

На правах рукописи



МОРОЗОВ Дмитрий Николаевич

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЖЕЛЧНЫХ
КИСЛОТ У РЫБ**

Специальность 03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Петрозаводск
2004

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

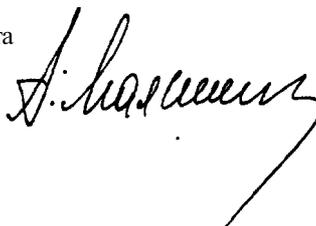
- Научный руководитель: доктор биологических наук
Высоцкая Римма Ульяновна
- Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Шатуновский Михаил Ильич
кандидат биологических наук, доцент
Судакова Надежда Михайловна
- Ведущая организация: Институт биологии внутренних вод
им. И.Д. Папанина РАН

Защита состоится "13" января 2004 года в 14 часов на заседании диссертационного совета КМ 212.087.01 при Карельском государственном педагогическом университете по адресу: 185035, Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 17, ауд. 113 главного корпуса.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Карельского государственного педагогического университета.

Автореферат разослан "10" декабря 2004 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета

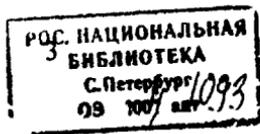


Малкиель А.И.

Актуальность темы. Важнейшими компонентами живой материи являются липиды. В зависимости от выполняемых в организме функций их подразделяют на четыре группы: структурные (или мембранные), запасные, физиологически активные, метаболиты (Сидоров, 1983; Сидоров и др., 1994). К группе физиологически активных веществ липидной природы относятся производные холестерина. Это уникальное по биологической активности соединение поддерживает стабильность клеточных мембран и является предшественником в биосинтезе других стероидов (витаминов, кортикостероидов, половых гормонов, желчных кислот). Со стероидами связана регуляция таких жизненно важных биологических систем, как пищеварительная и репродуктивная.

Желчные кислоты, синтезируемые в печени позвоночных животных, определяют вклад в процесс пищеварения, осуществляя эмульгирование жиров, активацию липаз и других пищеварительных ферментов, способствуют всасыванию жирных кислот (Мосолов и др., 1971; Labourdenne et al., 1997; Pasqualini et al., 2000). Кроме указанной функции, обусловленной особенностями строения указанной молекулы - наличием гидрофобных и гидрофильных участков, они выполняют защитную функцию, проявляющуюся в трех формах - подавлении активности и роста микроорганизмов, детоксикации различных чужеродных веществ и стимуляции иммуногенеза (Ганиткевич, 1980; Ayala-Fierro et al., 1999; Itoh et al., 1999). Сообщается об участии этих соединений в глюконеогенезе, в процессе деления клетки (Sinai et al., 2001; De Fabiani et al., 2003), апоптозе (Benz et al., 2000), синтезе аполипопротеинов (Kardassis et al., 2003). Имеется ряд работ, посвященных действию желчных кислот на лизосомы и лизосомальные ферменты (Попова и др., 1980, 1981; Высоцкая, Рипатти, 1988).

Изучены эволюционные и некоторые другие экологические аспекты вариабельности состава желчных кислот у животных (Haslewood, 1967; Рипатти, Сидоров, 1973; Рипатти, 1975, 1978; Попова и др., 1979, 1980, 1983; Сидоров и др., 1978, 1994; Сидоров, 1983; Зекина и др., 1987; Богдан и др., 2000). Известно широкое разнообразие и филогенетическая определенность желчных кислот (Рипатти, Сидоров, 1983). Основные исследования по вариабельности желчных кислот проведены на млекопитающих и человеке, что связано с медицинской стороной проблемы (Романенко, 1978; Ганиткевич, 1980). В то же время вопрос об особенностях функционирования этих биологически важных веществ у рыб- группы низших позвоночных животных, выделяющейся по видовому разнообразию и условиям обитания, отличающейся своеобразием физиолого-биохимических адаптации на уровне липидов освещен в литературе



недостаточно (Сидоров и др., 1972,1977; Сидоров, 1983). Практически отсутствуют сведения об изменении желчнокислотного статуса у рыб в ходе онтогенеза, в зависимости от физиологического состояния.

Учитывая, что биосинтез желчных кислот и других стероидов, а также детоксикация различного рода ксенобиотиков протекает с участием цитохрома Р-450 (Арчаков, 1975,1983; Мишин, Ляхович, 1985; Shefer et al., 1968; Ahokas et al., 1976; Myant et al., 1977; Gonzalez, 1990; Rocha-e-Silva et al., 2001; Smirlis et al., 2001), несомненный интерес представляет изучение гидроксилазной активности этой монооксигеназной системы у рыб и ее сопоставление с соотношением желчных кислот в желчи в условиях техногенного загрязнения водоема. Это особенно важно в тех случаях, когда рыба используется в качестве тест-объекта при биоиндикации состояния водной среды (Кашулин и др., 1999).

Знания, полученные при детальном исследовании влияния различных факторов среды на показатели обмена липидов стероидного ряда важны для выяснения биохимических механизмов адаптации организмов к условиям существования, они помогут подойти к пониманию вопроса о степени разграничения функций сходным образом устроенных молекул по мере эволюционного совершенствования позвоночных животных, найдут применение при решении практических задач рыбоводства и биотестирования.

Цель и задачи работы. Основной целью настоящей работы являлась качественная и количественная оценка состава желчных кислот и некоторых ферментов их метаболизма у рыб при действии различных факторов окружающей среды.

Были поставлены следующие задачи:

определить качественный и количественный состав желчных кислот различных видов рыб;

изучить вариабельность желчных кислот под влиянием изменяющихся факторов среды (абиотических факторов: солености, закисленности и гумифицированности водоемов; биотических факторов: заражененность гельминтами; антропогенных факторов: действия разнообразных токсикантов; изменения состава пищи; возрастных особенностей);

изучить связь вариабельности желчных кислот с типом питания, физиологическим состоянием организма;

изучить активность некоторых ферментов, участвующих в метаболизме и функционировании желчных кислот.

Научная новизна работы. Оценка влияния ацидности, солености, зараженности гельминтами, комплексного загрязнения, возрастных особенностей,

половых различий на функциональные особенности желчнокислотного состава проводилось впервые. Показана зависимость гидроксилазной активности цитохрома P-450, отдельные формы которого участвуют в метаболизме желчных кислот и ксенобиотиков, от изменения соотношения желчных кислот в желчи рыб при техногенном загрязнении. Продемонстрировано действие такого биотического фактора, как зараженность гельминтами, на изменение соотношения желчных кислот в желчи хозяина. Таким образом, научная новизна работы состоит в установлении связи между действием факторов среды и функциональными особенностями желчных кислот, а также ферментов их метаболизма у представителей группы низших позвоночных животных (рыб). Высказано предположение о механизмах регуляции транспорта и биосинтеза желчных кислот при действии исследуемых факторов.

