

ет от 20 до 1,6 мг/мл. Электрофорез в полиакриламидном геле показал в экстракте наличие двух фракций с молекулярной массой 30–60 кДа. При этом препарат, полученный из мороженой печени, практически не отличается по составу от препарата, полученному из сублимированной печени. Образцы, полученные из мороженой и сублимированной печени содержат 40% и 43% белка, соответственно.

В полученных образцах проводили определение антиоксидантной активности с использованием в качестве стандарта сравнения дипептида карнозина. Показано, что антиоксидантная активность образцов, полученных из цельной мороженой и сублимированной печени горбуши в 6,5 и 4,9 раз выше активности карнозина, соответственно.

Известно, что антиоксидантной активностью могут обладать аминокислоты. В препарате из сырой мороженой печени отмечено высокое содержание фосфосерина, пролина, глутаминовой кислоты, аланина, валина и таурина. Определение состава свободных аминокислот в сублимированных экстрактах печени горбуши показало весьма высоко содержание пролина, аланина, лейцина и таурина.

Проведенные исследования показывают возможность использования мороженой и сушеной печени рыб сем. лососевых для получения водорастворимых компонентов, определены оптимальные условия для его получения. Показана высокая антиоксидантная активность полученных водорастворимых образцов, а также наличие в них высокого уровня сульфаминокислоты таурина.

PRACTICAL ASPECTS OF SALMON LIVER BIOTECHNOLOGY

A.I. Chepkasova

«TINRO-Centre», Vladivostok, Russia
chepkasova@tinro.ru

At first time the liver of some salmon fishes was investigated. Shelf life of dried salmon liver and total lipids content and fatty acids composition was determined. Was shown possibility to use frozen and dried salmon's liver for getting of water-soluble ingredients complex, and its optimal conditions getting. Proteins content and its composition before and after chitosan processing was determined. Water-soluble complexes was prepared from frozen and dried salmon liver, with high antioxidant activity. High level of the taurine was showed in the preparations.

ДЕЙСТВИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗУ МОЗГА РЫБ И ЭРИТРОЦИТОВ БЫКА И НЕКОТОРЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ЕЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ

Г.М. Чуйко, П.А. Гдовский, В.А. Подгорная

Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
п. Борок, Ярославская обл., Россия
gko@ibiw.yaroslavl.ru

Одним из проявлений неспецифического действия многих экологических факторов, вызывающих стресс у животных, является образование в клетках свободных радикалов, в том числе активных форм кислорода (АФК). АФК – сильные окислители или крайне реакционно-способные свободные радикалы. Среди основных и наиболее известных форм АФК выделяют супероксид анион-радикал (O_2^-), синглетный кислород (1O_2), гидроксил радикал (OH^\cdot) и перекись водорода (H_2O_2). В силу своей высокой реакционной способности АФК легко вступают в реакции с основными классами биомолекул (белками, липидами, нуклеиновыми кислотами) вследствие чего обладают высокой цитотоксичностью в отношении любых типов клеток и субклеточных структур. Выделяются четыре наиболее вероятные мишени окислительной цитотоксической атаки АКМ: индукция процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах, повреждение мембраносвязанных белков, инактивация ферментов и повреждение ДНК. В результате чего в организме накапливаются продукты взаимодействия

АФК с этими биомолекулами и развивается состояние оксидативного или окислительного стресса (ОС). Для защиты от повреждающего действия АФК на биомолекулы в клетке существует антиоксидантная защитная система (АОС), состоящая из высоко- и низкомолекулярных компонентов. К первым относятся ферменты каталаза, супероксиддисмутаза, пероксидаза и др., ко вторым – глутатион, каротиноиды и др. (Меньщикова и др., 2006). К настоящему времени основные знания в этой области получены главным образом в ходе проведения исследования цитотоксического действия АФК и его механизмов, а также роли АОС в его предотвращении на млекопитающих. Поэтому изучение особенностей данных процессов у других групп животных, включая гидробионтов, являются актуальным.

