежского озера // Сравнительная биохимия водных животных. Петрозаводск, 1983. С. 85-92.

16. Высоцкая Р.У., Крупнова М.Ю., Мигаловский И.П., Кошелева В.В. Лизосомальные ферменты в эмбриональном развитии сига // Сравнительная биохимия водных животных. Петрозаводск, 1983. С. 141-145.

17. Крупнова М.Ю., Высоцкая Р.У., Яржомбек А.А. Участие лизосомальных ферментов в температурной адаптации карпов // Материалы по сравнительной физиологии и адаптации животных к абиогенным факторам внешней среды. Ярославль, 1983. С. 30-34.

18. Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р. Сравнительно-эволюционные исследования лизосом // 16-я конф. ФЕБО. Тез. докл. Москва, 1984. С. 245.

19. Высоцкая Р.У., Крупнова М.Ю., Мигаловский И.П. Ферменты лизосом в раннем развитии сига: влияние ионов цинка // Реакция гидробионтов на абиотические воздействия. Ярославль, 1984. С. 54-60.

20. Крупнова М.Ю., Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р. Изменение ферментного профиля лизосом у форели при голодании // Украинский биохим. журн. 1985. Т. 57, № 3. С. 62-65.

21. Высоцкая Р.У., Смирнов Л.П., Ванятинский В.Ф. Влияние инвазии ихтиофтириумом на белковый состав и активность лизосомальных ферментов годовиков карпа // Биохимия молоди пресноводных рыб. Петрозаводск, 1985. С. 40-44.

22. Высоцкая Р.У., Немова Н.Н., Юхименко Л.Н., Щербина Т.В. Лизосомальные ферменты у карпа при бактериальном заражении // Биохимия молоди пресноводных рыб. Петрозаводск, 1985. С. 44-49.

23. Руоколайнен Т.Р., Высоцкая Р.У., Немова Н.Н., Крупнова М.Ю., Рипатти П.О., Сидоров В.С. О возможной роли лизосомального аппарата в механизмах реакции рыб на поверхностно-активные вещества // Экспериментальная водная токсикология. Рига: Зинатне. 1985. Вып. 10. С. 103-109.

24. Яржомбек А.А., Лиманский В.В., Щербина Т.В., Лысенко В.П., Бехина Е.Н., Сидоров В.С., Рипатти П.О., Попова Р.А., Лысенко Е.И., Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Методические указания по диагностике физиологического состояния личинок и сеголеток карпа. Москва, 1986. 34 с.

25. Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р., Сидоров В.С. Исследование активности ферментов лизосом у форели при воздействии смоляных кислот // Гидробиол. журн. 1987. Т. 23, № 4. С. 82 (Реф. Рукописи № 6625-В86, депонированной в ВИНТИ 11.09.86 г.).

26. Высоцкая Р.У., Крупнова М.Ю. Лизосомальные ферменты у карпов, по-разному перенесших зимовку // Биохимия молоди рыб в зимовальный период. Петрозаводск, 1987. С. 36-42.

27. Высоцкая Р.У., Яржомбек А.А. Токсическое воздействие солей аммония на молодь карпов // Биохимия молоди рыб в зимовальный период. Петрозаводск, 1987. С. 95-99.

28. Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р. Биохимическая адаптация к температуре у разных видов рыб // Физиология и биохимия гидробионтов. Ярославль, 1987. С. 6-12.

29. Высоцкая Р.У., Рипатти П.О. Воздействие детергентов на структуру и функционирование лизосом у пресноводных рыб // Физиология и токсикология гидробионтов. Ярославль, 1988. С. 100-106.

30. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У. Природоохранные аспекты экологической биохимии рыб // Природные ресурсы Карелии, их использование и охрана. Петрозаводск, 1988. С. 132-144.

31. Третьяков А.В., Высоцкая Р.У., Груздев А.И., Шустов Ю.А., Смирнов Ю.А., Сидоров В.С. Биохимическая характеристика эритроци-

тов молоди атлантического лосося *Salmo salar* при некрозе плавников // Вопросы ихтиологии. 1988. Т. 28, № 6. С. 1042-1045.

32. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., Смирнов Л.П., Гурьянова С.Д. Сравнительная биохимия гельминтов рыб: Аминокислоты, белки, липиды. Ленинград: Наука, 1989. 152 с.

33. Высоцкая Р.У., Яковлева К.Е., Васильева Т.С., Ломаева Т.А. Некоторые показатели углеводного обмена у животных при голодании // Биохимия экто- и эндотермных организмов. Петрозаводск, 1989. С. 98-104.

34. Высоцкая Р.У. Влияние микроэлементов на лизосомы рыб в раннем онтогенезе // Биохимия экто- и эндотермных организмов. Петрозаводск, 1989. С. 104-111.

35. Высоцкая Р.У., Иванова Р.П., Ломаева Т.А., Зубкович Э.С. Влияние токсикантов различной химической природы на личинок радужной форели // Физиологические аспекты токсикологии гидробионтов. Ярославль, 1989. С. 88-96.

36. Высоцкая Р.У., Ломаева Т.А., Заличева И.Н., Волков И.В. Влияние свинца и цинка на некоторые биохимические показатели радужной форели в процессе эмбриогенеза // Биохимия экто- и эндотермных организмов в норме и при патологии. Петрозаводск, 1990. С. 83-91.

