

Б-ка .

На правах рукописи

САМСОНОВА МАРИЯ ВИКТОРОВНА

**АЛАНИН- И АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ КАК
ИНДИКАТОРЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ РЫБ**

Специальность 03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2002

Работа выполнена на кафедре органической и биологической химии биолого-химического факультета Московского педагогического государственного университета

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
ФИЛИППОВИЧ Юрий Борисович

доктор биологических наук
МИКОДИНА Екатерина Викторовна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Шатуновский Михаил Ильич

кандидат биологических наук, профессор
Ушакова Галина Ивановна

Ведущая организация –
Межведомственная ихтиологическая комиссия

Защита состоится « 18 » ноября 2002 г. в 16 час. 30 мин. на заседании Диссертационного совета Д 212.154.17 при Московском педагогическом государственном университете по адресу: 129278, Москва, ул. Кибальчича, д.6, корп.5, ауд.506.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московского педагогического государственного университета по адресу: 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д.1.

Автореферат разослан « 16 » октября 2002 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета


ХОЛМОГОРОВА Н.В.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Аминотрансферазы, занимающие важное место среди биокатализаторов, играют ключевую роль в обмене веществ, объединяя в единое целое белковый, углеводный, жировой обмен и цикл трикарбоновых кислот. Учитывая исключительную роль аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ) в обмене основных метаболитов клетки, активность этих ферментов используют в качестве биохимического индикатора физиологического статуса и клинического индикатора стрессового состояния, вызванного заболеванием или интоксикацией у ряда организмов, в том числе и у рыб. Сведения об активности аминотрансфераз в онтогенезе рыб немногочисленны (Luskova et al., 1995; Seoka, 1997; Srivastava et al., 1999; Коновалов, 1979, 1980, 1986), хотя исследования в этом направлении играют немаловажную роль в углублении знаний в области физиологии и биохимии развития ценных промысловых видов рыб. Обсуждается возможность применения данных об активности АсАТ и АлАТ для диагностики болезней рыб (Engelhardt et al., 1991), а также для оценки качества сперматозоидов рыб и жизнеспособности яиц (Ciereszko, Dabrowski, 1994; Lahnsteiner et al., 1998; 1999). Уровень активности АлАТ и АсАТ используют как индикатор присутствия ксенобиотиков в организме рыб (Yang et al., 1993; Коновец и др., 1994; Beyer et al., 1996; Murata et al., 1996) и компенсаторных механизмов их интоксикации (Philip, Rajasres, 1996), для оценки степени загрязнения водной среды разного рода токсическими веществами (Кусень и др., 1979; Gill et al., 1990; Soimasuo, et al., 1995; Petanen et al., 1996; Poleksic, Karan, 1999; Sullivan, Lydy, 1999; Saha et al., 2000; Pacheco, Santos, 2001; Desmet, Blust, 2001). В настоящее время все глубже исследуется адаптивная роль ферментов аминокислотного обмена в правильном подборе кормов при промышленном выращивании рыб на рыбоводных заводах (Fynnaikins et al., 1995; Shimeno et al., 1997; Sánchezmuros et al., 1998; Meton et al., 1999; Gallagher et al., 2001). АлАТ и АсАТ используются в качестве генетических маркеров при анализе популяций рыб (Arai et al., 1995; Gelwick et al., 1995; Hotz et al., 1997; Голованова и др., 1997).

Исходя из вышеизложенного, исследование физико-химических свойств аминотрансфераз рыб, представляется весьма интересным как с точки зрения сравнительной биохимии, так и с практической стороны, так как аминотрансферазы часто используются в качестве маркеров физиологического состояния рыб. Учитывая экономическую ценность такого вида рыб как кета, и необходимость контроля воздействия многочисленных факторов внешней среды при ее искусственном воспроизводстве на рыбоводных заводах и в период морского нагула рыб, мы поставили задачу исследовать изменения активности практически не изученных у рыб форм АлАТ и АсАТ – ферментов-маркеров физиологического состояния и адаптационных реакций организма, в раннем онтогенезе кеты, включая такие периоды развития, как эмбриональный, личиночный и мальковый, а также у взрослых рыб в связи с развитием ряда патологических явлений. Так как закономерности регуляции функций у рыб с участием эндогенных опиоидных пептидов и, особенно, при экзогенном введении их стабильных синтетических аналогов, проблема новая и весьма актуальная, представляется весьма интересным и полезным изучить воздействие синтетического аналога лей-энкефалина даларгина на активность аминотрансфераз и их субклеточную локализацию в икре и мальках рыб.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение биохимических свойств АсАТ и АлАТ – ферментов-маркеров физиологического состояния и адаптационных реакций организма у рыб и выявление роли этих ферментов в метаболизме лососевых.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать динамику изменения биохимических показателей и фракционного состава растворимых белков в раннем онтогенезе кеты, включая такие периоды развития, как эмбриональный, личиночный и мальковый и сопоставить ее с изменениями активности аминотрансфераз в эти периоды развития.
2. Изучить физико-химические характеристики АлАТ и АсАТ рыб, а именно: зависимость активности данных ферментов от pH инкубационной среды и концентрации субстратов и белка в ней, а также времени инкубации; выявить субклеточную локализацию аминотрансфераз в зародышах и мальках форели; наличие молекулярных форм АсАТ в постлизосомальной и митохондриальной фракциях зародышей форели, равно как и величины их изоэлектрических точек.
3. Проанализировать изменение активности аминотрансфераз в раннем онтогенезе кеты, и выявить связь ее динамики с биологическими особенностями исследованных стадий развития.
4. Изучить уровень активности и соотношение исследуемых ферментов в тканях и органах кеты.
5. Изучить изменение активности аминотрансфераз и набора их молекулярных форм в связи с патологическими явлениями в тканях и органах кеты.
6. Исследовать влияние экзогенного физиологического регулятора - синтетического аналога лей-энкефалина даларгина на активность АлАТ и АсАТ в икре и мальках и субклеточную локализацию ферментов в зародышах и мальках радужной форели.

Научная новизна. Впервые получены данные о субклеточной локализации аминотрансфераз в зародышах и мальках форели, дана характеристика молекулярных форм АсАТ в постлизосомальной и митохондриальной фракциях зародышей форели и ряд других физико-химических параметров этих ферментов.