Практическая значимость работы. Работа является частью исследований, проводимых в лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН в рамках основных направлений исследований Отделения биологических наук РАН (5.15, 5.21) и гранта Президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-894. 2003.4), ФЦП «Интеграция науки и высшего образования России на 2002-2006 годы». Найденные закономерности позволяют прояснить некоторые особенности метаболизма желчных кислот и использовать полученные результаты при разработке систем эколого-биохимического мониторинга водоемов и для оценки физиолого-биохимического состояния водных организмов. Материал используется при чтении курсов «Экологическая биохимия животных» и «Биохимия» для студентов ПетрГУ и КГПУ.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на V международной конференции «Освоение Севера и проблемы природовосстановления» (Сыктывкар, 2001); международной конференции «Биоразнообразие Европейского Севера» (Петрозаводск, 2001); III-ем съезде биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002); международной конференции «Современные проблемы физиологии и экологии морских животных (рыбы, птицы, млекопитающие)» (Ростов-на-Дону, 2002); всероссийской конференции: Современные проблемы водной токсикологии (Борок, 2002); международной конференции: Трофические связи в водных сообществах и экосистемах (Борок, 2003); XV -ой Коми Республиканской молодежной научной конференции (Сыктывкар, 2004); второй международной научной конференции и выставке «Биотехнология - охране окружающей среды» и третьей школе-конференции молодых ученых и студентов «Сохранение биоразнообразия и рациональное использование биологических

ресурсов», (Москва, 2004); международной научной конференции «Основные достижения и перспективы развития паразитологии» (Москва, 2004); международной конференции «Экологические проблемы северных регионов и пути их решения» (Апатиты, 2004); международной научной конференции: Инновации в науке и образовании - 2004, (Калининград, 2004); международной научной конференции «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2004).

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН (особенно вед. биол. Зекиной Л.М., вед.н.с, к.б.н. Рипатти П.О.), сотрудникам института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова за предоставленную возможность прохождения стажировки (д.б.н, Хованских А.Е., к.б.н. Кормилицыну Б.Н.), сотрудникам института промышленной экологии Севера за сотрудничество (д.б.н. Кашулину Н.А, к.б.н. Королевой И.М.). Признателен всем сотрудникам лаборатории экологической биохимии института биологии КарНЦ РАН за постоянную поддержку. Автор от всей души признателен научному руководителю д.б.н. Р.У. Высоцкой за всестороннюю помощь, ценные советы и рекомендации. Благодарю всех сотрудников лаборатории экологической биохимии за постоянную поддержку.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 3 статьи и 13 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 173 страницах машинописного текста, содержит 13 таблиц и 40 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, методической части, пяти глав результатов исследования, заключения, выводов. Список цитируемой литературы включает 332 наименования, из них 232 на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрены общие представления о строении, функциях желчных кислот позвоночных животных, в том числе рыб. Отражены современные представления о путях биосинтеза желчных кислот и ферментов их метаболизма. Делается акцент на значимости в превращении желчных солей и ксенобиотиков различных форм цитохрома P-450, важной неспецифической монооксигеназы. Обобщены уже имеющиеся в литературе данные об особенностях действия различных факторов окружающей среды на биосинтез желчных кислот и обмен липидов рыб.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объектов исследования были использованы 6 видов рыб: навага *Eleginus navaga*, окунь *Perca fluviatilis* L., колюшка трехиглая *Gasterosteus aculeatus*, сиг *Coregonus lavaretus* L., ряпушка *Coregonus albula* L., радужная форель *Parasalmo mykiss* Walb.

Желчь, собранную от свежей рыбы, фиксировали 7-кратным объемом 96° этанола. Для выделения и анализа желчных кислот использовали метод количественного определения состава желчных кислот, разработанный в лаборатории экологической биохимии института биологии КарНЦ РАН П.О. Рипатти и сотр. (Рипатти и др, 1969) для смеси холевой, дезоксихолевой, хенодезоксихолевой и литохолевой кислот, которые являются основными желчными кислотами, встречающимися в желчи человека и животных, в том числе у рыб.

Качественное определение состава желчных кислот проводили методом одномерной тонкослойной хроматографии на стандартных пластинках «Silufol» («Kavalier», ЧССР) в системе растворителей: изоктан - этилацетат - уксусная кислота - бутанол (60:30: 9:9) (Рипатти, 1975). Проявление пятен желчных кислот осуществляли с помощью регентов, содержащих хлорное железо $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Lowty, 1968).

Для метода газожидкостной хроматографии использовали осадок, полученный после выделения свободных желчных кислот. Пробы анализировали в виде метиловых эфиров диазометана на хроматографе Chrom-5 на насадочных стеклянных колонках диаметром 3 мм и длиной 2,4 м с заполненной 5 % фазой OV-17 на хромосорбе WAW 70-80 меш. Скорость потока газо-носителя (гелия) составляла 40-80 мл/мин. Температура колонок равнялась 270 °С. Идентификацию желчных кислот проводили с помощью метчиков и литературных данных по R_f относительно холевой кислоты (Зекина и др., 1987).

Холестерин определяли по методу Илька по реакции с окрашивающим реагентом (Сидоров и др., 1972).

Для оценки гидроксилазной активности микросомального цитохрома P-450 использовали метод, основанный на способности фермента гидроксиллировать субстрат в присутствии кофактора NADPH (Mazel, 1972). В качестве субстрата использовали анилин, который в ходе реакции превращается в парааминофенол и образует устойчивый комплекс с максимумом поглощения при длине волны 630 - 640 нм.

Статистическая обработка всех результатов работы проводилась общепринятым способом (Кокунин, 1975). Достоверность различий между сравниваемыми группами оценивали по непараметрическому критерию

У Уилкоксона-Манна-Уитни (Гублер, Генкин, 1969). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3. СРАВНЕНИЕ ЖЕЛЧНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА У РАЗНЫХ ВИДОВ РЫБ

При сопоставлении значений холатных показателей (отношения концентрации холевой кислоты к общей концентрации желчных кислот в желчи, выраженной в процентах) шести исследуемых рыб (окунь *Perca fluviatilis*, колюшка трехиглая *Gasterosteus aculeatus*, ряпушка европейская *Coregonus albula*, навага *Eleginus navaga*, сиг малотычинковый *Coregonus lavaretus* L, радужная форель *Parasalmo mykiss* Walb.) наблюдается видоспецифичность состава желчных кислот (рис. 1).

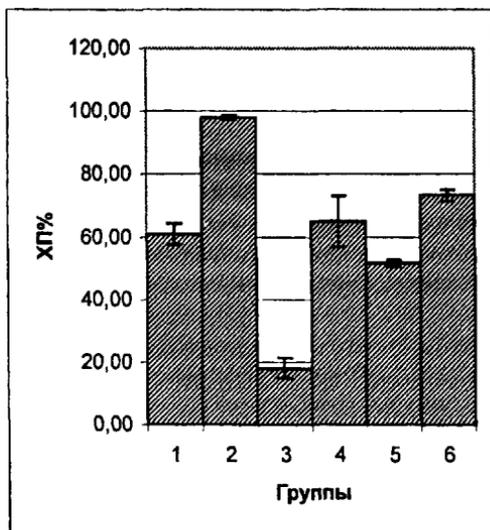


Рис. 1. Холатные показатели желчи разных видов рыб.

