

Отделение биологических наук РАН
Научный Совет по гидробиологии и ихтиологии РАН
Российский фонд фундаментальных исследований
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина
Российской академии наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Тюменский государственный университет»

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИЙ ГИДРОБИОНТОВ**

**МАТЕРИАЛЫ ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ**

**Борок
2012**

Таким образом, выявлена ассоциация биохимических и генетических маркеров с предрасположенностью плотвы и язя к инвазии трематодами. Некоторые аллели ISSR-локусов (р3-4 у плотвы и р2-4, р2-7 и р3-7 у язя) и генотипы изоферментных локусов могут служить маркерами предрасположенности к инвазии описторхидами. Эти маркеры могут быть использованы для прогнозирования изменения напряженности паразитологической ситуации по актуальным трематодозам при изменении состава и структуры популяций рыб.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (госконтракт № П712).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Быховская-Павловская И.Е. Паразитологическое исследование рыб. – Л.: Наука, 1985. 108 с.
2. Бойко Е.Г. Влияние селекционно-генетических и экологических факторов на структуру популяций карповых рыб. Дисс... канд. биол. наук. Тюмень, 1997. 135 с.
3. Жигилева О.Н., Ожирельев В.В., Броль И.С., Пожидаев В.В. Популяционная структура трех видов рыб (Cypriniformes: Cyprinidae), обитающих в реках Обь-Иртышского бассейна, по данным изоферментного анализа // Вопросы ихтиологии, 2010а. Т. 50, № 6. С. 811–820.
4. Жигилева О.Н., Зеновкина Д.В., Ожирельев В.В. Зараженность метацеркариями трематод рыб семейства Карповых из рек Обь-Иртышского бассейна // Вестник Мордовского университета. Серия "Биологич. науки", 2010б. № 1. С. 170-174.
5. Жигилева О.Н. ПЦР-маркеры предрасположенности карповых рыб к трематодной инвазии // Вестник ТюмГУ, 2010. № 7. С. 82–87.
6. Звягина В.В. Структурно-функциональные особенности метацеркарий *Opisthorchis felineus*; оптимизация способов обеззараживания и контроля рыбы, инвазированной личинками возбудителя описторхоза. Автореф. дисс.... канд. биол. наук. Тюмень, 1995. 16 с.
7. Метацеркарии трематод – паразиты пресноводных гидробионтов Центральной России: / В.Е. Судариков и [др.] // Отв. ред. В.И. Фрезе. М.: Наука, 2002. 185 с.
8. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т.3. Паразитические многоклеточные. Ч.2. Л.: Наука, 1987. 583 с.
9. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res., 1990. V. 18. P. 6531–6535.
10. Zietjiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics, 1994. V. 20. P. 176–183.

BIOCHEMICAL AND GENETIC MARKERS FOR RESISTANCE TO TREMATODE INFECTION IN CYPRINID FISH

O.N. Zhigileva

Tyumen State University, Tyumen, Russia

Allozyme and ISSR-PCR markers associated with groups of cyprinid fish, which have increased susceptibility to trematode infestation were identified. Heterozygotes of isozyme loci strongly infected with trematode larvae than homozygotes. Dominant alleles of loci p2-4, p2 and p3-7 in the ide and the recessive allele of locus p3-4 in roach can be used as markers of resistance to the trematode infestation in these fish species.

АДАПТАЦИИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ДВУХЛЕТОК КАРПА В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ РАУНДАПА И ПРОБИОТИКА

Жиденко А.А., Барбухо Е.В., Кривопиша В.В.

Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г. Шевченко,

Чернигов, Украина

E-mail: chgpi@chgpi.cn.ua; zaa2006@ukr.net

В оценке физиолого-биохимического состояния рыб и возможности адаптации в условиях гербицидного загрязнения важную информацию для выявления действия специфического токсического агента дают исследования энергетического обмена в органах карпа в модельных условиях. Одна из основных опасностей воздействия любого ксенобиотика на организм заключается в энергетических затратах на мобилизацию механизмов его