Впервые изучена активность аминотрансфераз в раннем онтогенезе кеты, включая такие периоды развития, как эмбриональный, личиночный и мальковый.

Впервые исследованы биохимические показатели нарушения обменных процессов в тканях и органах кеты на примере таких патологических явлений у рыб, как мышечная дегенерация, анатомические отклонения в строении семенников и жировая дистрофия печени.

Установлено влияние даларгина на активность АлАТ и АсАТ и их субклеточную локализацию в икре и мальках радужной форели.

Практическое значение работы. Полученные данные расширяют представления о роли АлАТ и АсАТ в качестве маркеров физиологического состояния и адаптационных реакций организма рыб.

Анализ полученных результатов показывает возможность использования данных об активности АлАТ и АсАТ для контроля воздействия многочисленных факторов внешней среды при искусственном воспроизводстве ценных промысловых рыб на рыбоводных заводах на ранних стадиях онтогенеза с целью своевременного прогнозирования выживаемости и роста за-

родышей и личинок, а так же использования их в качестве индикаторов оценки здоровья популяции при антропогенном загрязнении среды обитания.

Полученные данные о влиянии даларгина на физико-химические свойства АлАТ и АсАТ в метаболизме рыб подтверждают его роль в качестве регулятора жизнедеятельности хозяйственно ценных видов рыб.

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены на научных сессиях по итогам научно-исследовательской работы МПГУ в 1999-2001 годах. Кроме этого отдельные материалы диссертации были использованы в годовых отчетах ВНИРО за 2000-2001г.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 3 статьи и 2 сданы в печать.

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, обзора литературы, отражающего современные представления о роли АлАТ и АсАТ в определении физиологического статуса рыб, описания материалов и методов, результатов эксперимента и их обсуждения, заключения и выводов. Диссертационная работа изложена на 166 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц, 38 рисунков. Список цитируемой литературы включает 324 названия.

Экспериментальная часть.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили развивающаяся икра на стадии пигментации глаз, личинки (в возрасте 17, 34, 70 и 80 суток после вылупления из икры) и мальки кеты *Oncorhynchus keta* в период начала и завершения ската из пресных вод в море, собранные на Охотском лососевом рыбноводном заводе (о. Сахалин). Для определения активности АлАТ и АсАТ в тканях и органах кеты пробы были собраны в период завершения преднерестовой миграции в восточно-сахалинской промысловой подзоне Охотского моря. Определение воздействия даларгина на уровень активности исследуемых ферментов проводилось на икре и мальках радужной форели *Parasalmo mykiss*, доставленных с Адлеровского лососевого рыбноводного завода.

Анализ общего химического состава биологического материала проводили по следующей схеме (рис.1). Определение липидов проводили по методу Фолча (Folch et al., 1951) в модификации Лапина, Черновой (Лапин, Чернова, 1970), растворимых углеводов по методу Хагедорна-Иенсена (Филиппович и др., 1982), аминного азота с помощью реактива Несслера (Кочетов, 1980), ДНК и РНК по спектрофотометрическому методу Шмидта-Таннгаузера (Филиппович и др., 1982).

Определение активности АлАТ и АсАТ проводили колориметрическим методом Райтмана и Франкеля (Reitman, Frankel, 1957) в модификации Коровкина (Иванов и др., 1974).

Субклеточные фракции выделяли из эмбрионов и мальков радужной форели методом дифференциального центрифугирования (Водолеев, 1977; Банников, 1983). Эмбрионы извлекали из икринок хирургическим методом, отделяя желток от зародыша на часовом стекле на холоду. Аналитический электрофорез растворимых белков кеты на ранних этапах онтогенеза проводили по методу Дэвиса (Davis, 1964).

Препаративное изоэлектрофокусирование АлАТ и АсАТ печени кеты и АсАТ постлизосомальной и митохондриальной фракций зародышей радужной форели в слое ультрадекса фирмы «ЛКВ» осуществляли на приборе «Multiphor» («ЛКВ», Швеция) по методу Остермана (Остерман, 1983).

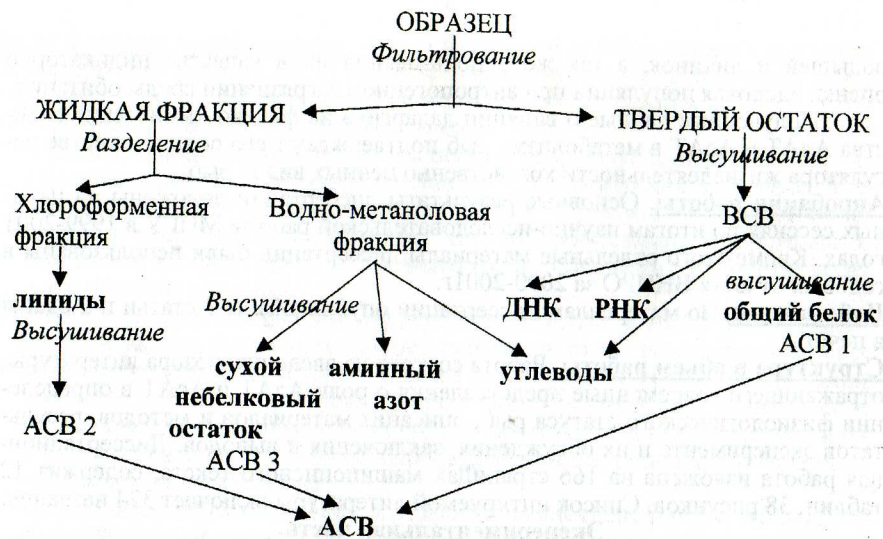


Рис. 1. Схема работы с образцами для определения химического состава кеты в раннем онтогенезе.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КЕТЫ *Oncorhynchus keta* (Walbaum) В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ.

Результаты исследования химического состава икры, личинок и мальков кеты (табл. 1) позволили проследить динамику содержания влаги, липидов, белков, углеводов, аминного азота и нуклеиновых кислот, охарактеризовать ключевые обменные процессы на ранних этапах онтогенеза кеты, что явилось основой для изучения аминотрансфераз. Изменения основных биохимических показателей кеты отражают закономерности физиологических процессов при нормальной дифференцировке тканей, органов и систем организма, а также его дальнейшего развития и роста в течение раннего онтогенеза.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АЛАТ И АСАТ РЫБ.

