

УДК 577:[591.134.5:597.552.511]

## АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА И УРОВЕНЬ НЕКОТОРЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У МОЛОДИ ЛОСОСЯ (*SALMO SALAR* L.), РАЗЛИЧАЮЩЕЙСЯ ВОЗРАСТОМ И МАССОЙ

© 2015 г. М. В. Чурова, О. В. Мещерякова, А. Е. Веселов, Н. Н. Немова

*Институт биологии Карельского научного центра РАН*

*185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11*

*E-mail: mchurova@yandex.ru*

Поступила в редакцию 03.10.2014 г.

Окончательный вариант получен 08.05.2015 г.

С целью изучения механизмов регуляции метаболизма у молоди атлантического лосося (*Salmo salar* L.) в процессе его роста, развития и формирования размерной разнокачественности исследовали возрастные изменения активности ферментов энергетического и углеводного обмена, в том числе уровень экспрессии гена тяжелой цепи миозина, индекс РНК/ДНК в белых мышцах и печени у особей 0+, 1+ и 2+, а также взаимосвязь данных показателей с массой особей. Установлен разнонаправленный характер изменения активности ферментов аэробного и анаэробного энергетического обмена, а также снижение уровня показателей синтеза белка с увеличением возраста особей. При этом выявлена положительная взаимосвязь активности цитохромоксидазы, лактатдегидрогеназы, альдолазы, уровня экспрессии гена миозина в мышцах, активности цитохромоксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 1-глицерофосфатдегидрогеназы в печени с массой особей лосося внутри возрастных групп.

**Ключевые слова:** ферменты, энергетический обмен, углеводный обмен, экспрессия генов, РНК/ДНК, лосось, размеры.

DOI: 10.7868/S047514501505002X

### ВВЕДЕНИЕ

Важнейшим метаболическим фактором, определяющим процессы роста и развития рыб, является уровень энергетического обмена. Достаточный уровень образования АТФ определяет активный рост и развитие организма рыб, особенно в период раннего онтогенеза и в первые годы жизни, когда требуются большие энергетические затраты на синтез структурных, функциональных и запасных соединений. Энергетический обмен на разных этапах индивидуального развития имеет свои особенности, связанные с возрастными изменениями различных параметров организма в процессе жизнедеятельности. Так, например, вклад в суммарное потребление энергии таких процессов, как рост, дифференцировка и формообразование значительно меняется на разных стадиях развития (Озернюк, 1985). Процесс дифференциации рыб по размерам в пределах одной генерации также в значительной степени взаимосвязан с уровнем энергетического обмена и с общим уровнем метаболизма. Имеются данные литературы о том, что

активность ферментов энергетического и углеводного обмена наряду с молекулярно-генетическими показателями в мышцах — индексом РНК/ДНК и уровнем экспрессии гена тяжелой цепи миозина, взаимосвязаны с процессами роста рыб, отражают возрастные и сезонные изменения метаболизма, а также коррелируют с размерно-весовыми показателями особей, что продемонстрировано для различных видов рыб (Overturf, Hardy, 2001; Imsland et al., 2006; Gauthier et al., 2008; Vinagre et al., 2008; Koedijk et al., 2010).

Атлантический лосось (*Salmo salar* L.) является важным объектом для изучения процесса регуляции процессов роста и развития у рыб в раннем онтогенезе. Жизненный цикл лососевых рыб включает разнообразие этапов развития со сложной системой адаптаций (Казаков, 1998). Среди особей одной генерации может наблюдаться значительная дифференциация рыб по размерам и темпам роста, влияющая на возраст начала смолтификации (Шустов, 1983; Павлов и др, 2007). Установлено также, что уровень энергетического

и углеводного обмена молоди лосося влияет на выживаемость мальков, их активность, размеры, а также является одним из важнейших факторов, определяющих стратегию выбора места обитания при расселении сеголеток в различные по гидрологическим условиям участки рек (Павлов и др., 2007).

Изучение биохимических и молекулярно-генетических механизмов регуляции метаболизма в процессе дифференциации особей по размерам позволит расширить представления об особенностях роста и развития рыб в раннем онтогенезе. В данной работе у молоди атлантического лосося (*Salmo salar* L.) в зависимости от возраста и размеров особей определяли активность ферментов аэробного и анаэробного обмена (цитохром *c* оксидазы (ЦО), малатдегидрогеназы (МДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ)), углеводного обмена (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), 1-глицерофосфатдегидрогеназы (1-ГФДГ), альдолазы) в белых мышцах и печени, индекс РНК/ДНК и уровень экспрессии тяжелой цепи миозина (*MyHC*) в белых мышцах особей возрастных групп 0+, 1+ и 2+.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Исследования выполнены с использованием Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

Исследовали молодь атлантического лосося (*Salmo salar* L.) возраста 0+, 1+, 2+. Место отлова – река Индера (Кольский полуостров). Сбор материала проводили в летнее время при температуре воды 13.5–15°C. Использовался электролов (аппарат Fa-2 норвежского производства). После отлова мальков выдерживали 1 сутки в садках. Каждую особь измеряли и взвешивали, кусочки тканей замораживали в жидком азоте, и далее хранили при –80°C до начала анализа. Данные по размерно-весовым показателям отловленной молоди лосося представлены в таблице 1.