детоксикации. Цель исследования состоит в изучении действия гербицида раундап на параметры энергетического обмена в органах двухлеток карпа и возможность компенсации его негативного действия с помощью пробиотического препарата БПС-44. Действующим веществом глифопина (утала, цидокора, N-фосфонометилглицина) является изопропиламинная соль глифосата. Он был выведен на рынок компанией "Монсанто". Это самый продаваемый в мире гербицид, который в последнее время часто применяется на трансгенных растениях, так как большая их часть имеет устойчивость к этому химикату. В связи с этим эти растения, в частности трансгенная соя, могут переносить большие дозы химиката, не погибая и поэтому содержать остаточные количества токсического раундапа. Как стало известно Biosafety.ru, учёные впервые исследовали механизмы токсического действия четырех различных составов гербицида "Раундап", используя для этого человеческие клетки. Специалисты Университета г. Каена во Франции Нора Бенакур (Nora Benachour) и профессор Жиль-Эрик Сералини (Gilles-Eric Seralini) опубликовали результаты своей работы в американском научном журнале *Chemical Research in Toxicology* 23 декабря 2008 года в статье "Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells". Для исследования были отобраны клетки пуповинной крови новорожденных и определены воздействие на них минимальной дозы состава гербицида "Раундап" (раствор 1 к 100 тысячам и более), это такая пропорция, в которой этот состав уже не является гербицидом. Через несколько часов обнаружилось, что клетки запрограммированы на смерть. Также были выявлены разрушения мембраны и ДНК. Выяснилось, что раундап препятствует клеточному дыханию, поэтому так важно изучить его воздействие на энергетический обмен рыб.

Эксперименты по влиянию раундапа осуществляли в 200-литровых непроточных аквариумах, в которые рыбу размещали из расчета 1 экземпляр на 40л воды (двухлетки карпа) в трех вариантах. Первый – это контроль, второй – действие 2 ПДК (предельно допустимые концентрации) гербицида (0,04мг/дм³); третий – совместное влияние гербицида и пробиотического препарата БПС-44 с титром жизнеспособных клеток $1,25 \times 10^8$ КОЕ (колоний образующих единиц)/л, который добавляли в воду за 1 сутки до внесения глифосата. Бациллярный субтилис БПС-44 был разработан в Институте сельскохозяйственной микробиологии УНААН на основе штамма *Bacillus subtilis-44-p* и активно используется в ветеринарии и медицине для коррекции нарушений физиологических процессов у молодняка крупного рогатого скота (Агеев та ін., 2008). Длительность эксперимента составила 7-14 суток, замену воды проводили каждые два-три дня. Во всех случаях контролировали и поддерживали постоянный гидрохимический режим. Величина рН составила $7,90 \pm 0,27$; содержание кислорода – $5,7 \pm 0,6$ мг/л, температура воды отвечала естественной ($+10 - +12^{\circ}\text{C}$). Для анализа содержания аденилатов (Маляревская и др., 1987) замороженные ткани растирали в порошок, из которого затем делали навески для определения макроэргических соединений, не допуская их размораживания. Для оценки участия АТФ, АДФ, АМФ в метаболической регуляции рассчитывали следующие коэффициенты состояния клетки: аденилатный энергетический заряд (АЭЗ) (Гош, 1985; Ленинджер, 1985):
$$\text{АЭЗ} = \frac{\text{АТФ} + 1/2\text{АДП}}{\text{АТФ} + \text{АДП} + \text{АМФ}}$$
, энергетический фосфатный

потенциал, отношение действующих масс аденилаткиназной реакции $\text{ДМ}_{\text{ак}} = \frac{\text{АТФ} * \text{АМФ}}{[\text{АДП}]^2}$.

Статистично результаты обработаны общепринятыми методами с использованием стандартных компьютерных программ, достоверное расхождение между средними арифметическими величинами определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считали достоверными при * - $P < 0,05$.

Эксперимент проводился ранней весной, соотношение макроэргических соединений по тканям в контрольной группе рыб соответствует раннее полученным результатам: наибольшее количество АТФ – в печени ($4,339 \pm 0,001$ мкмоль/г) и наименьшее – в мозге ($0,877 \pm 0,029$ мкмоль/г). Общая сумма всех аденилатов варьировала в достаточно широких пределах: от $9,026$ мкмоль/г (7 сутки, печенька) до $0,740$ мкмоль/г (14 сутки, мозг) (рис. 1-3). На 14 сутки наблюдается существенное снижение общего содержимого аденилатов: среднее значение составляет $1,165$ мкмоль/г ($0,752$ мкмоль/г в белых мышцах, $2,002$ мкмоль/г в печени и $0,740$ мкмоль/г в мозге). Такое снижение общего содержимого аденилатов в сравнении с 7 сутками может быть объяснено отсутствием кормления рыб в условиях эксперимента.