В предварительных экспериментах определяли оптимальное значение pH в икре и личинках кеты, а также в каждой исследуемой ткани (мышцы, печень, гонады, мозг, селезенка), которое соответствует максимальному значению активности фермента. Анализ оптимальных значений pH показал наличие не одного, а нескольких пиков активности ферментов, причем количество таких пиков варьирует от 2 до 4 в зависимости от стадии развития и исследуемой ткани. Полученные данные свидетельствуют о тканеспецифичности аминотрансфераз у кеты, которая выражается в разном наборе этих ферментов, отличающихся оптимумами pH и уровнем их максимальной активности в каждой исследованной ткани, причем значения оптимумов pH исследованных энзимов в тканях взрослых рыб не совпадают с таковыми в икре и личинках.

Результаты по субклеточному распределению активности АЛАТ и АСАТ в зародышах и мальках радужной форели представлены на рис. 2. Так, в раннем онтогенезе радужной форели выявлены существенные качествен-

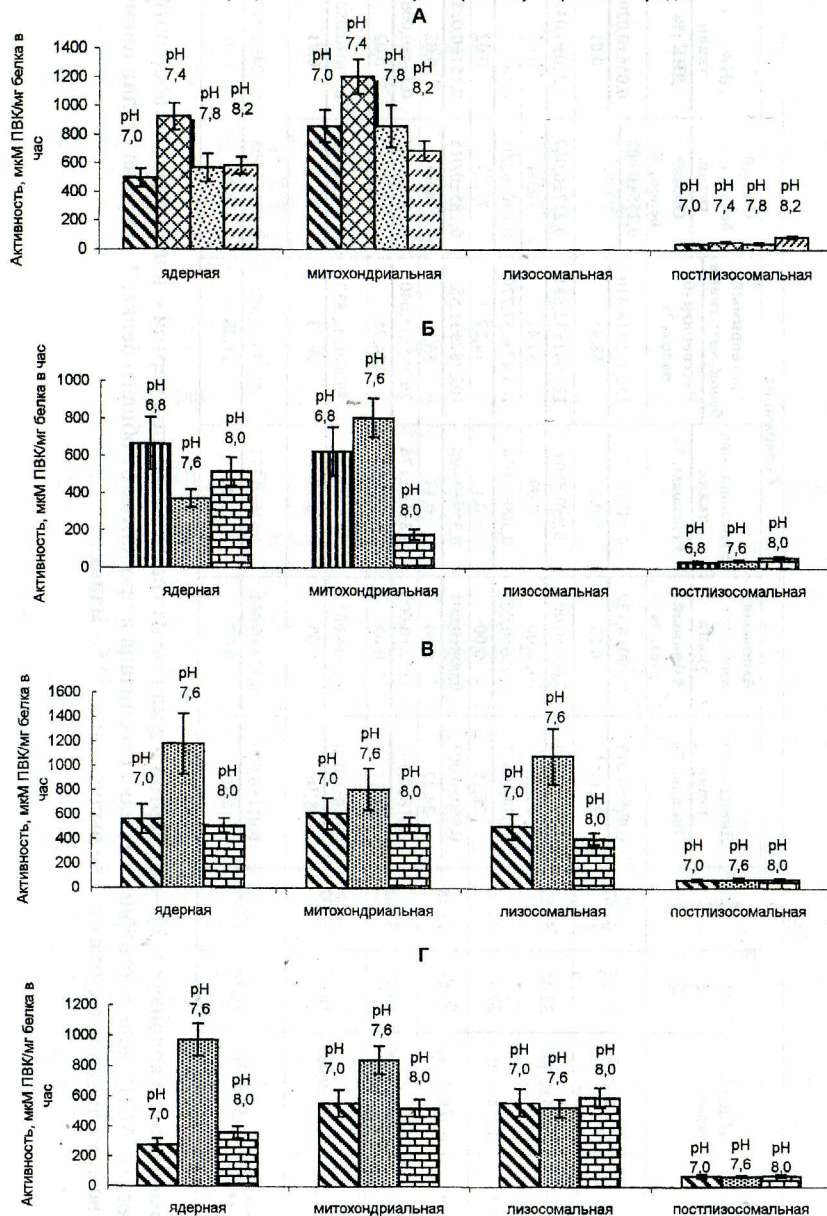
Таблица 1.

Динамика биохимических показателей кеты *Oncorhynchus keta* в раннем онтогенезе

возраст	АСВ, г/г ткани	АСВ, %	Влага, %	Липиды, г/г ткани Липиды, %	Аминный азот, мг/г ткани Аминный азот, %	Углеводы, мг/г ткани Углеводы, %	Содержание		Общий белок, г/г ткани Общий белок, %	ДНК, мг/г ткани ДНК, %	РНК, мг/г ткани РНК, %
							Растворимый белок, мг/г ткани Растворимый белок, %	Общий белок, %			
Икра*	0,353±0,053	35,33	64,67	0,098±0,013 27,11	0,109±0,132 0,03	0,588±0,132 0,17	150,131±18,410 58,95	0,255±0,007 72,09	0,056±0,020 0,01	1,951±0,42 0,2	
17 сут**	0,325±0,007	32,48	67,52	0,097±0,003 28,20	0,009±0,001 0,00	0,290±0,04 0,09	121,541±32,631 53,41	0,227±0,007 70,04	0,210±0,041 0,02	0,951±0,178 0,1	
34 сут**	0,274±0,018	27,44	72,56	0,079±0,017 28,15	0,006±0,001 0,00	0,309±0,054 0,11	145,473±57,770 74,22	0,196±0,001 71,39	0,167±0,013 0,02	0,682±0,127 0,07	
70 сут**	0,248±0,018	24,84	75,16	0,060±0,003 24,32	0,008±0,001 0,00	0,359±0,098 0,14	103,782±31,583 56,15	0,185±0,015 74,60	0,151±0,033 0,02	1,216±0,228 0,1	
80 сут**	0,163±0,006	16,35	83,65	0,018±0,002 10,11	0,058±0,009 0,03	0,831±0,176 0,51	36,355±14,040 24,76	0,145±0,007 88,93	0,174±0,006 0,02	1,971±0,255 0,2	
Начало ската***	0,167±0,009	16,68	83,32	0,018±0,010 8,16	0,054±0,011 0,03	1,657±0,152 0,99	39,660±12,833 26,33	0,151±0,007 90,29	0,130±0,050 0,01	2,387±0,759 0,2	
Окончание ската***	0,158±0,011	16,40	83,60	0,011±0,003 6,90	0,115±0,061 0,07	1,636±0,273 1,04	29,783±9,652 21,28	0,139±0,005 88,66	0,104±0,032 0,01	2,293±0,481 0,2	