1- окунь *Perca fluviatilis*, n=11; 2- колюшка *Gasterosteus aculeatus*, n=5; 3- ряпушка *Coregonus albula*, n=6; 4- навага *Eleginus navaga*, n=10, 5- сиг *Coregonus lavaretus* L, n=10; 6- форель *Parasalmo mykiss* Walb., n=4.

Из литературных данных известно, что чем более разнообразны кормовые объекты, тем ниже холатный показатель и больше его коэффициент варируемости (Рипатти и др., 1977). Это может быть объяснено возрастающими возможностями выбора предпочитаемых кормовых объектов, то есть потреблению меньшего числа видов (Ивлев, 1955). Данная точка зрения подтверждается полученными нами результатами по высокому разбросу холатного показателя желчи наваги, являющейся эврифагом. Аналогичным образом с разнообразием кормовых объектов в пище сига следует связать понижение доли холевой кислоты по сравнению с другими видами.

Заметное понижение величины холатного показателя по сравнению с полученными ранее данными ($87,4 \pm 1,9\%$, Рипатти, 1974) выявлено у ряпушки из оз. Сямозеро, что может быть обусловлено изменениями в структуре популяции рыбы произошедшими к настоящему времени. Конкурентные взаимоотношения с другими видами с неизбежностью сказываются на интенсивности биосинтеза желчных кислот. Более подробно механизм этого взаимодействия будет рассмотрен ниже.

Высокий холатный показатель отмечен в желчи колюшки трехиглой, являющейся хищником, для которой характерно высокое процентное содержание холевой кислоты (Рипатти, 1975, 1978).

При сравнении холатного показателя радужной форели и колюшки трехиглой выявляются близкие процентные соотношения холевой кислоты. Это свидетельствует о том, что в корме радужной форели, выращенной в искусственных условиях, преобладают белковые и липидные компоненты.

Таким образом, согласно проведенному сопоставлению величин холатных показателей, подтверждается влияние характера питания и состава пищи на желчнокислотный состав желчи рыб.

Глава 4. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ РЫБ ПРИ ДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

4.1 Функциональные особенности желчных кислот при действии абиотических факторов

А) Влияние солености воды на желчнокислотный состав желчи рыб

Объектом исследования была навага *Eleginus navaga*, отловленная из различных акваторий Белого моря, характеризующихся неодинаковым уровнем солености.

У наваги из открытого моря, желчнокислотный состав характеризовался низкой концентрацией как холевой, так и хенодезоксихолевой кислот как у самок, так и самцов. В дельте реки Кемь наблюдались более низкие значения этих величин. При сравнении по половому признаку получены достоверные различия между самцами из разных зон (рис. 2).

Выявленные различия в соотношении желчных кислот (холевой к хенодезоксихолевой) можно объяснить влиянием солености непосредственно на состав желчных кислот или опосредовано через кормовую базу.

При исследовании методом газожидкостной хроматографии желчи наваги были обнаружены в следовых количествах литохолевая и дезоксихолевая кислоты (рис.3), что говорит о достаточно высоком разнообразии желчнокислотного состава желчи наваги и преобладании холевой и хенодезоксихолевой кислот в желчи.

Рис. 2. Соотношение желчных кислот желчи наваги из разных зон вылова.

Условные обозначения: 1- самцы, открытое море, $n=5$; 2- самки, открытое море, $n=5$; 3- самцы, устье реки Кемь, $n=5$; 4- самки, устье реки Кемь, $n=6$. Схк (мг/мл) - концентрация холевой кислоты в мг/мл; Схдхк (мг/мл) - концентрация хенодезоксихолевой кислоты в мг/мл; Собщ (мг/мл) - общая концентрация желчных кислот в желчи в мг/мл.

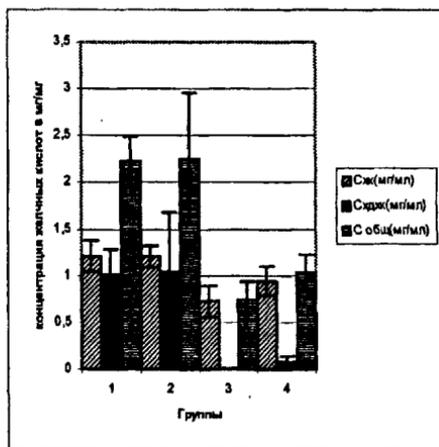
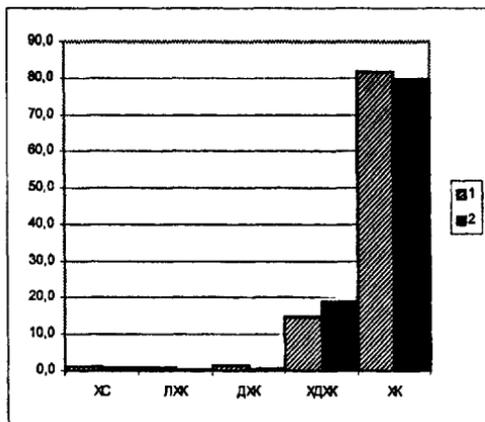


Рис. 3. Данные газожидкостной хроматографии желчи наваги.

Условные обозначения: 1- устье реки Кемь ($n=7$); 2- Открытое море ($n=10$). ХС- холестерин; ЛХК - литохолевая кислота; ДХК - дезоксихолевая кислота; ХДХК - хенодезоксихолевая кислота; ХК - холевая кислота



Резкие изменения уровня солености в дельте реки Кемь существенным образом сказываются на видовом составе пищевых объектов исследуемого вида рыбы, что может привести к существенному сдвигу многих биохимических показателей, в том числе и желчных кислот.

В гипоосмотических условиях у морских организмов снижение концентрации аминокислот приводит к изменению пищевого поведения - активному поиску пищи для компенсации недостатка азотсодержащих соединений (Хлебович, 1981). При интенсивном питании концентрация аминокислот в крови растет, что способствует ингибированию котранспорта желчных кислот в мембране клеток печени поступающими с кровью аминокислотами. Это

приводит к уменьшению накопления их в желчи. Так, хенодезоксихолевая кислота в желчи самцов из устья реки Кемь присутствует в следовых количествах; мало ее и в желчи самок из этой же акватории. Наблюдается уменьшение содержания в желчи холевой кислоты по сравнению с содержанием ее в желчи наваги из открытого моря.

Таким образом, показано, что с уменьшением солености содержание холевой кислоты в желчи наваги падает. Резко уменьшается содержание хенодезоксихолевой кислоты у самцов, что говорит о большей чувствительности этого пола к воздействию пониженной солености. Это свидетельствует о значительном действии в основном на регуляторную и пищеварительную функции желчи, так как уменьшение концентрации желчных кислот, несомненно, скажется на свойствах желчи. Изменения желчнокислотного состава можно рассматривать как биохимическую адаптацию наваги к изменению солености.