*Определение активности ферментов.* Активность ферментов определяли в белых мышцах рыб в возрасте 0+, 1+ и 2+. Активность ферментов печени была определена только у особей возраста 1+ и 2+ в связи с небольшой массой этого органа у сеголеток (0+) недостаточной для взятия

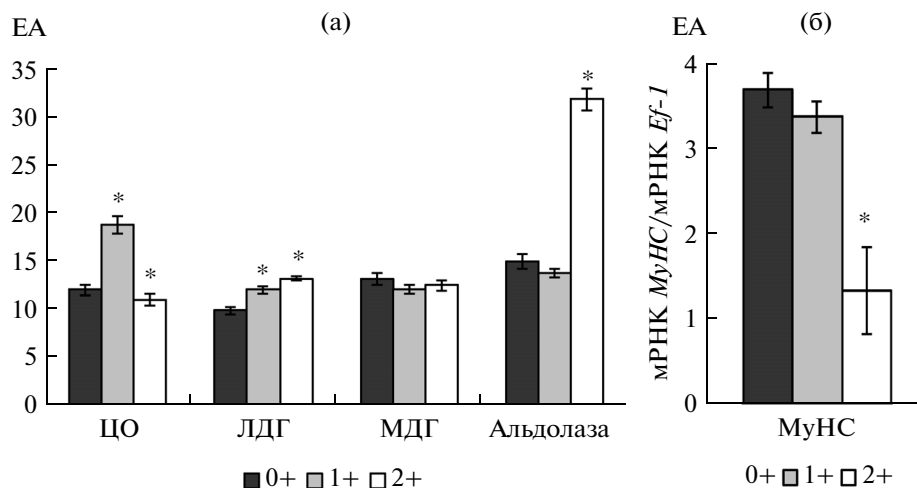
навески. Ткань гомогенизировали в 0.01 М Трис-НСI буферном растворе (рН 7.5). Общую активность ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ, 1.1.1.49), малатдегидрогеназы (МДГ, 1.1.1.37) в органах рыб определяли по общепринятым методикам (Кочетов, 1980). Активность альдолазы (КФ 4.1.2.13) определяли по методике Веck в модификации Аманьева и Обуховой (Колб, Камышников, 1976). Активность цитохром *c* оксидазы (ЦО, КФ 1.9.3.1.) определяли по методу Смита (Smith, 1955).

Тотальную РНК выделяли из белых мышц по Хомчински и Сакхи (Chomczynski, Sacchi, 1987) с помощью набора “для выделения тотальной РНК Yellow Solve” (Клоноген, С.-Петербург). ДНК белых мышц выделяли методом Альанаби и Мартинеса (Aljanabi, Martinez, 1997). Концентрации РНК и ДНК определяли спектрофотометрически (спектрофотометр “SmartSpec Plus”, BioRad, США).

Уровень экспрессии генов тяжелой цепи миозина определяли в белых мышцах методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (10 ед/мл) (Силекс, Россия). Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали из препарата тотальной РНК с использованием MMLV-обратной транскриптазы и случайных гексонуклеотидов (набор “Синтез первой цепи ДНК”, Силекс). Концентрацию кДНК измеряли спектрофотометрически. Амплификацию проводили на приборе i-Cycler с оптической приставкой IQ5 (BioRad) с использованием реакционной смеси 2.5× для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I (Синтол, Россия). Праймеры для фактора элонгации и тяжелой цепи миозина подбирали с помощью программы Beacon Designer 5.0. Последовательности праймеров следующие: миозин (*MyHC*) (GenBank Z48794) прямой 5'-GCTGAGAAGGACGAGGAGATG-3', обратный 5'-GCCTGCCTGTTGGAGTGG-3'; фактор элонгации (*Ef-1*) (GenBank AF321836) прямой 5'-TTGCTGGTGGTGTG-GTGAG-3', обратный 5'-AAACGTTCTGGCTG-TAGGG-3'. Протокол ПЦР: денатурация ДНК при 95°C 5 мин; повторяющиеся циклы (45): денатурация ДНК при 95°C 20 с, отжиг праймеров при 59°C по 30 с, элонгация ДНК при 72°C по 30 с,

**Таблица 1.** Размерно-весовые характеристики особей лосося трех возрастных групп

| Показатель        |              | 0+          | 1+          | 2+          |
|-------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| АС, см            | <i>M ± m</i> | 4.45 ± 0.08 | 7.26 ± 0.11 | 9.66 ± 0.20 |
|                   | min–max      | 3.2–5.3     | 6.3–8.7     | 8.6–10.3    |
| Вес, г            | <i>M ± m</i> | 0.87 ± 0.04 | 3.83 ± 0.17 | 8.25 ± 0.51 |
|                   | min–max      | 0.28–1.35   | 2.30–6.24   | 5.67–10.20  |
| Количество особей |              | 25          | 25          | 10          |



**Рис. 1.** Активность ферментов (ЕА,  $\mu\text{моль}/\text{мин}/\text{г}$  ткани) (а) и уровень экспрессии гена тяжелой цепи миозина (мРНК *MyHC*/мРНК *Ef-1*) (б) в мышцах особей лосося разных возрастных групп,  $M \pm m$ . Для ЦО значения представлены в  $\text{ЕА} \times 10$ , для ЛДГ и альдолазы –  $\text{ЕА} \times 10^{-1}$ . \* – различия достоверны при  $p < 0.05$ .

с последующей процедурой плавления фрагментов ДНК. Концентрацию матричной РНК в виде кДНК определяли по стандартной кривой (Gahr et al., 2008). Уровень экспрессии гена миозина нормализовали по уровню экспрессии референсного гена *Ef-1*. Данные выражались как отношение концентрации мРНК исследуемого гена к концентрации мРНК *Ef-1*.

Для статистической обработки данных использовали общепринятые методы с использованием пакетов программ MS Excel и StatGraphics 2.5 for Windows. Сравнение выборок проводили с применением непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Взаимосвязь исследуемых показателей с размерами особей и между собой оценивали при помощи линейной регрессии и корреляционного анализа (Коросов, Горбач, 2007).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Уровень биохимических и молекулярно-генетических показателей в мышцах особей лосося разного возраста

При исследовании уровня аэробного и анаэробного энергетического обмена был установлен различный характер возрастных изменений активности соответствующих ферментов. Отмечена повышенная активность ЦО, ключевого фермента дыхательной цепи митохондрий, у рыб 1+ по сравнению с особями 0+ и более низкая активность ЦО у рыб в возрасте 2+ до уровня у сеголеток (рис. 1а). Эти результаты указывают на различие в уровне аэробного обмена у возрастных групп молоди лосося.