Примечание: в колонках 5-11 — над чертой в г или мг на грамм ткани, под чертой — в процентах от абсолютно сухого вещества (АСВ); доля растворимого белка рассчитана в процентах от общего белка; * — икра на стадии пигментации глаз; ** — возраст личинок в сутках после вылупления; *** — мальки.

Рис.2. Активность аланинаминотрансферазы (А, В) и аспаргатаминотрансферазы (Б, Г) (мкМ ПВК/мг белка в час) в субклеточных фракциях зародышей (А, Б) и мальков (В, Г) радужной форели при различных оптимумах pH инкубационной среды.



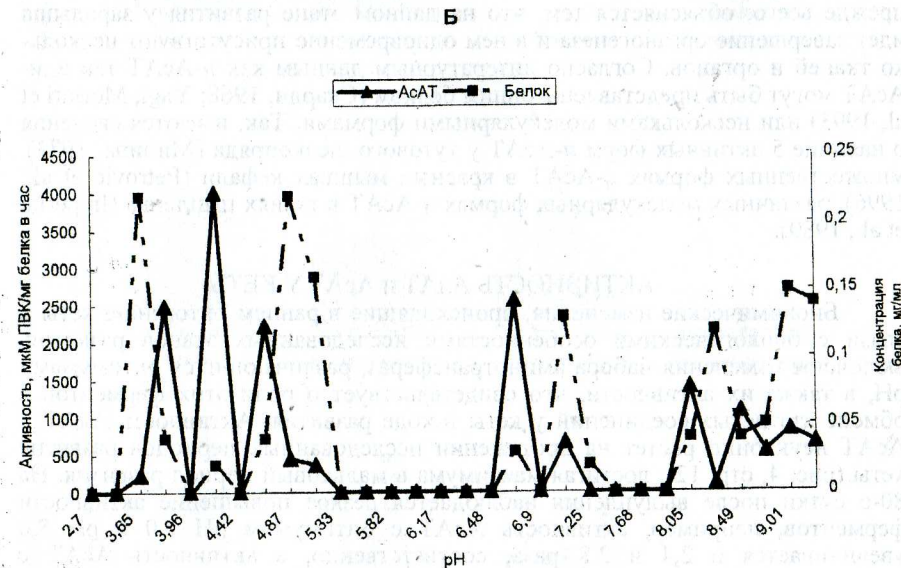
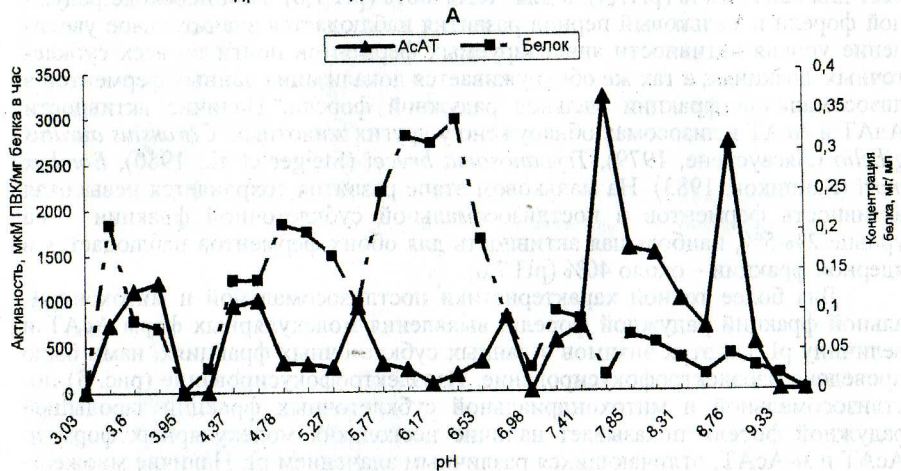
ные и количественные различия в активности исследуемых аминотрансфераз и их распределении по субклеточным фракциям. В зародышах радужной форели исследуемые ферменты локализируются в ядерной, митохондриальной и постлизосомальной фракциях, причем активность энзимов в постлизосомальной фракции невелика и составляет от 2,5% до 7% от общей активности. Максимум их активности выявлен в митохондриальной фракции, что составляет для АлАТ 55% (pH 7,4), а для АсАТ 66% (pH 7,6). При переходе радужной форели в мальковый период развития наблюдается значительное увеличение уровня активности анализируемых ферментов почти во всех субклеточных фракциях, а так же обнаруживается локализация данных ферментов в лизосомальной фракции мальков радужной форели. Наличие активности АлАТ и АсАТ в лизосомах обнаружено у других животных: *Carassius auratus gibelio* (Лясаускене, 1979), *Trypanosoma brucei* (Steiger et al., 1980), *Bombyx mori* (Банников, 1983). На мальковом этапе развития сохраняется невысокая активность ферментов в постлизосомальной субклеточной фракции – на уровне 2%-5%, наибольшая активность для обоих ферментов наблюдается в ядерной фракции – около 40% (pH 7,6).