37. Высоцкая Р.У., Шаршавицкий Г.А., Яковлева К.Е., Ломаева Т.А. Некоторые ферменты лизосом и энергетического обмена у кроликов при экспериментальном циррозе печени // Биохимия экто- и эндотермных организмов в норме и при патологии. Петрозаводск, 1990. С. 91-95.

38. Иванова Р.П., Высоцкая Р.У., Куккарина О.И. Исследование дыхания и активности ферментов радужной форели на ранних этапах развития при хроническом воздействии ортофосфата натрия // Биохимия экто- и эндотермных организмов в норме и при патологии. Петрозаводск, 1990. С. 139-145.

39. Высоцкая Р.У., Такшеев С.А., Яковлева К.Е., Ломаева Т.А., Кузьмин Е.В., Васильев А.С. Активность лизосомальных ферментов в органах осетра и стерляди в норме и с расслоением мышц // Физиолого-биохимический статус Волго-Каспийских осетровых в норме и при расслоении мышечной ткани (кумулятивный политоксикоз). Рыбинск, 1990. С. 224-229.

40. Высоцкая Р.У., Румянцев Е.А. Изменение активности некоторых ферментов у заводской молоди семги при заболевании

катарактой // Биохимические особенности болезней рыб. Петрозаводск, 1991. С. 66-71.

41. Высоцкая Р.У., Иешко Е.П., Яковлева К.Е., Сереженко Л.П. Лизосомальная и энергетическая ферментные системы у карася при некоторых патологических состояниях // Биохимические особенности болезней рыб. Петрозаводск, 1991. С. 93-99.

42. Иванова Р.П., Высоцкая Р.У., Гурьянова С.Д., Зубкович Э.С. Изменение физиолого-биохимических показателей радужной форели при хроническом воздействии некоторых токсикантов // Биохимические особенности болезней рыб. Петрозаводск, 1991. С. 126-133.

43. Иешко Е.П., Высоцкая Р.У., Сереженко Л.П. Паразитозооценоз как неспецифический адаптивный синдром // Эколого-популяционный анализ паразитов и кровососущих членистоногих. Петрозаводск, 1991. С. 103-109.

44. Высоцкая Р.У., Михкеева В.С., Кирилков С.Д., Лукин А.А. Активность некоторых ферментов в мышечной ткани сига в зависимости от комбинированного загрязнения водоемов // Вторая Всесоюз. конф. по рыбохозяйственной токсикологии, посвященная проблеме качества воды в России. Тез. докл. Санкт-Петербург, 1991. С. 100-101.

45. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. и др. Эволюционные аспекты эколого-биохимического мониторинга // Биохимические методы в экологических и токсикологических исследованиях. Петрозаводск, 1993. С. 5-35.

46. Высоцкая Р.У., Шустова Н.К., Заличева И.Н. Изменение активности лизосомальных ферментов у личинок онежской палли и радужной форели под влиянием токсикантов // Биохимические методы в экологических и токсикологических исследованиях. Петрозаводск, 1993. С. 63-73.

47. Высоцкая Р.У., Шустова Н.К., Волков И.В. Изучение функционирования некоторых ферментных систем у рыб при оценке экологической ситуации в водоеме // Биохимические методы в экологических и токсикологических исследованиях. Петрозаводск, 1993. С. 73-82.

48. Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р. Об экологической значимости лизосомальных ферментов // Теоретические аспекты экологической биохимии. Петрозаводск, 1994. С. 78-91.

49. Крупнова М.Ю., Высоцкая Р.У., Сидоров В.С. Лизосомальные ферменты при голодании (эколого-физиологический аспект) // Теоретические аспекты экологической биохимии. Петрозаводск, 1994. С. 131-139.

50. Высоцкая Р.У., Лызлова М.В., Юровицкий Ю.Г., Сидоров В.С. Изменение активности лизосомальных ферментов печени рыб при действии экологических факторов // Известия АН / РАН. Сер. биол. 1994. № 4. С. 611-616.

51. Высоцкая Р.У., Сидоров В.С., Ломаева Т.А. Изменения в некоторых ферментных системах норок при добавлении в их рацион белвитамила // Проблемы экологической физиологии пушных зверей. Петрозаводск, 1994. С. 154-164.

52. Высоцкая Р.У., Сорокина В.В., Сидоров В.С. Лизосомальные ферменты в ходе жизненного цикла слепней рода *Hybomitra* // Паразитология. 1995. Т. 29, № 5. С. 83-89.

53. Высоцкая Р.У. Влияние тяжелых металлов, нитратов и нитритов на активность некоторых ферментов молоди осетра // Первый конгресс ихтиологов России. Тез. докл. Москва, 1997. С. 214.

54. Высоцкая Р.У., Стерлигова О.П., Сидоров В.С. Лизосомальные и некоторые другие ферменты в тканях леща *Abramis brama* в период зимовки // Вопросы ихтиологии. 1998. Т. 38, № 2. С. 267-272.

Сдано в производство 25.08.99 г. Формат 60x84¹/₁₆. Печать офсетная.
Уч.-изд л. 2,4. Изд. № 29. Заказ № 114. Тираж 100 экз.

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

149858K