В отличие от активности ЦО, уровень активности ЛДГ в исследованном возрастном ряду увеличивался (рис. 1а). Активность фермента ЛДГ в

белых мышцах рыб связана преимущественно с участием его в анаэробном гликолизе и используется как индикатор уровня анаэробного гликолиза (Somero, Childress, 1980). Этот процесс является ведущим в энергообеспечении белых мышц при интенсивных сокращениях. Ранее было показано, что уровень активности ЛДГ отражает степень физической активности рыб и особенности их плавания. Скелетные мышцы морских рыб пелагических видов обладают большей активностью ферментов гликолиза – ЛДГ и пируваткиназы по сравнению с мышцами бентосных малоактивных видов рыб (Drazen, Seibel, 2007). Кроме того, для многих видов рыб показано возрастное увеличение интенсивности анаэробного энергетического обмена, активности ЛДГ и других ферментов гликолиза (Somero, Childress, 1980; Burness et al., 1999). Как известно, молодь атлантического лосося (1+ и 2+) отличается высокой физической активностью, обитает на пороговых участках с высокой скоростью течения и вынуждена активно противостоять потоку (Шустов, 1983). Поэтому повышение активности ЛДГ в мышцах с увеличением возраста и массы тела может быть направлено на повышение энергообеспечения плавательной активности и удержания молоди в потоке.

Активность альдолазы в мышцах характеризует уровень гликолиза и отражает степень использования углеводов в процессах аэробного и анаэробного метаболизма (Johansen, Overturf, 2006). Изменение активности этого фермента вместе с данными по активности ЛДГ (рис. 1а) указывают на сопряженное повышение уровня использования углеводов в гликолизе и уровня анаэробного обмена в мышцах особей старшей возрастной группы.

Для оценки процессов синтеза белка определяли индекс РНК/ДНК и концентрацию белка в мышцах. Индекс РНК/ДНК отражает уровень синтеза белков: содержание клеточной РНК варьирует в зависимости от интенсивности синтеза белков, в то время как количество ДНК остается постоянным (Vinagre et al., 2008). Ранее было показано, что значение индекса РНК/ДНК положительно коррелирует с темпом роста лососевых (Варнавский и др., 1991; Peragon et al., 2001) и других видов рыб (Vinagre et al., 2008) и может служить индикатором интенсивности роста. У исследованных возрастных групп лосося отмечена одинаковая тенденция изменения индекса РНК/ДНК и концентрации белка, а именно – увеличение в возрасте 1+ и снижение в возрасте 2+ (табл. 2). Наблюдаемый характер изменения значений данных показателей указывает на высокие уровни синтеза белка и темпы роста двухлеток (1+) лосося.

Обращает на себя внимание то, что высокие значения показателей уровня синтеза белка (индекса РНК/ДНК и концентрации белка) у лососей в возрасте 1+, происходит на фоне повышенной активности ферментов энергетического обмена. Возможно, это связано с изменением качественного состава пищи в рационе лососей с возрастом. Известно, что пестрятки 1+ переходят в часть реки, где скорость течения выше, и начинают питаться более крупными беспозвоночными, что приводит к различиям в составе пищи, наблюдаемым между сеголетками (0+) и пестрятками (возраст 1+ и старше) (Шустов, 1983). Вероятно, что качественное изменение в соотношении питательных веществ у двухлеток лососей (1+) приводит с одной стороны к усилению катаболической составляющей метаболизма мышц – образованию энергии АТФ, а с другой стороны – к анаболическим эффектам – усилению биосинтетических процессов, в частности синтеза белка в этом возрасте.

Для оценки мышечного роста исследованных возрастных групп лосося использовали уровень экспрессии гена миозина – одного из основных белков в мышце. Установлено, что уровень экспрессии гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*) коррелирует с темпом роста радужной форели (Overturf, Hardy, 2001), атлантического лосося (Nevroy et al., 2006), пятнистой зубатки (Imsland et al., 2006), светлоперого судака (Dhillon et al., 2008). Поэтому этот параметр может быть использован как показатель, отражающий темпы прироста мышечной массы. Согласно результатам исследования, значение этого показателя у особей лосося в возрасте 2+ было ниже, чем у рыб в возрасте 0+ и 1+ (рис. 1б), что может быть связано со снижением интенсивности процесса синтеза мышечных белков в этом возрасте. Более низкий уровень экспрессии гена *MyHC* у трехлеток (2+) согласуется с уменьшением активности ЦО, уровня

**Таблица 2.** Концентрация белка (мг/г ткани), значение индекса РНК/ДНК, в мышцах особей лосося разных возрастных групп,  $M \pm m$

|    | Белок                     | РНК/ДНК                  |
|----|---------------------------|--------------------------|
| 0+ | 68.27 ± 1.63              | 0.85 ± 0.04              |
| 1+ | 82.42 ± 1.43 <sup>a</sup> | 1.04 ± 0.04 <sup>a</sup> |
| 2+ | 72.90 ± 2.56 <sup>b</sup> | 0.85 ± 0.06 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup> – различия между возрастными группами 0+ и 1+ достоверны при  $p < 0.05$ .