Для более точной характеристики постлизосомальной и митохондриальной фракций радужной форели, выявления молекулярных форм АсАТ и величину pI для этих энзимов в данных субклеточных фракциях, нами было проведено изоэлектрофокусирование. Изоэлектрофокусирование (рис. 3) постлизосомальной и митохондриальной субклеточных фракций зародышей радужной форели показывает наличие нескольких молекулярных форм α -АсАТ и m -АсАТ, отличающихся различным значением pI . Наличие множественных форм у цитозольного и митохондриального изоферментов АсАТ, прежде всего, объясняется тем, что на данном этапе развития у зародыша идет завершение органогенеза и в нем одновременно присутствуют несколько тканей и органов. Согласно литературным данным как α -АсАТ так и m -АсАТ могут быть представлены одним белком (Скарди, 1968; Yagi, Moriuti et al., 1993) или несколькими молекулярными формами. Так, имеются сведения о наличии 5 активных форм α -АсАТ у тутового шелкопряда (Минина, 1973), множественных формах α -АсАТ в красных мышцах кефали (Petrovic et al., 1996), различных молекулярных формах α -АсАТ в тканях цыпленка (Imperial et al., 1989).

АКТИВНОСТЬ АлАТ и АсАТ У КЕТЫ

Биохимические изменения, происходящие в раннем онтогенезе кеты в связи с биологическими особенностями исследованных этапов развития, включают изменения набора аминотрансфераз, различающихся оптимумами pH, а также их активности, что свидетельствует о роли этих ферментов в обмене азотистых соединений у кеты в ходе развития. Активность АлАТ и АсАТ неуклонно растет на протяжении исследованных периодов развития кеты (рис. 4, стр. 12), достигая максимума в мальковый период развития. На 80-е сутки после вылупления наблюдается резкое повышение активности ферментов, например, активность АлАТ с оптимумом pH 7,0 и pH 8,0 увеличивается в 2,4 и 2,8 раза, соответственно, а активность АсАТ с оптимумом pH 8,0 – в 17 раз по сравнению с предыдущим этапом развития, что свидетельствует о резкой интенсификации азотистого обмена, так как личинки поднимаются “на плав”, увеличивается их двигательная активность

Рис. 3. Изoeлектрические точки АсАТ в постлизосомальной (А) и в митохондриальной фракции (Б) зародышей радужной форели



и начинается смешанное питание. Активность АлАТ форели с оптимумом pH 7,0 на мальковом этапе онтогенеза превышает таковую в икре в 5,6 раза, а АсАТ с оптимумами pH 7,6 и 8,0 на стадии мальков возрастает в 4,8 и 4,4 раза соответственно по сравнению с икрой. Сопоставление динамики изменения активности ферментов с динамикой изменения содержания белка и аминного азота при использовании коэффициента корреляции показывает, что для всех исследованных АлАТ и АсАТ наблюдается отрицательная корреляция между активностью фермента и содержанием растворимого белка в раннем онтогенезе кеты. Положительный коэффициент корреляции между активностью фермента и содержанием аминного азота обнаружен для всех АлАТ и двух АсАТ (pH 7,6 и 8,0). АсАТ с оптимумом pH 7,0 отличается от других изученных ферментов не только тем, что динамика ее активности не коррелирует с изменением содержания аминного азота, но и тем, что у мальков ее активность значительно ниже, чем других изученных ферментов. Это может быть связано с особенной метаболической ролью этой АсАТ в тканях личинок кеты в период подготовки к смолтификации.

Таким образом, полученные нами данные позволяют заключить, что биохимические изменения, происходящие в раннем онтогенезе кеты и связанные с биологическими особенностями исследованных этапов развития, включают изменение набора аланинаминотрансфераз и аспаргатаминотрансфераз, различающихся оптимумами pH, а также их активности, что свидетельствует о роли этих ферментов в обмене азотистых соединений у кеты в ходе развития.

Результаты, характеризующие активность АлАТ и АсАТ в тканях и органах кеты при оптимальных значениях pH, представлены в табл.2.

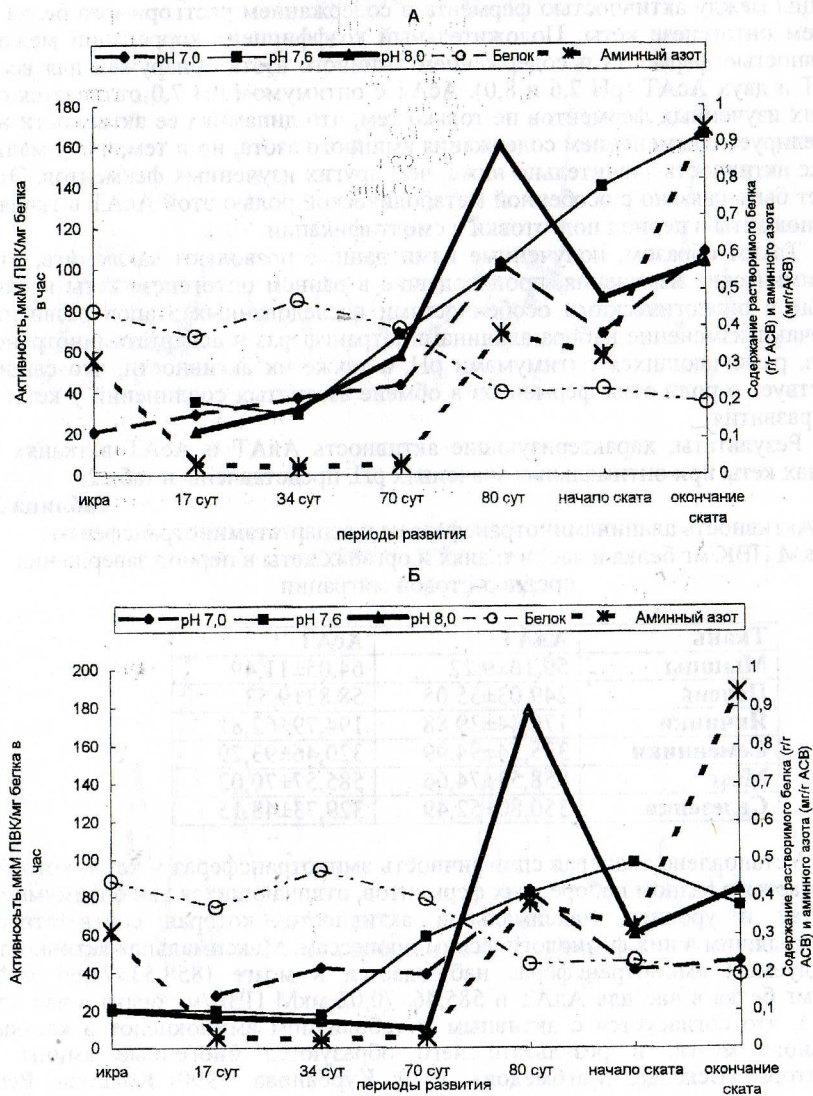
Таблица 2.