Цель работы – исследовать влияние одного из АФК – перекиси водорода, на активность фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ; КФ 3.1.1.7) в мозге рыб и оценить некоторые биологические механизмы защиты от этого действия.

Исследования проводились на годовиках карпа (*Cyprinus carpio* L.), выращенных в прудовом хозяйстве института, и 4–5 летках плотвы (*Rutilus rutilus* L), выловленных в летний период в Рыбинском водохранилище. До эксперимента рыб содержали в аквариумах в лабораторных условиях в течение месяца, кормя комбикормом для карповых рыб *ad libitum* раз в сутки. В ходе эксперимента у рыб извлекали мозг, гомогенизировали и центрифугированием получали супернатант, содержащий АХЭ. Для сравнения использовали коммерческий препарат частично очищенной АХЭ из эритроцитов быка. Активность АХЭ определяли методом Элмана (Ellman et al., 1961). Все процедуры и условия анализа подробно описаны ранее (Чуйко и др., 2005). Исследовалось влияние H_2O_2 на активность АХЭ карпа и быка в условиях *in vitro*. В экспериментах на АХЭ плотвы образование АФК генерировалось путем добавления в инкубационную среду вместе с АХЭ (супернатант) $FeSO_4$ и аскорбиновой кислоты (Tsakiris et al., 2000). Для защиты АХЭ от действия АФК использовали коммерческий препарат каталазы (КФ 1.11.1.6), растворы сахарозы (9%) и $MgCl_2$ (20мМ).

Показано, что растворы H_2O_2 в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М и выше практически полностью угнетали активность АХЭ как карпа, так и быка. При уменьшении содержания пероксида водорода в инкубационной среде активность фермента пропорционально возрастала, но степень восстановления активности у двух видов АХЭ различалась. У фермента карпа недействующая концентрация H_2O_2 равнялась $1.5\text{--}2 \cdot 10^{-3}$ М, у быка – $2.5\text{--}5 \cdot 10^{-4}$ М. Более низкое его содержание в среде повышало активность АХЭ карпа на 56%, а у быка – 20% от контроля.

В настоящее время принято считать, что один из механизмов ингибирующего действия АФК на АХЭ заключается в преобразовании третичной структуры белка к частично развернутому состоянию, при котором, однако, сохраняется большинство его вторичных структур. При этом изменяется конфигурация активного центра фермента и его активность падает. Такое состояние ферментного белка получило название «расплавленный шар» (molten globe) (Weiner et al., 1994).

Введение в инкубационную среду каталазы до внесения пероксида водорода (10^{-2} М), снимало ингибирующий эффект полностью и даже активировало АХЭ на 30–40%. Наиболее вероятно это связано с разложением перекиси водорода под действием каталазы и уменьшением ее содержания до концентраций, способных активировать АХЭ.

При генерировании АФК в инкубационной среде с помощью системы $FeSO_4$ + аскорбиновая кислота наблюдалось зависимое от времени экспозиции снижение активности АХЭ плотвы. При максимальном времени (60 мин) инкубации фермента с АФК-генерирующей системой уменьшение его активности достигало 50% от интактного уровня. Введение в инкубационную среду сахарозы и $MgCl_2$, способность которых защищать третичную структуру АХЭ от воздействия АФК известна, показало восстановление активности фермента к концу экспозиции до контрольного уровня.

Таким образом, в ходе исследования установлено, что пероксид водорода оказывает влияние на активность АХЭ и оно носит дозозависимый характер. При концентрациях выше 10^{-3} М у рыб происходит ингибирование активности фермента, а при более низких – активирование. АХЭ рыб в отличие от фермента млекопитающих более чувствительна к действию перекиси водорода. Показано, что ингибирующий эффект АФК на активность АХЭ обусловлен структурно-функциональными нарушениями в третичной структуре ферментного белка.