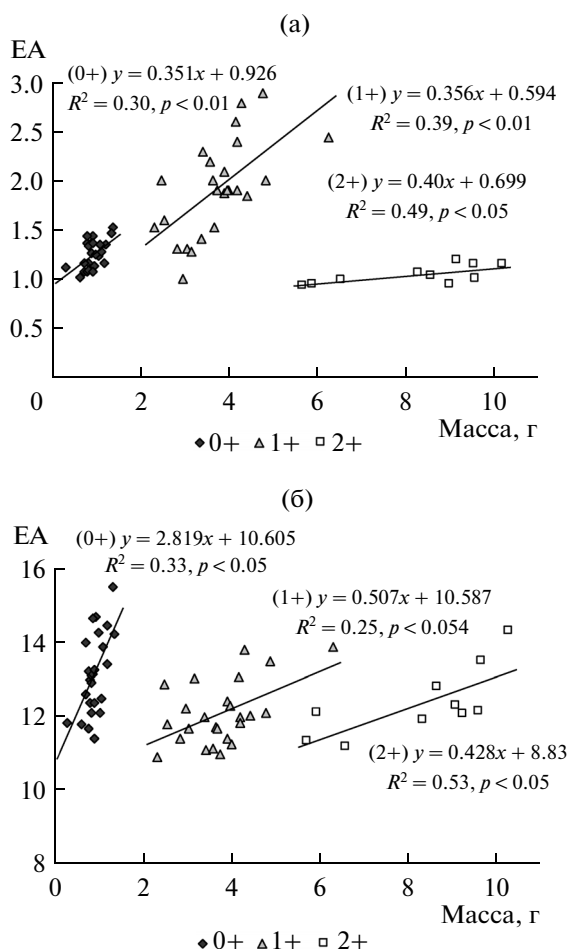
<sup>b</sup> – различия между возрастными группами 1+ и 2+ достоверны при  $p < 0.05$ .

РНК/ДНК и концентрации белка в мышцах, что, вероятно, указывает на снижение у молоди лососей в онтогенезе уровня биосинтетических процессов в мышцах и интенсивности роста в целом.

Анализ данных активности ферментов печени у молоди лосося не выявил достоверных различий между исследованными возрастными группами.

*Взаимосвязь исследуемых показателей с массой особей лосося внутри возрастных групп*

**Белые мышцы.** По данным регрессионного анализа установлена положительная взаимосвязь активности ЦО и МДГ в мышцах с массой особей лосося в пределах одновозрастных групп (рис. 2). Активность МДГ, фермента цикла трикарбоновых кислот, при наличии положительной корреляции с ЦО также указывает на уровень аэробного метаболизма (Koedijk et al., 2010). Таким образом, более крупные, быстрорастущие особи каждой возрастной группы отличаются высоким уровнем аэробного синтеза АТФ. Как известно, интенсивно идущие процессы синтеза структурных, функциональных и запасных соединений в мышцах должны быть обеспечены необходимым количеством энергии, что требует высокого уровня аэробного синтеза АТФ (Savoie et al., 2008). Подобная корреляция активности ЦО и МДГ мышц с размерами тела и темпом роста была показана и для других видов рыб – атлантической трески (Couture et al., 1998, Koedijk et al., 2010), окуня (Gauthier et al., 2008), сайды (Mathers et al., 1992), клариевого сома (Tripathy, 1999), а также заводской молоди лосося (Nathanailides, Stickland, 1996) и искусственно выращиваемой форели (Чурова и др., 2010). Однако есть исследования, в которых взаимосвязь активности ферментов аэробного обмена, ЦО и цитратсинтазы, в мышцах рыб с массой тела не наблюдалась (Burness et al., 1999; Norton et al., 2000) или была отрицательной (Somero, Childress, 1980; Davies, Moyes, 2007). Следует обратить внимание также на то обстоятельство, что в упомянутых работах изучали большой размерный ряд рыб без учета их возраста (от мальков



**Рис. 2.** Зависимость активности (EA) цитохром *c* оксидазы (а) и малатдегидрогеназы (б) белых мышц от массы тела особей лосося разных возрастных групп.

до взрослых или только взрослых особей), что, возможно, отражается на значении степени взаимосвязи активности фермента с размерами. Согласно данным нашего исследования, несмотря на изменения значения активности ЦО с возрастом (сначала повышение в возрасте 1+, а затем его снижение в возрасте 2+), внутри одновозрастных групп взаимосвязь активности с массой особей была положительной.

**Таблица 3.** Корреляция между активностью исследуемых ферментов в мышцах особей лосося разных возрастных групп

| Фермент | Коэффициент корреляции с активностью альдолазы |       |       |
|---------|--|-------|-------|
|         | 0+   | 1+    | 2+    |
| ЦО      | 0.47*  | 0.45* | 0.53  |
| ЛДГ     | 0.55*  | 0.52* | 0.79* |

\* — значение коэффициента корреляции достоверно при  $p < 0.05$ .

Взаимосвязь активности ЛДГ с массой особей внутри одновозрастных групп также была положительной (рис. 3а). Наблюдаемое повышение активности ферментов гликолиза в белых мышцах у более крупных особей лосося внутри одновозрастных групп, видимо, связано с необходимостью поддержания высокого уровня образования АТФ для обеспечения физической активности. Согласно многочисленным литературным данным, активность ферментов гликолиза лактатдегидрогеназы, а также пируваткиназы в белых мышцах коррелирует с темпом роста атлантической трески (Couture et al., 1998, Koedijk et al., 2010), молоди сайды (Mathers et al., 1992) и пятнистой зубатки (Imsland et al., 2006), что свидетельствует о наличии положительной взаимосвязи между высоким уровнем энергетического обмена в скелетных мышцах и скоростью прироста мышечной ткани. Это объясняется тем, что при высокой физической активности особей, характеризующейся быстрыми сокращениями белых мышц, в энергообеспечении которых главную роль играет анаэробный метаболизм, значительно усиливается синтез сократительных белков в мышце и увеличивается объем мышечной массы (Ellerby et al., 2001). В подтверждение этому выявлена положительная корреляция активности ЛДГ и уровня экспрессии гена тяжелой цепи миозина в мышцах особей лосося одного возраста. При этом коэффициенты корреляции между этими показателями составили 0.68, 0.64, 0.65 ( $p < 0.05$ ) для групп лососей 0+, 1+ и 2+. Наши результаты подтверждают данные, полученные для микижи *Parasalmo mykiss* (Чурова и др., 2010), сига *Coregonus lavaretus* (Чурова и др., 2011) и пятнистой зубатки (Imsland et al., 2006), согласно которым активность ЛДГ коррелирует с уровнем экспрессии гена миозина. Это подчеркивает взаимосвязь гликолиза с процессами прироста мышечной массы.