Б) Влияние закисленности водоемов на желчнокислотный состав желчи рыб

Для изучения действия рН (кислотности) водоема на желчнокислотный состав желчи рыб исследовалось изменение состава желчи окуня *Perca fluviatilis* L., связанного с ацидификацией озер. Выбор тест-объекта был не случаен. Известно, что при закислении водоемов этот вид исчезает последним, продолжая существовать в озерах, рН которых падает в весенний период до уровня 4.0 (Комов, 1994). Рыбу отлавливали из водоемов отличающихся по трофности, гумификации и значению рН. Оз. Вуонтеленьярви является олиготрофным, полигумозным, с величиной рН воды, равной 5,2; оз. Уросозеро - олиготрофное, ультраолигогумозное, рН 6,4; Кудомская губа оз. Сямозера - мезотрофное, олигогумозное, рН 7,0 - 7,2. Онежское озеро, Петрозаводская губа характеризуется как мезотрофное, олигогумозное, рН 7,0 - 7,2.

Данные исследований выявили, что наиболее высокая концентрация холевой кислоты обнаружена в пузырной желчи окуней из оз. Вуонтеленьярви - 83,17% (процент от общей концентрации желчных кислот), из оз. Уросозеро оно составляло 66,34%, из Кудомской губы оз. Сямозера - 57,15%, а из Петрозаводской губы Онежского озера - 57,99% (рис. 4).

Указанные значения рН и трофности водоемов Онежского озера, оз. Сямозеро, оз. Уросозеро, отличные от озера Вуонтеленьярви, свидетельствуют о том, что окунь в этих озерах не испытывает значительного действия исследуемого фактора (закисленности). Относительно низкие значения холатных показателей могут быть обусловлены более интенсивным питанием по сравнению с озером Вуонтеленьярви. Следует отметить, что соотношение концентраций желчных кислот значительно изменяется именно в желчи окуней из оз. Вуонтеленьярви, интенсивнее

накапливается холевая кислота, хотя хенодезоксихолевая остается на том же уровне, что и во всех других озерах (рис. 4).

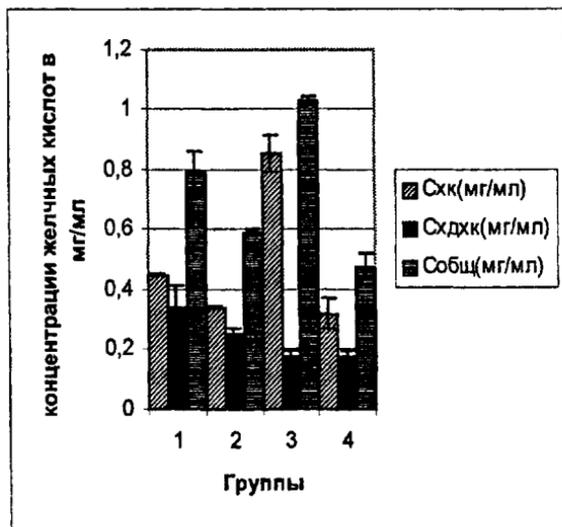


Рис. 4. Соотношение желчных кислот в желчи окуня из разных водоемов.

Условные обозначения: 1- оз. Онежское (Петрозаводская губа), п=4; 2- оз. Сямозеро (Кудомская губа), п=3; 3- оз. Вуонтеленьярви, п=5; 4- оз. Уросозеро, п=4. Схк (мг/мл) - концентрация холевой кислоты; Схдхк (мг/мл) - концентрация хенодезоксихолевой кислоты; Собщ (мг/мл) - общая концентрация желчных кислот в желчи.

По полученным данным можно предположить, что в озере с сильным закислением воды рыба голодала. Содержание холестерина было наибольшим в желчи окуней из оз. Вуонтеленьярви (табл.1).

Таблица 1

Влияние закисленности водоемов на содержание холестерина в желчи окуня *Percafluviatilis L.*

Группы	Схс(мг/мл) M±m
оз. Онежское (Петрозаводская губа), п=5	0,979±0,12214
оз. Сямозеро (Кудомская губа), п=3	0,191±0,00033
оз. Вуонтеленьярви, п=6	2,826±0,48851
оз. Уросозеро, п=5	0,380±0,06008

Условные обозначения к таблице: Схс(мг/мл) - концентрация холестерина в мг/мл. Достоверны различия между всеми группами при $p < 0,05$, кроме между рыбами из оз. Сямозеро и из оз. Уросозеро.

Согласно данным литературы, ацидификация водоема оказывает негативное влияние на рыб (Виноградов и др., 1994; Матей и др., 1994). Кроме того, многочисленными исследователями обнаружено (Wood, McDonald, 1987; Dietrich, Schlatter, 1989; Stripp et al., 1990; Suns, Hitchin, 1990), что понижение pH повышает токсичность тяжелых металлов, в том числе за счет процессов метилирования ртути (Кузубова и др., 1989; Комаровский, 1981; Патин, Морозов, 1981; Мур, Рамамурти, 1987).

Таким образом, при учете характеристик оз. Вуонтеленьярви в данном эксперименте наблюдается воздействие на окуня одновременно трех факторов: низкого pH, загрязнения ртутью и высокого содержания гуминовых кислот. Немаловажной особенностью озер, подвергающихся ацидификации является то, что они слабо минерализованы. Данные факторы значительно влияют на пищеварительную функции желчи. Вполне возможно, что это приводит за счет накопления холевой кислоты к повышению детергирующих способностей желчи и, следовательно, лучшему усвоению пищи в данных неблагоприятных условиях (бедность кормовой базы, повышенная закисленность). Накопление в желчи холевой кислоты и холестерина может быть обусловлено тем, что проницаемость мембран клеток печени к протонам водорода и тяжелым металлам увеличивается, что приводит к изменению липидного состава мембран (Богдан и др., 2002). Это способствует увеличению скорости котранспорта желчных кислот особенно транспортируется холевая кислота, что и приводит к большему накоплению ее в желчи.

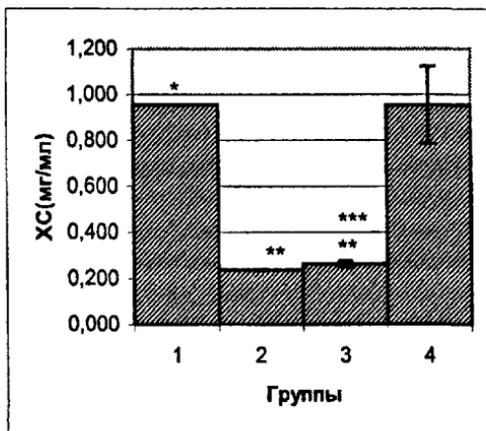
4.2 Функциональные особенности желчных кислот при действии биотических факторов (на примере взаимоотношений паразит-хозяин)

Нами изучены изменения содержания желчных кислот и холестерина в желчи у самцов и самок рыб при заражении цестодой *Schistocephalus solidus*. Объектом изучения воздействия этого биотического фактора была избрана колюшка трехиглая *Gasterosteus aculeatus*, являющаяся промежуточным хозяином *S. solidus* (окончательный хозяин паразита - птицы). Рыбу отлавливали в р. Лососинка методом электролова и до анализа содержали две недели в аквариумах без питания.