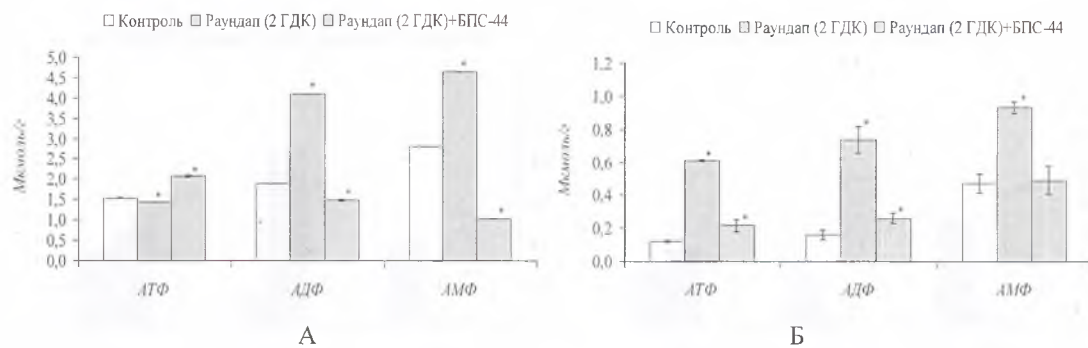


Рис. 1. Содержание аденилатов (мкмоль/г) в белых мышцах карпа в условиях действия раундапа (2 ПДК) и БПС-44 (А — 7 сутки, Б — 14 сутки; $M \pm m$, $n = 6$, * — $P < 0,05$).

Рассмотрим влияние раундапа и совместимое действие гербицида и БПС-44. На 7 сутки во всех исследуемых тканях двухлеток карпа (рис. 1-3) раундап вызвал снижение уровня АТФ, причем наименьшее – в белых мышцах, а наибольшее – в мозге. Что касается содержания АДФ, то здесь показатели неоднозначны: достоверное увеличение в белых мышцах и также достоверное, но снижение – в печени и мозге. Для количественных изменений АМФ характерна тенденция к уменьшению в печени, а в мозге и в белых мышцах – достоверное увеличение данного показателя. Значит, под влиянием раундапа начинается активное расщепление АТФ для обеспечения процессов его детоксикации, особенно в печени карпа.

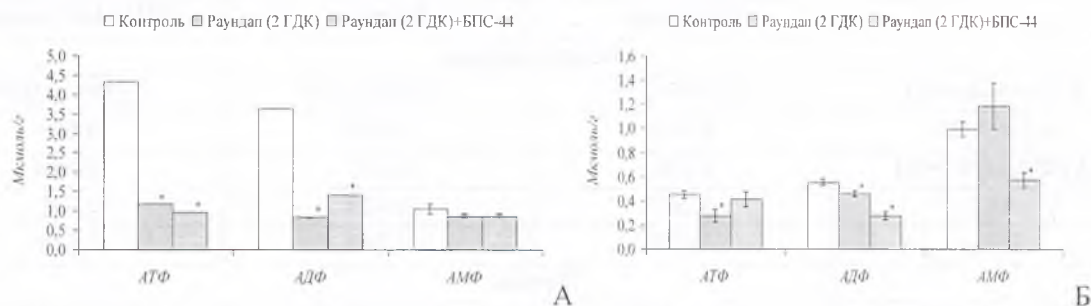


Рис. 2. Содержание аденилатов (мкмоль/г) в печени карпа в условиях действия раундапа (2 ПДК) и БПС-44 (А — 7 сутки, Б — 14 сутки; $M \pm m$, $n = 6$, * — $P < 0,05$).