Высокие темпы прироста мышечной массы у более крупных особей лосося положительно коррелируют с уровнем экспрессии гена тяжелой цепи миозина (рис. 3б). Несмотря на снижение значения показателя у лососей 2+, взаимосвязь уровня экспрессии гена *MyHC* с массой остается положительной внутри групп особей одного возраста.

Установлена положительная взаимосвязь активности альдолазы с массой особей (рис. 3в). Это указывает на то, что внутри каждой возрастной группы лососей с увеличением длины и массы особей степень использования углеводов в гликолизе повышается. При оценке степени использования углеводов в аэробном и анаэробном обмене у разных по размеру особей основывались на данных по корреляции активности альдолазы с активностью цитохромоксидазы и лактатдегидрогеназы (табл. 3). Во всех исследованных выборках лосося активность альдолазы положительно

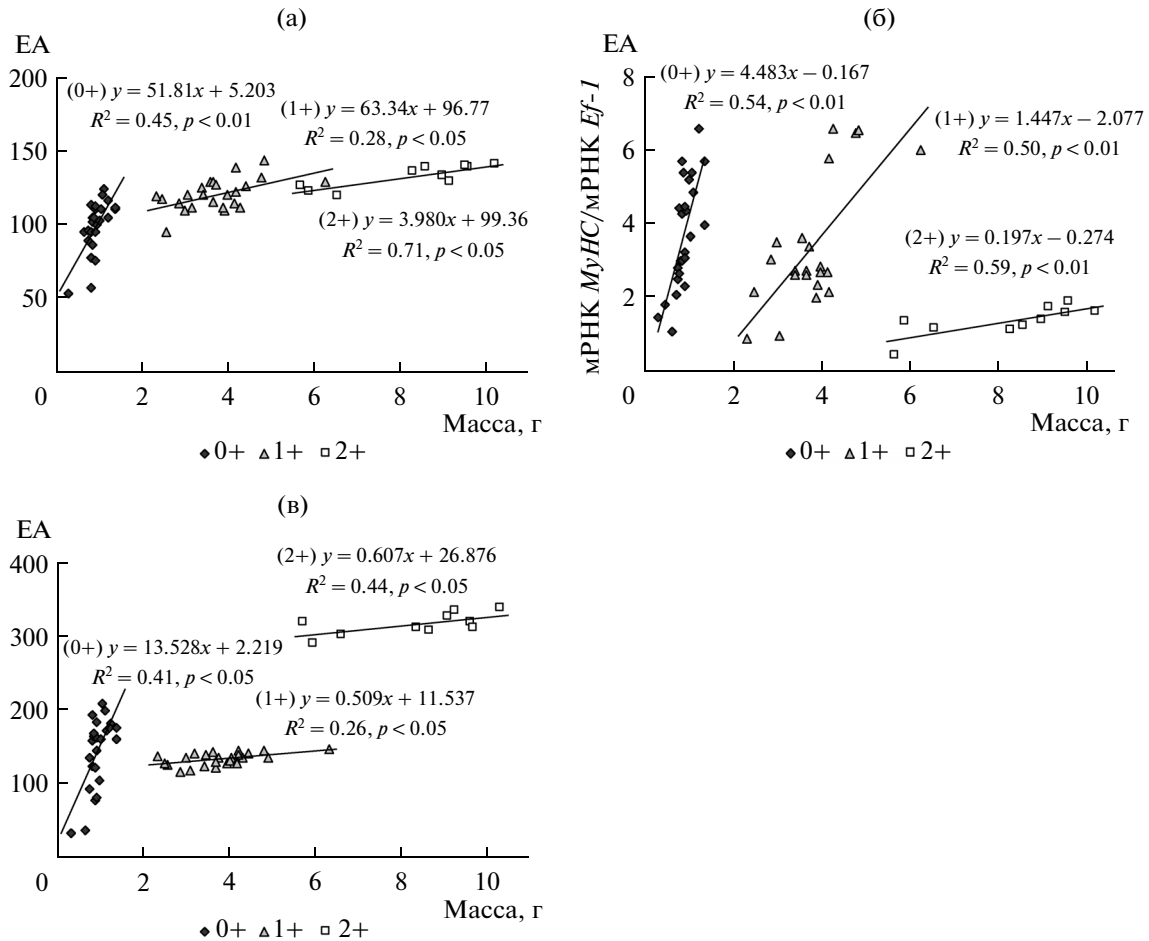


Рис. 3. Зависимость активности (EA) лактатдегидрогеназы (а), уровня экспрессии гена *MyHC* (мРНК *MyHC*/мРНК *Ef-1*) (б), активности (EA) альдолазы (в) в белых мышцах от массы тела особей лосося разных возрастных групп.

коррелировала с активностью ЛДГ, что свидетельствует о том, что у более крупных особей увеличение степени использования углеводов в мышцах обусловлено интенсификацией анаэробного обмена.