При сравнении групп рыб по половому признаку отмечено, что у незараженных самок содержание холевой кислоты выше на 40, 3%, чем у зараженных, а между зараженными и незараженными самцами явного отличия по этому показателю нет. Содержание холестерина в группе незараженных рыб почти вдвое выше у самцов, у зараженных - обратная ситуация, у самок в три раза холестерин выше, чем у самцов, (рис. 5)

Рис. 5. Содержание холестерина в желчи колюшки трехиглой зараженной и незараженной.

Условные обозначения: 1-самки зараженные; 2- самки незараженные; 3- самцы зараженные; 4- самцы незараженные; * - есть достоверные отличия от незараженных самок, $p \leq 0,05$; ** - есть достоверные отличия от незараженных самцов, $p \leq 0,05$; *** - есть достоверные отличия от зараженных самцов, $p < 0,05$.

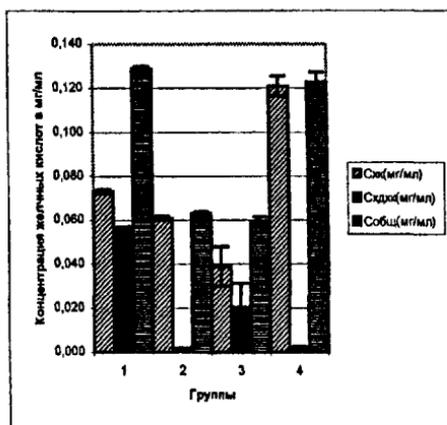


Холестерин и стероидные гормоны, обнаруженные ранее в тканях паразитических червей (Высоцкая, Сидоров, 1973; Шишова-Касаточкина, Леутская, 1979) используются гельминтами для превращения их в нужные ему стероидные соединения.

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что заражение колюшки трехиглой цестодой *Sch solidus* вызывает значительные количественные изменения желчнокислотного состава и холестерина в желчи рыбы. Эти изменения по холатному показателю сильнее выражены у самок, чем у самцов (у зараженных самок концентрация хенодезоксикохлата увеличивается 28 раз по сравнению с незараженными, а у зараженных самцов в 10 раз) (рис. 6).

Рис 6. Соотношение желчных кислот в желчи зараженной и незараженной колюшки трехиглой.

Условные обозначения: 1 - самки зараженные; 2- самки незараженные; 3- самцы зараженные; 4- самцы незараженные. Схк (мг/мл) - концентрация холевой кислоты; Схдхк (мг/мл) - концентрация хенодезоксикохловой кислоты; Собщ (мг/мл) - общая концентрация желчных кислот в желчи.



Наблюдаемое нами у самок повышение концентрации хенодзоксихолата можно связать с улучшением защитных свойств желчных солей. Это способствует лучшему приспособлению этого пола к неблагоприятным условиям и мобилизации резервов организма. По содержанию холестерина значительные различия величин исследуемых биохимических показателей наблюдаются как у самок, так и у самцов. При этом наблюдается инверсия по содержанию данного стероида. Вероятно, причиной обнаруженных изменений являются своеобразная утилизация липидов стероидного ряда паразитом.

4.3 Функциональные особенности желчных кислот рыб при действии антропогенных факторов.

А) Функциональные особенности желчных кислот рыб при техногенном загрязнении водоемов на примере сига Coregonus lavaretus L

В качестве объекта исследования был взят сиг *Coregonus lavaretus L.* из двух различных водоемов: озера Ковдор, загрязняемого стоками горно-обогатительного комбината и озера Нижняя Пиренга, не испытывающего значительной антропогенной нагрузки (условно чистый район). Следует отметить, что в загрязненном водоеме в состав стоков могут входить не только тяжелые металлы, но и органические соединения. Сравнивали реакцию на комплексное загрязнение у самок и самцов. Рыбу брали в осенне-зимний период, что соответствовало началу нереста данного вида и изменению температурного режима водоемов (похолодание).

Обнаружено, что желчнокислотные профили сегов из разных озер не совпадали: у самцов из озера Ковдор наблюдалось преобладание триоксихолановых кислот, а у самок - диоксихолановых. В составе желчных кислот желчи рыб из условно чистого водоема не было отмечено значительных различий между самками и самцами (Рис. 7).

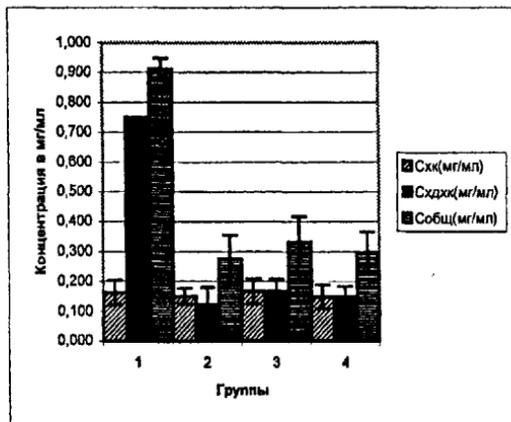


Рис 7. Соотношение желчных кислот в желчи сегов из разных водоемов.

Условные обозначения: 1- самки, Ковдор, п=3; 2- самцы, оз. Ковдор, п=6; 3- самки, оз. Нижняя Пиренга, п=5; 4- самцы, оз. Нижняя Пиренга, п=5. Схк (мг/мл) - концентрация хенодзоксихолата; Сдхк (мг/мл) - концентрация диоксихолата; Собщ (мг/мл) - общая концентрация желчных кислот в желчи.

Проведенная нами тонкослойная хроматография желчи сига выявила наличие холевой кислоты и, судя по распределению, хенодезоксихолевой (Рис.8).

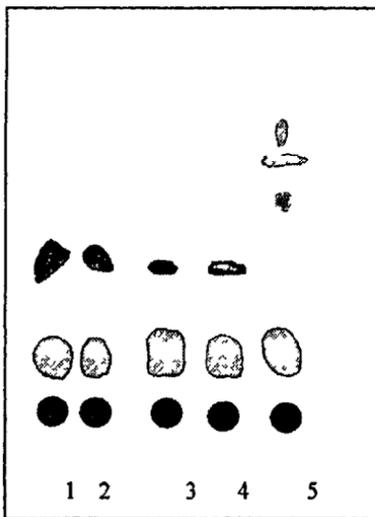


Рис. 8. Тонкослойная хроматография желчи сига.

Условные обозначения 1- оз Ковдор, самцы, 2- Оз Ковдор, самки, 3- Оз Нижняя Пиренга, самцы, 4- оз Нижняя Пиренга, самки, 5- смесь метчиков (холевая кислота, дезоксихолевая кислота, литохолевая кислота, холестерин)

Возникающие различия по желчнокислотному составу между самками и самцами в оз. Ковдор (загрязненной акватории) свидетельствуют о неодинаковой чувствительности представителей разных полов к комплексному загрязнению: самцы сохраняют почти неизменным желчнокислотный состав, в то время как самки значительно уменьшают содержание триоксисолановых желчных кислот, доля хенодезоксихолевой кислоты растет.