Этот процесс продолжается и на 14 сутки эксперимента, что подтверждается уменьшением количеств АТФ в 1,6 раза; АДФ – на 21 % и наоборот увеличение АМФ – на 16 %. О наличии негативных тенденций в печени свидетельствует снижение аденилатного энергетического заряда (АЭЗ) на 27,7%, отношения действующих масс АТФ-системы на 53%. Объяснением полученных результатов могут служить гистологические изменения ткани печени – распространение вакуольно-капельной дистрофии, которое приводит к некрозу гепатоцитов и функциональной недостаточности органа. Под влиянием БПС-44 активность протекания энергетического обмена в печени двухлеток карпа возрастает, что подтверждается увеличением отношения АТФ/АДФ в 2 раза, АЭЗ до величины 0,437 и фосфорилированием системы АТФ-АДФ (рост отношения действующих масс АТФ-системы до 0,500) (табл.1). Для белых мышц на 14 сутки действия гербицида характерно достоверное увеличение всех показателей энергетического состояния клетки, особенно содержания АТФ в 5,1 раза, АДФ – в 4,6 раза и АМФ – в 2 раза и только отношение действующих масс аденилаткиназной реакции уменьшается вдвое. Это свидетельствует о замедлении расходования энергетических субстратов в белых мышцах и преобладании процессов катаболизма над реакциями анаболизма, что показано в ранее проведенных исследованиях об ингибировании раундапом реакций анаболизма. Действие пробиотического препарата в белых мышцах карпа приводит на 7 сутки к небольшому, но достоверному увеличению по отношению к контролю содержания АТФ на 25,8% и на 14 сутки на 44,7%. По отношению, же к действию раундапа на 14 сутки происходит снижение всех показателей энергетического обмена или практически близкие их значения. Значит, действие БПС-44 компенсирует влияние раундапа, а биохимические показатели мышечной ткани возвращаются к своему исходному уровню.

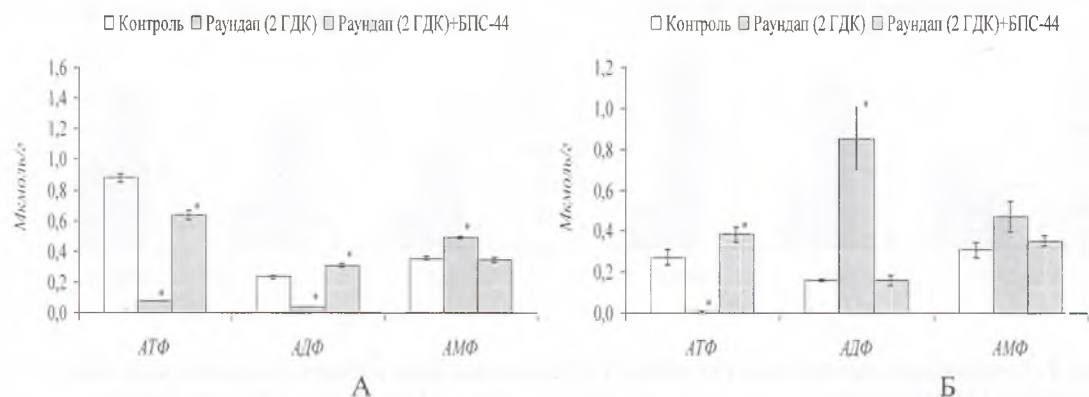


Рис. 3. Содержание аденилатов (мкмоль/г) в мозге карпа в условиях действия раундапа (2 ПДК) и БПС-44 (А — 7 сутки, Б — 14 сутки; $M \pm m$, $n = 6$, * — $P < 0,05$).

Наиболее негативные последствия действия раундапа испытывает на себе мозг двухлеток карпа. Так, уровень АТФ снизился в 30 раз, а количество АДФ увеличилось в 5,3 раза, уровень АМФ вырос – на 34,9%, количество неорганического фосфора на 35%.

Таблица 1. Значение показателей состояния аденилатной системы в тканях карпа

14 сутки			
	Контроль	Раундап	БПС-44+Раундап
Белые мышцы			
P_i (в мкмоль/г)	5,258±0,236	7,740±0,012*	10,350±0,029*
АТФ/АДФ	0,745	0,826	0,831
АТФ/(АДФ × P_i)	0,142	0,107	0,080
АЭЗ	0,267	0,429	0,348
ДМ _{АК}	2,180	1,044	1,558
Печень			
P_i (в мкмоль/г)	5,173±0,085	8,420±0,006*	6,230±0,437*
АТФ/АДФ	1,465	1,560	3,117
АТФ/(АДФ × P_i)	0,283	0,185	0,500
АЭЗ	0,364	0,263	0,437
ДМ _{АК}	1,475	1,560	3,117
Мозг			
P_i (в мкмоль/г)	4,922±0,250	6,640±0,223*	2,746±0,006*
АТФ/АДФ	1,683	0,011	2,418
АТФ/(АДФ × P_i)	0,342	0,002	0,882
АЭЗ	0,475	0,326	0,517
ДМ _{АК}	3,220	0,006	5,386

Такие изменения этих показателей характеризуют активное использование энергии АТФ в мозге, которое также подтверждается резким снижением других параметров, а именно: отношения АТФ/АДФ, отношения действующих масс АТФ-системы, АЭЗ и особенно отношения действующих масс аденилаткиназной реакции. Такие изменения автоматически приведут к повышению скорости переноса электронов и окислительного фосфорилирования, т.е. к усилению регенерации АТФ из АДФ, но в мозге двухлеток карпа питательных субстратов для аэробного ресинтеза АТФ недостаточно, что приведет к разбалансировке аденилатной системы. Действие пробиотика БПС-44 направлено на нормализацию энергетических показателей и снижение скорости катаболических реакций, на что указывает увеличение в 2,6 раза ДМ_{АК}.