В отличие от других исследуемых показателей, характер взаимосвязи индекса РНК/ДНК с размерно-весовыми характеристиками особей различался между возрастными группами. Положительная корреляция между показателем и массой особей наблюдалась только в возрасте 0+ и 1+, а в возрасте 2+ взаимосвязь была недостоверной (рис. 4). Таким образом, только у особей первых двух лет жизни наблюдается связь массы тела с уровнем синтеза белков. Принимая во внимание, что у лососей в возрасте 2+ связь с индексом РНК/ДНК отсутствует, но сохраняется положительная корреляция уровня экспрессии миозина с размерами, можно предположить, что общий уровень синтеза белков среди разноразмерных рыб в возрасте 2+ остается примерно одинаковым, но большие рыбы отличаются более высоким темпом прироста мышечной массы. Согласно данным литературы степень взаимосвязи и

знак коэффициента корреляции РНК/ДНК с размерами объясняются особенностями развития разных видов рыб, различием в их возрасте (Azuma et al., 1998; Tripathi, Verma, 2004). Напри-

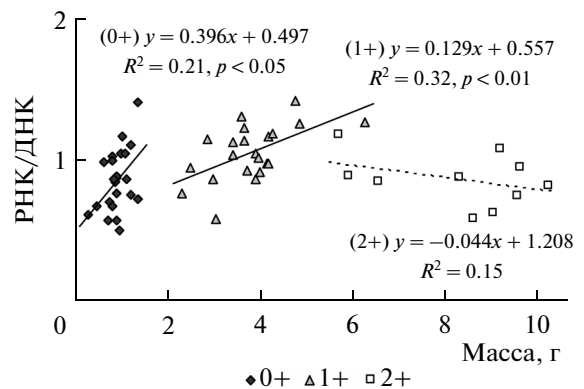
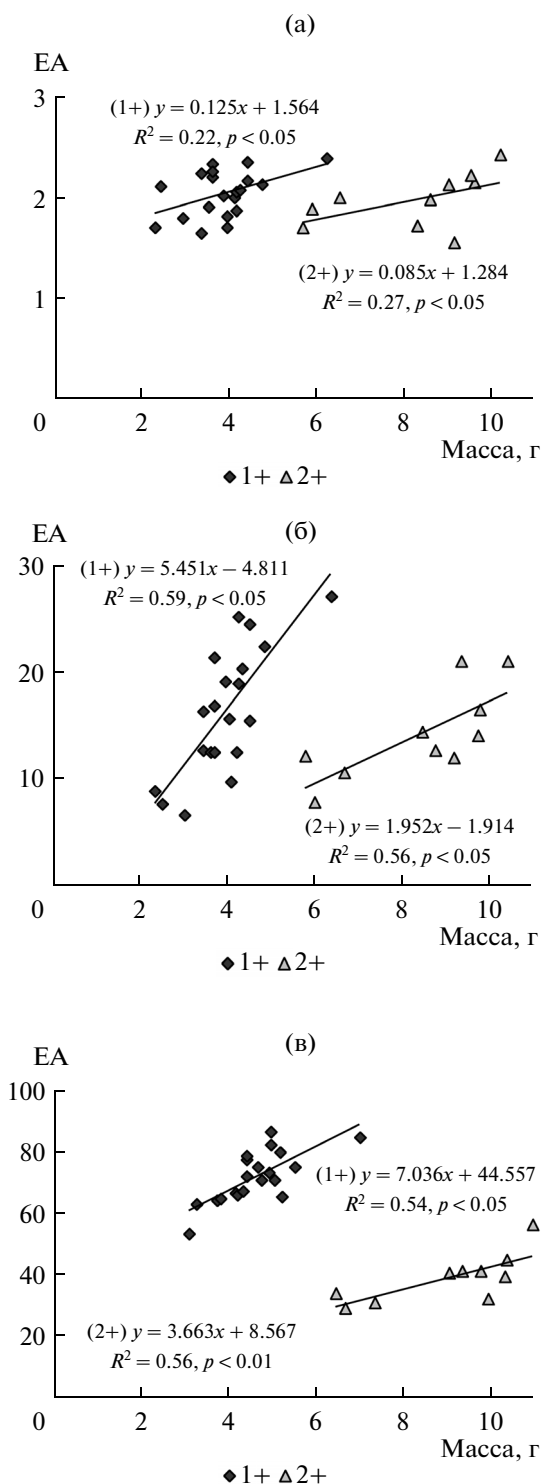


Рис. 4. Зависимость индекса РНК/ДНК в белых мышцах от длины (а) и массы (б) тела особей лосося разных возрастных групп. Условные обозначения: — зависимость достоверна при  $p < 0.05$ ; ---- зависимость недостоверна.



**Рис. 5.** Зависимость активности (ЕА) цитохром *c* оксидазы (а), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (б) и 1-глицерофосфатдегидрогеназы (в) в печени от массы тела особей лосося разных возрастных групп.

мер, в исследованиях Азума с коллегами (Azuma et al., 1998), применивших показатель РНК/ДНК для описания ростовых характеристик тихоокеанских лососей, были показаны различия в степе-

ни корреляции индекса с длиной в зависимости от вида и возраста рыб. У горбуши и нерки взаимосвязи РНК/ДНК в мышцах с длиной тела не было установлено. У ювенильных особей кеты наблюдалась отрицательная взаимосвязь этого показателя с длиной тела, а у взрослых рыб эта взаимосвязь была положительной.

Наблюдаемые в исследовании различия в степени взаимосвязи индекса РНК/ДНК с размерно-весовыми характеристиками особей и в значении показателя с возрастом также могут быть связаны с изменением соотношения процессов гипертрофии и гиперплазии мышечных волокон в процессе развития (Peragon et al., 2001; Johansen, Overturf, 2005).

**Печень.** В печени особей лосося возрастных групп 1+ и 2+ установлена положительная взаимосвязь между массой рыб и активностью ЦО, Г-6-ФДГ и 1-ГФДГ (рис. 5). Согласно результатам исследования, большие по размерам особи лосося имеют высокий уровень процессов аэробного обмена в связи с большими энергетическими затратами на поддержание функциональной активности печени на необходимом уровне. Наши данные согласуются с исследованием Трипати (Tripathi, 1999), в котором была показана положительная корреляция ферментов аэробного обмена в печени с массой тела. Наряду с аналогичной взаимосвязью ферментов ЦО в мышцах эти результаты свидетельствуют о том, что более крупные особи отличаются более высоким уровнем аэробного обмена, что вероятно связано с усилением функциональной активности их органов и высоким темпом роста.