В данных условиях адаптация организма к действию комплексного загрязнения привела к изменению соотношения желчных кислот в желчи, что, вполне возможно, связано еще и с детоксикационной ролью желчи - способностью связывать тяжелые металлы и выводить их в виде солей. Для увеличения способности к связыванию с органическими молекулами загрязнителей (молекулярные силы взаимодействия) должно увеличиваться содержание более гидрофобных желчных кислот - в данном случае - хенодезоксихолевой, что и наблюдается у самок из оз. Ковдор. У самцов этот механизм детоксикации не реализован должным образом, что может быть связано с изменением активности ферментов биосинтеза желчных кислот. Возможно, здесь имеет место конкуренция субстратов (ксенобиотиков - органических соединений и эндобиотиков - предшественников желчных кислот) с рецепторами связывания этих видов стероидов. Очевидно, наблюдается отличная

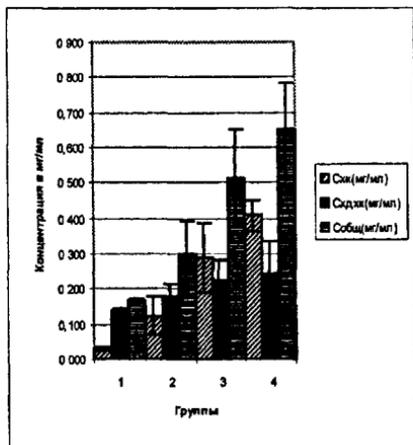
от самок степень родства ксенобиотиков, что и подтверждается данными литературы (Danzo et al., 1997; Guo et al., 2003). В итоге падает концентрация желчных кислот в желчи самцов. Вместе с тем, до конца сама картина остается неясной, так как не понятно, как при этом процессе ведет себя фермент, участвующий как в метаболизме желчных кислот, так и в метаболизме ксенобиотиков (монооксигеназа цитохром Р-450). Поэтому возникает необходимость определить гидроксилазную активность этого фермента.

Таким образом, становится очевидным, что комплексное загрязнение (тяжелые металлы, органические соединения) приводит к проявлению неодинаковой чувствительности самок и самцов к данному виду воздействия. Самцы более чувствительны, в их желчи происходит менее активное накопление солей и комплексов (результатов молекулярного взаимодействия) и имеет место конкуренция ксенобиотиков за места связывания со стероидным ядерным рецептором, то есть, в основном изменяется защитная функция желчи.

Б) Функциональные особенности желчных кислот рыб при техногенном загрязнении водоемов на примере европейской ряпушки *Coregonus albula* (L)

Для сравнения действия комплексного фактора (загрязнения тяжелыми металлами и органическими соединениями на представителей разных видов рыб) была проанализирована европейская ряпушка *Coregonus albula* (L.), выловленная одновременно с сигом из того же водоема.. За условно чистый район была принята ряпушка из оз. Сямозеро (республика Карелия).

Получены различия между исследуемыми группами самок и самцов из оз. Сямозеро. Это можно объяснить их разной интенсивностью питания. Вместе с тем, комплексное загрязнение приводит к значительному повышению концентрации холевой кислоты у самок и у самцов (рис. 9),



что может быть связано с действием данных загрязнителей не только на кормовую базу, но и непосредственно на биосинтез желчных кислот.

Рис. 9. Соотношение желчных кислот в желчи ряпушки *Coregonus albula* (L.) из разных по загрязненности техногенными водами водоемами.

Условные обозначения - 1-оз Сямозеро, самцы, п=4, 2-оз Сямозеро, самки, п=3; 3-оз Ковдор, самцы, п=4, 4-оз Ковдор, самки, п=4.

В данном исследовании реакция на комплексное загрязнение у самок и самцов схожая. Отсутствие выраженности реакции на этот вид загрязнения может быть связано с реализацией ряда защитных механизмов, приводящих к стабилизации значений желчных кислот, оставляя синтез хенодезоксихолевой кислоты и холевой кислоты на высоком уровне.

Однако при подобного рода сравнении необходимо учитывать тот факт, что в сравниваемой группе (контроль) наблюдается низкое процентное содержание холевой кислоты, по сравнению с предшествующими годами (Рипатти, 1974). Аномально низкие концентрации желчных кислот в желчи ряпушки из оз. Сямозеро могут быть следствием воздействия ряда факторов. Это разнообразие кормовые объекты, а также наличие и присутствие чужеродных метаболитов рыб, вступающих в конкурентные взаимоотношения. Последние приводят в ингибированию синтеза желчных кислот, выступая здесь в роли ксенобиотиков.

Сопоставление концентраций желчных кислот в желчи ряпушки из разных мест обитания показало, насколько сильно могут влиять различные факторы на исследуемые биохимические параметры. Исследованное соотношение желчных кислот в желчи рыб из оз. Ковдор является оптимальным для проявления защитных свойств желчи. Однако отсутствие достоверных различий по процентной доле холевой кислоты в желчи между самками и самцами из этой зоны позволяют утверждать, что чувствительность к данному загрязнению обоих полов одинаковая.

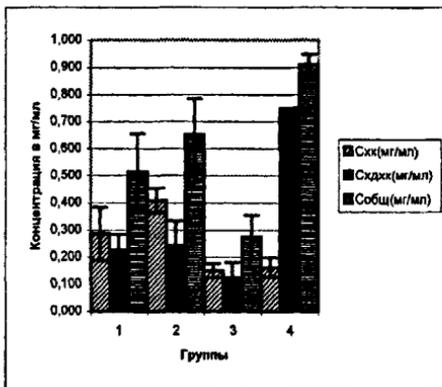
*В) Сопоставление холатных показателей желчи европейской ряпушки *Coregonus albula* L и сига *Coregonus lavaretus* L из одного водоема.*

Для оценки действия комплексного загрязнения на соотношение желчных кислот в желчи различных видов рыб были сопоставлены желчнокислотные профили желчи сига *Coregonus lavaretus* L. и европейской ряпушки *Coregonus*

albula L из одного исследуемого водоема (оз. Ковдор). Обнаружены значительные различия в соотношении желчных кислот между самками и самцами (Рис. 10).

Рис. 10. Соотношение желчных кислот желчи сига и ряпушки из оз. Ковдор.

Условные обозначения: 1- самцы, ряпушка, п=4; 2-самки, ряпушка, п=4; 3-самцы, сиг, п=6; 4-самки, сиг, п=3.



Различия по содержанию холевой и хенодесоксихолевой кислот связаны с разной степенью сродства к ядерным рецепторам ксенобиотиков у сига и ряпушки при конкуренции их за места связывания с предшественниками желчных кислот. Вероятно, что здесь также различаются и детоксикационные свойства желчи, то есть данный фактор неодинаково воздействует на защитные свойства желчи разных видов. Обнаруженное соотношение желчных кислот в желчи исследуемого вида в данных условиях является оптимальным и позволяет говорить о лучшей приспособленности ряпушки, чем сига.

Глава 5. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ РЫБ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Для изучения возрастных изменений желчнокислотного состава и их функций исследовалась ряпушка *Coregonus albula* (L.) из оз. Сямозеро. Использовались сеголетки и двухлетки. Обнаружены значительные изменения в соотношении желчных кислот как между самками и самцами, так и между группами разного возраста (рис. 11).