Активность аланинаминотрансферазы и аспаргатаминотрансферазы (мкМ ПВК/мг белка в час) в тканях и органах кеты в период завершения преднерестовой миграции

Ткань	АлАТ	АсАТ
Мышцы	59,16±9,22	64,05±11,49
Печень	249,03±35,05	58,83±9,53
Яичники	170,44±39,88	194,79±62,81
Семенники	335,54±94,99	320,46±93,29
Мозг	858,53±74,66	585,57±70,02
Селезенка	350,80±52,49	329,73±48,15

Установлена тканевая специфичность аминотрансфераз у кеты, которая выражается в разном наборе этих ферментов, отличающихся как оптимумами pH, так и уровнем максимальной активности, которая соответствует происходящим в них физиологическим процессам. Максимальная активность исследуемых аминотрансфераз наблюдается в мозге (858,53±74,66 мкМ ПВК/мг белка в час для АлАТ и 585,46±70,02 мкМ ПВК/мг белка в час для АсАТ), что согласуется с активным метаболизмом аминокислот в клетках головного мозга, в результате чего образуются биогенные амины и медиаторы (Векслер, Магомедова, 1979; Курбанова, 1990; Кольман, Рем, 2000).

Рис. 4. Изменение активности аланинаминотрансферазы (А), аспартатаминотрансферазы (Б) (мкМ ПВК/мг белка в час) и содержания растворимого белка (г/г АСВ) и аминного азота (мг/г АСВ) в раннем онтогенезе кеты



Низкий уровень активности мышечных АЛАТ ($59,16 \pm 9,22$ мкМ ПВК/мг белка в час) и АсАТ ($64,05 \pm 11,49$ мкМ ПВК/мг белка в час) свидетельствует о замедленном темпе белкового обмена в мышцах кеты в период роста гонад. Это согласуется с низкой концентрацией в мышечной ткани тех свободных аминокислот (аланина и аспарагиновой кислоты), которые являются субстратами данных ферментов (Яковенко и др., 1982).

В яичниках активность исследуемых ферментов находится на уровне 170-190 мкМ ПВК/мг белка в час, а в семенниках - превышает таковую в 1,6-2 раза. Такой факт можно объяснить тем, что яичники кеты в период окончания морского нагула находятся на этапе окончания вителлогенеза, в то время как состояние половых желез самцов характеризуется на этой стадии зрелости гонад как период начала активного сперматогенеза (Пукова, 2002), в процессе которого происходят интенсивные процессы переаминирования.

Активность АЛАТ печени в 4 раза больше активности АсАТ. Это связано, по-видимому, с высокой способностью печени к глюконеогенезу, в процессе которого происходит синтез глюкозы, в основном из аланина (Марри и др., 1993).

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ В СВЯЗИ С ПАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЯВЛЕНИЯМИ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ КЕТЫ.

В доступной нам литературе обсуждается возможность применения данных об активности АЛАТ и АсАТ для диагностики болезней рыб и оценки степени развития заболевания (Engelhardt et al., 1991; Carbis et al., 1997; Wood et al., 1999). Эти сведения послужили основой для применения активности маркерных ферментов в оценке таких патологических явлений у рыб, как дегенеративные изменения мышц, жировая дистрофия печени и анатомические отклонения в строении семенников, обусловленные резорбцией части генеративной ткани.

Так, при дегенерации мышц (рис. 5) наблюдается увеличение активности исследуемых аминотрансфераз в мышцах (на 47-54%) и в яичниках (АЛАТ на 150%, АсАТ на 124% по сравнению с нормой), что несомненно связано с увеличением процессов катаболизма белков мышечной ткани (Евгеньева, 1989, 2000; Евгеньева и др., 1989) и усиленной резорбцией ооцитов (Микодина и др., 2000; Пукова, 2002). В семенниках с анатомическими отклонениями активность трансфераз на 60-65% ниже, по сравнению с нормальными молоками, что полностью соответствует мнению о том, что активность АсАТ является биохимическим индикатором качества сперматозоидов рыб (Lahnsteiner et al., 1998; 1999). Жировая дистрофия печени сопровождается постепенным уменьшением активности АсАТ в соответствии со степенью деструкции ее клеток. Так в мозаичной печени активность АсАТ уменьшается на 18%, в анемичной - на 22%, а в анемично-рыхлой - на 75%, что соответствует степени разрушения клеточных мембран и миграции фермента в сыворотку крови (Савкин, 1971; Carbis et al., 1997). В мозаичной и анемичной печени активность АЛАТ, также как и АсАТ сохраняет тенденцию к уменьшению, в то время как в анемично-рыхлой печени, происходит резкое увеличение активности этого фермента (на 34% по сравнению с нормой). В связи с этим мы предположили, что резкое изменение активности АЛАТ и АсАТ в анемично-рыхлой печени, по сравнению с нормальной, связано с изменением молекулярных форм этих ферментов. В нормальной печени наблюдается три молекулярные формы АсАТ (рИ 4,21; 6,87 и 7,90) и одна АЛАТ