Ферменты 1-ГФДГ и Г-6-ФДГ в печени играют важную роль в процессах пластического обмена, синтезе структурных и запасных липидов. Роль 1-ГФДГ в печени связана главным образом с процессом синтеза глицерофосфата из углеводов, который используется для синтеза структурных и запасных липидов (Harmon, Sheridan, 1992). Г-6-ФДГ является ключевым ферментом пентозофосфатного пути, в результате которого генерируется восстановитель в форме НАДФН, использующийся в реакциях биосинтеза жирных кислот, холестерина, стероидных гормонов, сфинголипидов (Tian et al., 1998). Отмеченная положительная взаимосвязь активностей ферментов 1-ГФДГ и Г-6-ФДГ с размерами предположительно связана с усилением процессов липогенеза у более крупных рыб. Положительная корреляция этих ферментов с массой была показана ранее для искусственно выращиваемой радужной форели (Чурова и др., 2010).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования установлены возрастные изменения активности фермен-

тов ЦО, ЛДГ, альдолазы, уровня экспрессии гена *МуНС*, концентрации белка, индекса РНК/ДНК в белых мышцах, которые непосредственно связаны с особенностями метаболизма молоди лосося в процессе роста и развития. В ряду исследованных возрастных групп лосося (0+, 1+, 2+) отмечено увеличение интенсивности анаэробного энергетического обмена и уровня использования углеводов в гликолизе, что может быть связано с возрастными энергетическими потребностями обеспечения физической активности особей. Пик интенсивности аэробного процесса образования энергии и процесса синтеза белка наблюдался у лосося в возрасте 1+.

Несмотря на различный характер возрастных изменений активности ферментов ЦО, ЛДГ, альдолазы, Г-6-ФДГ и 1-ГФДГ в мышцах и печени, уровня экспрессии гена миозина в мышцах особей лосося, внутри возрастных групп взаимосвязь этих показателей с размерами рыб была положительной. Более крупные особи лососей отличаются более высокими темпами прироста мышечной массы, высокими уровнями аэробного и анаэробного обмена, повышенным уровнем использования углеводов в мышцах. С увеличением размеров особей, усиливаются биосинтетические процессы в печени. Взаимосвязь индекса РНК/ДНК с длиной и массой рыб показана не для всех возрастных групп.

Основываясь на данных исследования, показатели активности ферментов ЦО и ЛДГ, а также значения уровня экспрессии тяжелой цепи миозина могут быть использованы в методологии оценки состояния и темпов роста лососевых рыб.

Исследование взаимосвязи активности ферментов и молекулярно-генетических показателей с массой рыб выполнены при поддержке грантов Президента РФ для молодых ученых МК-3025.2014.4 и “Ведущие научные школы России” – НШ-1410.2014.4.

Исследования различий биохимических показателей молоди лосося выполнены при финансовой поддержке гранта РФФ № 14-24-00102.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Варнавский В.С., Варнавская Н.В., Калинин С.В., Кинас Н.М. Индекс РНК/ДНК как показатель скорости роста в ранний морской период жизни кижуча *Oncorhynchus kisutch* // Вопр. ихтиол. 1991. Т. 31. Вып. 5. С. 783–789.

Казаков Р.В. Атлантический лосось / Под ред. Казакова Р.В. СПб: Наука, 1998. 575 с.

Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. Минск: Беларусь, 1976. 311 с.

Коросов А.В., Горбач В.В. Компьютерная обработка биологических данных: Метод. пособие. Петрозаводск: ПетрГУ, 2007. 76 с.

Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 272 с.

Озернюк Н.Д. Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб. М.: Наука, 1985. 175 с.

Павлов Д.С., Мещерякова О.В., Веселов А.Е., Немова Н.Н., Лунандин А.И. Показатели энергетического обмена у молоди атлантического лосося (*Salmo salar* L.), обитающей в главном русле и притоке реки Варзуга (Кольский полуостров) // Вопросы ихтиологии. Т. 47. № 6. С. 819–826.

Чурова М.В., Мещерякова О.В., Немова Н.Н., Шатуновский М.И. Соотношение роста и некоторых биохимических показателей рыб на примере микижи *Parasalmo mykiss* Walb. // Известия РАН. Сер. Биол. 2010. № 3. С. 289–299.

Чурова М.В., Мещерякова О.В., Немова Н.Н. Взаимосвязь активности ферментов энергетического обмена с темпами роста и размерами рыб // Ученые записки ПетрГУ. 2011. № 4. С. 31–37.

Шустов Ю.А. Экология молоди атлантического лосося. Петрозаводск: Карелия, 1983. 153 с.

Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acid Res. 1997. V. 25. P. 4692–4693.

Azuma T., Yada T., Ueno Y., Iwata M. Biochemical approach to assessing growth characteristics in salmonids // NPAFC Bull. 1998. № 1. P. 103–111.

Burness G.P., Leary S.C., Hochachka P.W., Moyes C.D. Allometric scaling of RNA, DNA, and enzyme levels in fish muscle // Am. J. Physiol. 1999. V. 277. P. R1164–R1170.

Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.

Couture P., Dutil J.-D., Guderley H. Biochemical correlates of growth and condition in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1998. V. 55. P. 1591–1598.

Davies R., Moyes C.D. Allometric scaling in centrarchid fish: origins of intra- and inter-specific variation in oxidative and glycolytic enzyme levels in muscle // J. Exp. Biol. 2007. V. 210. P. 3798–3804.