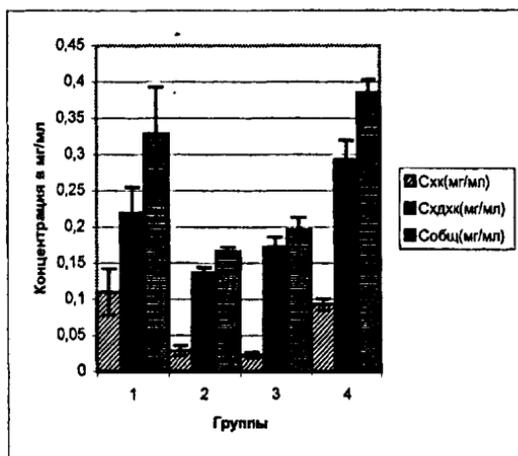


Рис. 11. Соотношение желчных кислот в желчи ряпушки *Coregonus albula* (L.) разного возраста из оз. Сямозеро

Условные обозначения:
 1- самки, сеголетки, $n=7$;
 2- самцы, сеголетки, $n=4$;
 3- самки-двухгодовики, $n=3$;
 4- самцы-двухгодовики, $n=3$.

Наблюдаемые изменения желчнокислотного состава в желчи между сеголетками и двухлетками может быть связано с разной интенсивностью питания и с тем, что данная популяция приспосабливается к новым условиям среды обитания, то есть, неодинаковыми адаптационными возможностями организмов разного возраста и пола.

Следует отметить, что у самок двухгодовиков наблюдается более значительное понижение процентного содержания холевой кислоты

(холатного показателя), чем у самцов того же возраста, что может быть обусловлено более интенсивным питанием первых в связи с подготовкой к репродуктивному периоду. Этот сдвиг в соотношении желчных кислот может привести к изменению детергирующих способностей желчи, что также может сказаться на интенсивности их питания.

Таким образом, при исследовании желчнокислотного состава желчи ряпушки разных возрастов обнаружено, что значительная перестройка обмена веществ на втором году жизни приводят к большему снижению холатного показателя, чем у самок и самцов первого года жизни. Происходит мобилизация ресурсов организма у самок второго года жизни и этот процесс проходит иначе, чем на первом году. Такие изменения желчнокислотного состава могут значительно влиять на пищеварительные и регуляторные свойства желчи.

Глава 6. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ РЫБ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ КОМПОНЕНТОВ ПИЩИ

Для изучения вариабельности желчных кислот и их функций в желчи при изменении состава пищи использовалась радужная форель *Parasalmo mykiss Walb.*, выращенная в искусственных условиях. Сравнивалась форель одинакового возраста (один год) и пола (самки), выращенная в одном из форелевых хозяйств Карелии. В качестве контроля взята рыба, питающаяся искусственными кормовыми смесями, применяемыми в настоящее время в форелеводстве этого региона (корм финской фирмы Rehuraisio). Опытная партия отличалась добавлением жирорастворимых биологически активных веществ, способных улучшить обмен веществ и иммунитет рыб.

У рыб, выращиваемых с добавлением биологически активных добавок, наблюдались существенные изменения в составе желчных кислот желчи: уменьшалась доля холевой и хенодезоксихолевой кислот. Холатный показатель желчи рыб из контрольной группы составлял 74,36%, достоверно отличаясь от ХП желчи рыб из опытной - 62,88% (табл. 2).

Таблица 2

Вариабельность желчнокислотного состава радужной форели *Parasalmo mykiss Walb* при изменении компонентов пищи

Группы	Схк М±m	Схдхк М±m	Собщ М±m	ХП%±m М±m
Контроль, n=4	6,76±0,19	2,47±0,15	9,23±0,05	73,22*1,73
Опыт, n=3	1,28±0,63	0,56±0,23	1,84±0,86	67,25±2,45

Условные обозначения к таблице Схк - концентрация холевой кислоты, мг/мл, Схдхк - концентрация хенодезоксихолевой кислоты, мг/мл, Собщ - общая концентрация желчных кислот, мг/мл

Таким образом, причиной подобного различия между исследуемыми группами в составе желчных кислот являются, главным образом, пища и входящие в ее состав компоненты. Важно отметить, что снижается синтез холевой и хенодезоксихолевой кислот, что может свидетельствовать о конкуренции в ядерном рецепторе за места связывания этого вещества с предшественниками желчных кислот. В этом случае это вещество воспринимается и метаболизируется организмом как ксенобиотик. Важно отметить, что здесь не наблюдается существенного увеличения концентрации хенодезоксихолевой кислоты, как это отмечено у самок сига при исследовании комплексного загрязнения. Это может быть связано с тем, что в данном случае это вещество не так токсично, быстрее и легче утилизируется печенью, не вызывает сильных нарушений обмена веществ. При этом происходят, в основном, изменения пищеварительной функции желчи, а не защитной, как в случае обычных загрязнителей, так как значительного дисбаланса в соотношении холевой и хенодезоксихолевой кислот не наблюдается, что может быть обусловлено малой токсичностью этих компонентов пищи.

Глава 7 ИЗУЧЕНИЕ ГИДРОКСИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМА P-450 МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ РЫБ ПРИ КОМПЛЕКСНОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ

Для выяснения механизма изменения соотношения желчных кислот при действии комплексного загрязнения исследовалась гидроксилазная активность фермента цитохрома P-450 из микросом печени сига *Coregonus lavaretus* L. из водоемов: озера Ковдор, загрязняемого стоками горно-обогатительного комбината и озера Нижняя Пиренга, не испытывающего значительной антропогенной нагрузки (условно чистый район).

Результаты исследований показали, что гидроксилазная активность у сегов из чистой и загрязненной зон была различной. У самок из оз. Ковдор активность составляла 0,00318 мкг парааминофенола /1г сырого веса ткани /мин., у самцов - практически не была выявлена. Напротив, в условно чистом водоеме (Нижняя Пиренга) у самок активность была очень низкой, а у самцов составляла 0,00075 мкг парааминофенола /1г сырого веса ткани /мин., что в 4 раза ниже, чем у самок из загрязненной акватории оз. Ковдор (табл. 3).

Таблица 3

Изучение гидроксилазной активности цитохрома P-450 микросом печени рыб при комплексном загрязнении

Группы	Активность(мкг п-аминофенола/грамм/мин) $M \pm m$ *
Самки, оз. Ковдор, n=5	0,00318 \pm 0,00084
Самцы, оз. Ковдор, n=3	0,0
Самки, оз. Нижняя Пиренга, n=3	0,0
Самцы, оз. Нижняя Пиренга, n=4	0,00075 \pm 0,00018

*- достоверны отличия между самками, оз. Ковдор и самцами, оз. Нижняя Пиренга, $p < 0,05$.