Таким образом, действие гербицида раундап на энергетические показатели в различных тканях двухлеток карпа – неоднозначно, особенно на 14 сутки эксперимента. Если в белой

мускулатуре происходит снижение скорости реакций энергетического обмена, то в печени происходит интенсивное расходование макроэргических соединений с целью детоксикации поступающего гербицида. Для мозга характерны наиболее негативные явления, свидетельствующие о разбалансировке аденилатной системы. Использование пробиотического препарата БПС-44 оказывает положительное действие – способствует восстановлению исходных контрольных значений основных параметров энергетического обмена в тканях двухлеток карпа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антиоксидантний та імунний статус молодняку ВРХ за дії пробіотичних препаратів БПС-44 та БПС-Л // [В.О.Агєєв, С.В.Дерев'яноко, Г.М.Дяченко та ін.] // Науковий вісник Львівського націон. університету ветерин. медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького. 2008. Т. 10, №3. Ч. 1.- С. 10-17.
2. Гош Р.И. Энергетический обмен половых клеток и эмбрионов у рыб. / Р.И. Гош К.: Наукова думка, 1985. 146 с.
3. Ленинджер А.Л. Основы биохимии. / А.Л. Ленинджер М.: Мир, 1985. 368 с.
4. Маляревская А.Я. Влияние голодания и различного кормления на обмен макроэргических соединений и белков в белых мышцах карпа / А.Я. Маляревская, Т.И. Билык // Гидробиол. Журн. 1987. 23, № 6. С. 61-66.

ADAPTATIONS OF ENERGY METABOLISM OF CARP YEARLINGS IN THE CONDITIONS OF ACTION OF ROUNDUP AND PROBIOTIC

A.A. Zhidenko, E.V. Barbukho, V.V. Krivopisha

The changes in parameters of energy metabolism of carp yearlings under the action of the herbicide roundup (2 MAC – 0,04 mg/dm³) is examined. The ambiguity of reactions is shown depending on the type of tissue. Application of probiotic preparation BPS-44 has a positive effect – assists renewal of initial control values of basic parameters of energy metabolism in carp yearling's tissue.

СТРУКТУРА ГЕПАТОЦИТА РЫБ КАК ОТРАЖЕНИЕ ПРИСПОСОБЛЕНИЯ ОРГАНИЗМА К УСЛОВИЯМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.

Заботкина Е.А.

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

E-mail: zabel@ibiw.yaroslavl.ru

Печень является уникальной многофункциональной экзо- и эндокринной железой, участвующей в работе и осуществляющей регуляцию работы многих систем организма (Хэм, Кормак, 1983). Основная структурная единица печени – гепатоцит, составляющий до 95% всех клеток печени. Его тонкая структура отражает сложность функциональной нагрузки печени в целом. Пространственная ориентация гепатоцита с разделением структуры апикальных и базальных участков определена способностью клетки секретировать вещества в разных направлениях – как в кровотоки – кровеносные синусы органа, так и желчные протоки, выделяющие секрет в пищеварительный тракт. Структура гепатоцита рыб в общих чертах подобна гепатоциту других позвоночных.

Загрязнение водоемов отходами промышленных и сельскохозяйственных предприятий, рекреационной нагрузки и сбросов неочищенных бытовых стоков создает неблагоприятный фон для обитания гидробионтов, в том числе рыб. Рыбы, как верхнее звено пищевых цепей в экосистемах водоемов, накапливают токсиканты. Печень, как основной орган детоксикации, и гепатоцит, как клетка, осуществляющая ее, часто становятся мишенями для токсикантов, а структура клетки отражает способность органа и организма в целом адаптироваться к действию токсических веществ.

Одной из наиболее часто регистрируемых при действии токсикантов различной природы и загрязнении среды реакций со стороны клеточных органоидов – изменение структуры митохондрий. Оно выражается как в их набухании за счет увеличения объема митохондриального матрикса при одновременном регистрировании его просветления, так и