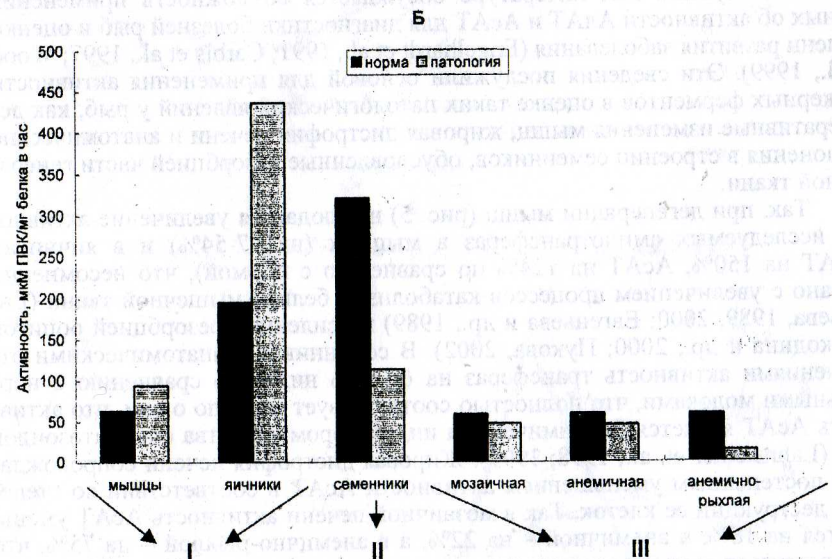
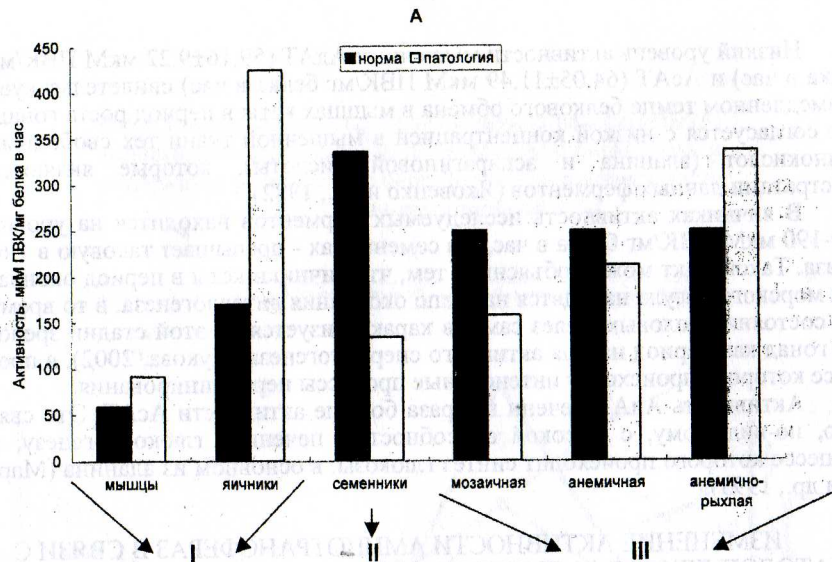


Рис. 5. Активность аланинаминотрансферазы (А) и аспаратаминотрансферазы (Б) (мкМ ПВК/мг белка в час) в норме и при дегенеративных изменениях мышечной ткани (I), анатомических отклонениях в строении семенников (II) и на разных стадиях жировой дистрофии печени (III).

(рI 8,12) (рис. 6). В анемично-рыхлой печени изменяется набор молекулярных молекулярных форм АсАТ и АлАТ. АсАТ с рI 6,81 исчезает, а белки с рI 4,21 и 7,90 остаются. Количество молекулярных форм АлАТ в анемично-рыхлой печени возрастает, полностью изменяются их изоэлектрические точки (рI 4,09; 4,57 и 7,29) и увеличивается уровень их активности. Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными об увеличении активности АсАТ в плазме крови в результате миграции туда митохондриального изофермента из поврежденной печени (Petrovic et al., 1999).

ВЛИЯНИЕ ДАЛАРГИНА НА АКТИВНОСТЬ АМИНОТРАНСФЕРАЗ В ОНТОГЕНЕЗЕ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ *Parasalmo mykiss*.

Результаты эксперимента (табл.3) показывают, что даларгин активизирует работу АлАТ и АсАТ в икре радужной форели на стадии пигментации глаз.

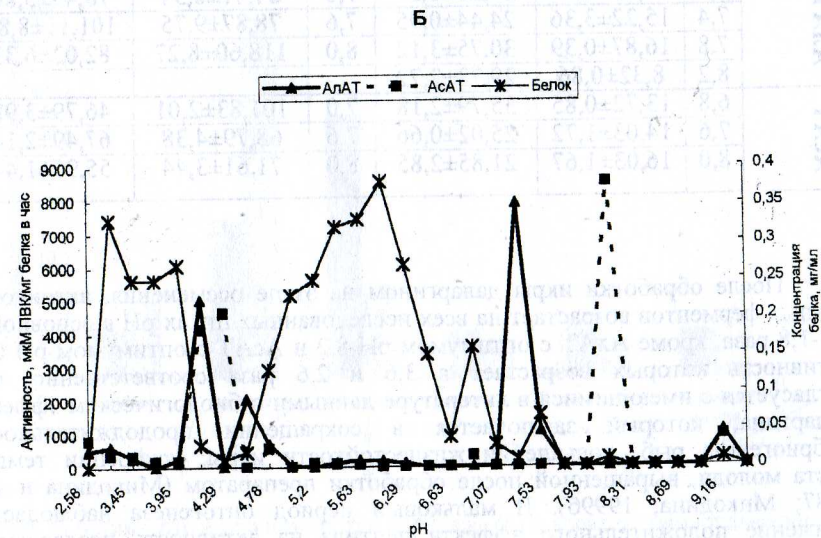
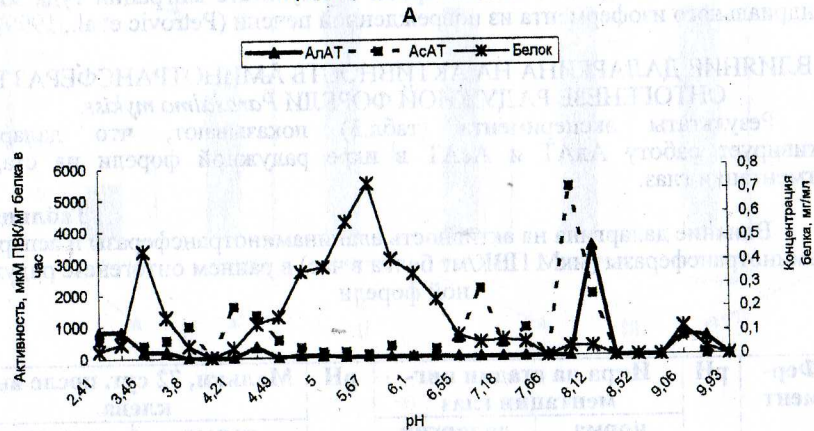
Таблица 3.