Гидроксилазная активность цитохрома Р-450 у самок в загрязненной зоне была значительно выше, чем у самцов, то есть самцы и самки проявляли разную чувствительность к комплексному загрязнению. Отсутствие гидроксилазной активности у самцов из загрязненной зоны может быть обусловлено тем, что самцы более чувствительны к этому виду загрязнения во время нереста. Эта повышенная чувствительность приводит к подавлению гидроксилазной активности. Проявление активности цитохрома Р-450 у самцов из чистой зоны обусловлено особенностями созревания представителей сем. Лососевых: самцы в начале нереста созревают первыми, что, в свою очередь является следствием изменения стероидного обмена. В микросомах печени самок из оз. Нижняя Пиренга не выявляется активность цитохрома Р-450, что может свидетельствовать о благоприятной экологической обстановке по сравнению с озером Ковдор.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о неодинаковой чувствительности представителей разных полов к комплексному загрязнению.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительное изучение состава желчных кислот желчи у рыб, относящихся к разным экологическим группам, показало, что процентное содержание холево́й кислоты определяется типом питания и составом пищи.

2. У морских видов рыб в условиях пониженной солености снижался транспорт и биосинтез холево́й и хенодезоксихолево́й кислот, что влекло за собой изменение пищеварительной и регуляторной функций желчи.

3. Повышенная кислотность, гумифицированность, аккумуляция ртути в тканях, пониженная минерализация в пресноводных водоемах приводят к накоплению холево́й кислоты и холестерина в желчи и изменению пищеварительной функции желчи.

4. Зараженность колюшки трехиглой *G. aculeatus* гельминтом *S. solidus* вызывает разнонаправленные изменения у самок и самцов в соотношении стероидных компонентов желчи.

5. Изменение гидроксилазной активности цитохрома Р-450 и концентраций желчных кислот в желчи рыб под воздействием антропогенных факторов указывает на неодинаковую чувствительность к поллютантам у представителей различных видов рыб. Большая устойчивость самок к повреждающему воздействию этого фактора на клеточном уровне может быть связана с разной степенью родства

ядерных рецепторов к ксенобиотикам и эндогенным предшественникам желчных кислот.

6. Имеются возрастные особенности состава желчных кислот, свидетельствующие о существенных перестройках метаболизма пищеварительных и регуляторных свойств желчи в ходе онтогенеза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Высоцкая Р.У., Зекина Л.М., Морозов Д.Н., Сидоров В.С. Желчные кислоты желчи как индикатор на химическое загрязнение среды // V Международная конф. «Освоение Севера и проблемы природовосстановления». Сыктывкар, 2001: Научный центр УрО РАН. С. 38-40.
2. Высоцкая Р.У., Рипатти П. О., Зекина Л.М., Сидоров В.С., Морозов Д.Н. Разнообразие желчных кислот в мире животных // Международная конференция «Биоразнообразие Европейского Севера». Петрозаводск, 2001, КарНЦРАН. С. 40.
3. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., Зекина Л.М., Морозов Д.Н. Особенности состава желчных кислот у рыб // III съезд биохимического общества, С-пб, 2002. С. 357- 358.
4. Высоцкая Р.У., Крупнова М.Ю., Кяйвярйянен Е.И., Немова Н.Н., Морозов Д.Н., Такшеев С.А. Влияние экологических условий на ферментный статус наваги и трески Белого моря // Тезисы международных докладов: «Современные проблемы физиологии и экологии морских животных (рыбы, птицы, млекопитающие)», Ростов-на-Дону, 2002. С. 42.
5. Высоцкая Р.У., Морозов Д.Н. Влияние экологических условий на желчнокислотный состав окуней (*Perca fluviatilis* L.) // Всероссийская конференция: Современные проблемы водной токсикологии. Борок, 2002. С. 30-31.
6. Морозов Д.Н., Зекина Л.М., Высоцкая Р.У. Влияние характера питания на желчнокислотный состав пузырной желчи окуня // Международная конференция: Трофические связи в водных сообществах и экосистемах. Борок, 2003. С. 91-92.
7. Высоцкая Р.У., Крупнова М.Ю., Кяйвярйянен Е.И., Немова Н.Н., Морозов Д.Н. Такшеев С.А. Влияние экологических условий на активность гидролитических ферментов наваги и трески Белого моря // Современные проблемы физиологии и экологии морских животных. Апатиты, 2003. С. 299 - 305.

8. Морозов Д.Н. Цитохром P-450 в биохимических механизмах устойчивости сига *C. LAVARETUS* (L.) к комплексным загрязнениям // XV Коми Республиканская молодежная научная конференция. Сыктывкар, 2004. С. 119-120.

9. Морозов Д.Н., Зекина Л.М., Высоцкая Р.У. Оценка экологической ситуации в водоемах с использованием некоторых показателей стероидного обмена рыб // Вторая международная научная конференция и выставка: Биотехнология - охране окружающей среды, Третья школа-конференция молодых ученых и студентов: Сохранение биоразнообразия и рациональное использование биологических ресурсов, Москва, 2004. С. 127.

10. Морозов Д. Н., Зекина Л. М., Высоцкая Р. У., Евсеева Н. В. Влияние зараженности цестодой *S. SOLIDUS* на желчнокислотный состав колюшки трехиглой *G. ACULEATUS* II Международная научная конференция: Основные достижения и перспективы развития паразитологии. Москва, 2004. С. 183-185.

11. Морозов Д.Н., Высоцкая Р.У., Амелина В.С. Влияние загрязняющих веществ различной природы на активность нуклеаз окуня *PERCA FLUVIATILIS* L II Международная конференция: Экологические проблемы северных регионов и пути их решения, Апатиты, 2004. С. 69-71.

12. Морозов Д.Н. Исследование механизмов адаптации сига *Coregonus lavaretus* (L.) к комплексным загрязнениям // Международная научная конференция: Инновации в науке и образовании - 2004, Калининград, 2004. С. 13-14.

13. Морозов Д.Н., Высоцкая Р.У., Коломейчук С.Н., Зекина Л.М. Участие цитохрома P-450 в метаболизме желчных кислот у рыб // Международная научная конференция: Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов, Петрозаводск, 2004г. С. 94.

14. Амелина В.С., Ломаева Т.А., Морозов Д.Н. Активность кислых нуклеаз в тканях сига *COREGONUS LAVARETUS* (L.) в условиях загрязнения воды отходами железнорудного производства // Международная научная конференция: Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов, Петрозаводск, 2004г. С. 12

15. Морозов Д.Н. Изменение активности цитохрома P-450 из микросом печени и желчнокислотного состава желчи при адаптации сига *Coregonus lavaretus* (L.) к комплексным загрязнениям водоема // Вестник Молодых Ученых, серия: Науки о жизни, 2004, № 1. С. 88-92.

16. Феклов Ю.А., Морозов Д.Н. Оценка экологической обстановки озёр Ковдор и Нижняя Пиренга на основании гистологических исследований производителей сигов (вид - биоиндикатор) // Сборник Межведомственной Ихтиологической комиссии. 2004. С. 61-68.

Изд. лиц. № 00041 от 30.08.99. Подписано в печать 09.12.04. Формат 60x84¹/₁₆.
Бумага офсетная. Гарнитура «Times». Печать офсетная.
Уч.-изд. л. 1,2. Усл. печ. л. 1,4. Тираж 100 экз. Изд. № 69. Заказ № 464

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

27310