ACTION OF THE REACTIVE OXYGEN SPECIES UPON ACETYLCHOLINESTERASE OF FISH BRAIN AND BOVINE ERYTHROCYTES AND SOME ELEMENTS OF ITS ANTIOXIDATIVE DEFENSE

G.M. Chuiko, P.A. Gdovskii, V.A. Podgornaya

IBIW RAS, Borok, Russia
gko@ibiw.yaroslavl.ru

The action of the reactive oxygen species (ROS) upon acetylcholinesterase (AChE) activity in brain of fish, common carp *Cyprinus carpio* L. and roach *Rutilus rutilus* L., and bovine erythrocytes is studied. It is shown hydrogen peroxide affects AChE activity in dose depended manner. Enzyme activity is inhibited by hydrogen peroxide in concentrations higher than 10^{-3} M but it is activated by less concentrations. Fish AChE in contrast to bovine enzyme is more sensitive to action of hydrogen peroxide. Inhibiting effect of ROS upon AChE is determined by structure functional alterations in tertiary structure of enzyme protein.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ УГЛЕВОДНОГО И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА У СИГОВ (*COREGONUS LAVARETUS* L.), ОБИТАЮЩИХ В ХВОСТОХРАНИЛИЩЕ ГОРНО-ОБОГАТИТЕЛЬНОГО КОМБИНАТА

М.В. Чурова, О.В. Мещерякова, Н.Н. Немова

Учреждение Российской академии наук Институт биологии Карельского научного центра РАН,
Петрозаводск, Россия
mchurova@yandex.ru

Оценивали влияние сточных вод на состояние сигов *Coregonus lavaretus* L., обитающих в озере Костомукшское, хвостохранилище Костомукшского горно-обогатительного комбината (ГОК). Вода в озере отличается высокой минерализацией, щелочным значением pH, высоким содержанием ионов калия, сульфатов и нитритов, повышенным содержанием тяжелых металлов (Zn, Ni, Cr, Co, Cd, Cu), наличием мелкодисперсной механической взвеси.

Важной составляющей в оценке состояния, роста и развития рыб при изменении условий окружающей среды является исследование их биохимических параметров. Изменения на клеточном и молекулярном уровне, возникающие в организме рыб, происходят на самых ранних этапах негативного воздействия задолго до того, как проявятся изменения на физиологическом, организменном и популяционном уровне. Исследуя уровень экспрессии генов и активность ключевых ферментов энергетического обмена и метаболизма углеводов у рыб при воздействии различных факторов среды можно оценить интенсивность и направление путей энергетического и пластического обмена и выявить механизмы поддержания необходимого уровня метаболического гомеостаза. В оценке состояния и темпов роста рыб в зависимости от влияния различных условий (питание, стресс, чистота водоема) также используется индекс отношения нуклеиновых кислот между собой РНК/ДНК. Он показывает, как меняется уровень клеточной РНК и, соответственно синтез белка, при постоянной концентрации ДНК в клетке. Показатель РНК/ДНК является достаточно чувствительным к различным видам загрязнения водных экосистем.

Определяли уровень экспрессии генов лактатдегидрогеназы изоформы А₄ (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) и цитохромоксидазы (ЦО, КФ 1.9.3.1) определяли в белых мышцах рыб методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Активность ферментов ЛДГ, ЦО, малатдегидрогеназы (МДГ, КФ 1.1.1.37), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ, КФ 1.1.1.49), альдолазы (КФ 4.1.2.13), α-глицерофосфатдегидрогеназы (1-ГФДГ, КФ 1.1.1.8) в белых мышцах и печени определяли спектрофотометрически. Концентрацию РНК и ДНК определяли спектрофотометрически.

Контролем служили сиги, выловленные в чистом озере с аналогичным температурным режимом и глубиной (оз. Каменное). Выборки составили рыбы возраста 3+ и 4+.

Согласно полученным значениям активностей исследуемых ферментов в органах сигов из хвостохранилища наблюдались значительные изменения в метаболизме. Происходило снижение