Dhillon R.S., Wang Y., Tufts B.L. Using molecular tools to assess muscle growth in fish: Applications for aquaculture and fisheries management // Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology. 2008. V. 48. P. 452.

Drazen J.C., Seibel B.A. Depth-related trends in metabolism of benthic and benthopelagic deep-sea fishes // Limnol. Oceanogr. 2007. V. 52. P. 2306–2316.

Ellerby D.J., Altringham J.D. Spatial variation in fast muscle function of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during fast-starts and sprinting // J. Exp. Biol. 2001. V. 204. P. 2239–2250.

Gahr S.A., Vallejo R.L., Weber G.M., Shepherd B.S., Silverstein J.T., Rexroad C.E. 3rd. Effects of short-term growth hormone treatment on liver and muscle transcriptomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Physiol. Genomics. 2008. V. 32. P. 380–392.

Gauthier C., Campbell P., Couture P. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*) // Comparative Biochemistry and Physiology: Part A. 2008. V. 151. P. 526–532.



- Harmon J.S., Sheridan M.A. Glucose-stimulated lipolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver // J. Fish Physiol. and Biochem. 1992. V. 10. P. 189–199.
- Hevroy E.M., Jordal A.-E.O., Hordvik I., Espe M., Hemre G.-I., Ølsvik P.A. Myosin heavy chain mRNA expression correlates higher with muscle protein accretion than growth in Atlantic salmon, *Salmo salar* // Aquaculture. 2006. V. 252. P. 453–461.
- Johansen K.A., Overturf K. Alterations in expression of genes associated with muscle metabolism and growth during nutritional restriction and refeeding in rainbow trout // Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2006. V. 144. P. 119–127.
- Imsland A.K., Foss A., Sveinsbø B., Jonassen T.M., Stefansson S.O. Comparisons of RNA/DNA ratios, growth, and metabolism in different populations of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* reared at four temperatures // Journal of the World Aquaculture Society. 2001. V. 32. P. 1–10.
- Koedijk R.M., Le François N.R., Blier P.U., Foss A., Folkvord A., Ditlecadet D., Lamarre S.G., Stefansson S.O., Imsland A.K. Ontogenetic effects of diet during early development on growth performance, myosin mRNA expression and metabolic enzyme activity in Atlantic cod juveniles reared at different salinities // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 2010. V. 156. P. 102–109.
- Nathanailides C., Stickland N.C. Activity of cytochrome c oxidase and lactate dehydrogenase in muscle tissue of slow growing (lower modal group) and fast growing (upper modal group) Atlantic salmon // Journal of Fish Biology. 1996. V. 48. P. 549–551.
- Norton S.E., Eppley Z.A., Sidell B.D. Allometric scaling of maximal enzyme activities in the axial musculature of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum) // Physiol. Biochem. Zool. 2000. V. 73. P. 819–828.
- Overturf K., Hardy R. Myosin expression levels in trout muscle: a new method of monitoring specific growth rates for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) on varied planes of nutrition // Aquat. Res. 2001. V. 32. P. 315–322.
- Peragon J., Barroso J.B., Garcia-Salguero L., Higuera M., Lupianez J.A. Growth, protein-turnover rates and nucleic-acid concentrations in the white muscle of rainbow trout during development // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2001. V. 33. P. 1227–1238.
- Smith L. Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase // Methods in Biochem. Analysis. 1995. V. 2. P. 427–434.
- Savoie A., François N.R.L., Cahu C., Blier P.U. Metabolic and digestive enzyme activity profiles of newly hatched spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): effect of temperature // Aquaculture Research. 2008. V. 39. P. 382–389.
- Somero G.N., Childress J.J. A violation of the metabolism-size scaling paradigm: activities of glycolytic enzymes in muscle increase in larger size fish // Physiol. Zool. 1980. V. 53. P. 322–337.
- Tripathi G. Scaling of some metabolic enzymes in liver of freshwater teleost: an adaptive mechanism // Z. Naturforsch. 1999a. V. 54c. P. 1103–1106.
- Tian W.N., Braunstein L.D., Pang J., Stuhlmeier K.M., Xi Q.C., Tian X., Stanton R.C. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 10609–10617.
- Vinagre C., Fonseca V., Maia A., Amara R., Cabral H. Habitat specific growth rates and condition indices for the sympatric soles *Solea solea* (Linnaeus, 1758) and *Solea senegalensis* (Kaup, 1858), in the Tagus estuary, Portugal, based on otolith daily increments and RNA-DNA ratio // Journal of Applied Ichthyology. 2008. V. 24. P. 163–169.

## Activity of Enzymes Involved in the Energy and Carbohydrate Metabolism and the Level of Some Molecular-Genetic Characteristics in Young Salmons (*Salmo salar* L.) with Different Age and Weight

M. V. Churova, O. V. Meshcheryakova, A. E. Veselov, and N. N. Nemova

*Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Sciences,  
ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

*e-mail: mchurova@yandex.ru*

Received October 3, 2014; in final form, May 8, 2015

In order to investigate the metabolic regulation in Atlantic salmon fries (*Salmo salar* L.) during their growth, development, and in the course of size divergence, age-related changes in the activity of enzymes involved in the energy and carbohydrate metabolism, including myosin heavy chain isoform expression, RNA/DNA ratio in the white muscles and liver of specimens at ages of 0+, 1+, and 2+, as well as correlations of these characteristics with the body weight of fish specimens were analyzed. Multidirectional changes in the activity of enzymes taking part in aerobic and anaerobic energy metabolism, as well as a decrease in the protein synthesis with age, were revealed. There was a positive correlation between the activities of *cytochrome oxidase*, lactate dehydrogenase, aldolase, and myosin gene expression in the muscles, *cytochrome oxidase* activity, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the liver with the body weight of salmon specimens within the age groups.

**Keywords:** enzymes, energy metabolism, carbohydrate metabolism, gene expression, RNA/DNA ratio, salmon, size