Влияние даларгина на активность аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы (мкМ ПВК/мг белка в час) в раннем онтогенезе радужной форели

Фермент	рН	Икра на стадии пигментации глаз		рН	Мальки, 72 сут. после выклева	
		норма	даларгин		норма	даларгин
АлАТ	7,0	15,65±2,84	27,20±1,37	7,0	84,41±0,34	78,49±5,86
	7,4	15,22±3,36	24,44±0,95	7,6	78,87±9,75	101,11±8,86
	7,8	16,87±0,39	30,75±3,12	8,0	118,60±8,27	82,02±6,33
	8,2	8,32±0,86	29,73±2,72			
АсАТ	6,8	13,72±0,85	35,79±2,18	7,0	101,83±2,01	46,79±3,98
	7,6	14,03±1,72	25,02±0,66	7,6	68,79±4,38	67,49±2,14
	8,0	16,03±1,67	21,85±2,85	8,0	71,61±3,44	55,95±1,44

После обработки икры даларгином на этапе осеменения, активность данных ферментов возрастает на всех исследованных пиках рН в основном в 1,3-1,8 раза, кроме АлАТ с оптимумом рН 8,2 и АсАТ с оптимумом рН 6,8, активность которых возрастает в 3,6 и 2,6 раза соответственно, что согласуется с имеющимися в литературе данными о биологическом эффекте даларгина, который заключается в сокращении продолжительности эмбриогенеза рыб, повышении жизнестойкости икры, ускорении темпов роста молоди, выращенной после обработки препаратом (Микодина и др., 1987; Микодина, 1999б). В мальковый период онтогенеза наблюдается снижение положительного эффекта пептида на активность исследуемых энзимов, а в некоторых случаях – ингибирование активности АлАТ с оптимумом рН 8,0 в 1,4 раза и АсАТ с оптимумом рН 7,0 в 2,3 раза, что согласуется, с одной стороны, с физиологией роста “даларгиновой” форели в этот период развития (Микодина, 1999б) и, с другой стороны,

Рис.6. Изоэлектрические точки АлАТ и АсАТ в нормальной (А) и анемично-рыхлой (Б) печени кеты в период завершения преднерестовой миграции



способностью энкефалинов и их синтетических аналогов модулировать активность некоторых ферментов, в том числе АлАТ и АсАТ (Чазов и др., 1984). На уровне субклеточных фракций наибольший эффект ингибирования активности ферментов даларгин оказывает в ядрах и лизосомах радужной форели, в митохондриях — преимущественно ингибирующий, а в цитозоле — разнонаправленный эффект.

ВЫВОДЫ

- Изменение химического состава кеты в раннем онтогенезе свидетельствует о взаимопревращениях липидов и углеводов, растворимых белков и низкомолекулярных азотистых соединений, что косвенно подтверждает исключительную роль трансаминаз в этих процессах.
- Физико-химическая характеристика аланин- и аспаратаминотрансфераз рыб, подчиняясь имеющимся представлениям о свойствах трансаминаз животных, имеет следующие особенности:
 - наличие нескольких оптимумов активности, лежащих в области рН от 6,6 до 8,4;
 - локализация в ядерной, митохондриальной, лизосомальной и постлизосомальной субклеточных фракциях;
 - существование множественных форм как цитозольной, так и митохондриальной аспаратаминотрансферазы, изоэлектрические точки которых лежат в кислой, нейтральной и щелочной области рН.
- Аланин- и аспаратаминотрансферазы в период раннего онтогенеза характеризуются:
 - 5 – 9-кратным увеличением активности и изменением набора аминотрансфераз, отличающихся оптимумами рН у кеты;
 - перераспределением локализации в субклеточных фракциях радужной форели.
- Уровень активности аланин- и аспаратаминотрансфераз специфичен в каждой ткани кеты, причем максимальный уровень отмечен в мозге, минимальный — в мышечной ткани.
- Активность аланин- и аспаратаминотрансфераз у кеты с различной патологией претерпевает существенные изменения, характер которых в каждой из исследованных тканей и органов индивидуален, а именно:
 - увеличение активности в мышцах и яичниках при дегенеративных изменениях мышечной ткани;
 - снижение активности в семенниках с различными анатомическими нарушениями в строении;
 - изменение активности, числа молекулярных форм трансаминаз и их изоэлектрических точек в печени при разной степени жировой дистрофии.
- Биологический эффект даларгина выражается в различном влиянии пептида на активность аминотрансфераз как в целом гомогенате икры и мальков радужной форели, так и отдельных субклеточных фракциях:

- а) даларгин усиливает активность аланин- и аспаргатаминотрансфераз в икре, но разнонаправленно действует на трансминазы мальков;
- б) в ядрах и лизосомах даларгин ингибирует активность трансминаз, в митохондриях - оказывает преимущественно ингибирующий, а в цитозоле - селективный эффект.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ.

1. Самсонова М.В., Минькова Н.О., Лаптева Т.И., Микодина Е.В., Филиппович Ю.Б. Динамика белкового комплекса в раннем онтогенезе кеты *Oncorhynchus keta* // Научные труды МПГУ, Сер. Естественные науки. М.: "Прометей". 2001. С.191-193. (0,2 п.л., доля авторского участия 80%).
2. Самсонова М.В., Минькова Н.О., Лаптева Т.И., Микодина Е.В. Биохимические показатели кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) в раннем онтогенезе // Мат. Межрегиональной конференции «Морфологические и физиологические особенности гидробионтов». М.: МГТА. 2002. С.71-83. (0,8 п.л., доля авторского участия 50%).
3. Микодина Е.В., Самсонова М.В., Лаптева Т.И. Активность аланин- и аспаргатаминотрансферазы в тканях и органах кеты *Oncorhynchus keta* в период морского нагула // Аналитическая и реферативная информация ВНИЭРХ. Рыбное хозяйство. Сер. Воспроизводство и пастбищное выращивание гидробионтов. 2002. Вып.4. С.12-23. (0,75 п.л., доля авторского участия 80%).

М.В. Самсонова