

тик фермент-мембранных комплексов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Коростелев С.Г. Температурная адаптация некоторых кишечных карбогидраз у рыб // Механизмы регуляции физиологических функций: Тез. докл. - Ленинград, 1988. - С. 53.
2. Коростелев С.Г., Егорова В.В. Исследование кишечной мальтазы карпа при разных температурах акклимации // VII Всесоюзная конференция по экологической физиологии и биохимии рыб: Тез. докл. - Ярославль, 1989. - ч. 2. - С. 215-216.
3. Коростелев С.Г., Егорова В.В. Температурные адаптации некоторых ферментов кишечных микроворсинок карповых рыб // XV Всесоюзная конференция по физиологии пищеварения и всасывания: Тез. докл. - Краснодар, 1990. - С. 136.
4. Неваленный А.Н., Коростелев С.Г., Зайцев В.Ф. Влияние температуры на пищеварительно-транспортную функцию кишечника рыб // IV Всесоюзное совещание по рыбохозяйственному использованию теплых вод: Тез. докл. - Курчатов, 1990. - С. 155-156.
5. Коростелев С.Г. Температурные зависимости и энергия активации мальтазы слизистой кишечника карпа, экспонированного при различных температурах среды // Краткие результаты научной деятельности Астраханского технического института рыбной промышленности и хозяйства за 1989-1990 г.г.: Астрахань, 1990.
6. Коростелев С.Г., Егорова В.В., Уголев А.М. О температурных адаптациях кишечной мальтазы карповых рыб // Журн. эвол. биох. и физиол., № 6, 1990. - С. 93-94.
7. Неваленный А.Н., Зайцев В.Ф., Коростелев С.Г. Динамика уровня активности карбогидраз в кишечнике белого толстолобика при изменении температуры // Сб. научн. тр. / Вопросы экологии гидробионтов, В: ИИПРХ - вып. 64, 1991. - С. 69-70.

ЛПГПХ ЗАК 137 ТИР 120 ССЗСЗСГ.

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПРУДОВОГО  
РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА /ВНИИПРХ/

На правах рукописи

КОРОСТЕЛЕВ СЕРГЕЙ ГЕОРГИЕВИЧ

УДК 597:591.132.05

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ  
ХАРАКТЕРИСТИКИ КИШЕЧНИКА КАРПОВЫХ РЫБ

03.00.10 - ихтиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 1992



Работа выполнена на кафедре ихтиологии и гидробиологии  
Астраханского технического института рыбной промышленности и  
хозяйства / АТИРПИХ /

научные руководители: кандидат биологических наук, доцент  
В.Ф.Зайцев  
академик АН СССР А.М.Уголев

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профес-  
сор М.А.Щербина  
доктор биологических наук, ведущий  
научный сотрудник Ю.Г.Юровицкий

Ведущее учреждение: Каспийский научно-исследовательский  
институт рыбного хозяйства /КаспНИРХ/

Защита состоится "21" апреля 1992 г. в "11" час. на  
заседании Специализиро-  
ванном научно-исследова-  
тельском /ВНИИПРХ/ по адре-  
су: Астраханский район, п.Рыбное,  
С диссертацией м

Автореферат разо

Ученый секретарь  
специализирован  
кандидат биолог

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Интенсивный путь развития рыбного хозяйства внутренних водоемов возможен лишь при комплексном учете влияния факторов среды на процесс воспроизводства численности и биомассы рыб. При этом особое внимание должно уделяться процессу усвоения пищи, так как в настоящее время затраты, связанные с кормлением рыбы в товарном рыбоводстве, составляют не менее 60% себестоимости производства /Комбикорма для рыб: производство и методы кормления, 1989/.

Современный этап исследования процесса усвоения пищи характеризуется значительными успехами, которые связаны с открытием А.М.Уголевым в конце 50-х годов механизма мембранного пищеварения, который обеспечивает расщепление около 80-90% химических связей молекул биополимеров /Уголев, 1960а,б/. Этот фундаментальный механизм обнаружен у животных различных таксономических групп, в том числе и у рыб /Берман, 1964, 1972; Пегель, 1973, 1978; Пегель и др., 1971, 1972, 1976; Щербина и др., 1976, 1977; Кузьмина, 1978, 1986а; и др./ Однако, влияние факторов среды на мембранное пищеварение у рыб исследовано недостаточно, о чем свидетельствуют сообщения последних лет /Ильина, Турецкий, 1987, 1988; Пономарев, 1989; Соболев, 1991/.

В связи с тем, что мембранное пищеварение представляет собой совокупность процессов, обеспечивающих ферментативное расщепление биополимеров, особый интерес вызывает способность кишечных ферментов к адаптации в условиях многократных суточных и сезонных изменений температуры среды. Тем не менее, до последнего времени влияние температуры акклимации на активность и свойства энтеральных ферментов рыб не исследовано; крайне мало сведений о температурных адаптациях мембранных

№:



ферментов с учетом роли различных компонентов фермент-мембранных комплексов энтероцитов. Имеющиеся данные не позволяют сделать вывод о механизмах влияния температуры среды обитания на процессы мембранного пищеварения у рыб в течение жизненного цикла. Сведения, полученные при исследовании этой проблемы, необходимы для решения ряда теоретических и прикладных проблем питания и пищеварения у рыб. Кроме того, современные технологии рыборазведения позволяют регулировать абиотические факторы среды, поэтому выдвигается новая задача - определение оптимальных значений этих факторов и температуры в первую очередь.

Цель и задачи исследований. Целью работы являлось изучение влияния температуры среды обитания на процессы мембранного пищеварения у рыб, на примере карпа *Cyprinus carpio* L. и белого толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.).

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать весовые и линейные характеристики кишечника карпа при изменении температуры среды содержания рыб.
2. Изучить влияние температуры акклимации на активность и свойства кишечных ферментов карпа.
3. Охарактеризовать влияние температуры и голодания на функциональную активность и структуру кишечника карпа.
4. Сравнить физико-химические свойства мембранной, детергентной и протеазной форм кишечной мальтазы различных карповых рыб.

Научная новизна и практическая значимость работы. Впервые при акклимации рыб к различным температурам проведено одновременное исследование как весовых и линейных характеристик кишечника, так и активности, и свойств ферментов клеток слизистой оболочки кишечника карпа. Установлено, что изменение темпера-

туры акклимации в диапазоне 8-28°C не вызывает адаптивных сдвигов в уровне активности и свойствах сахаразы и мальтазы, осуществляющих мембранный гидролиз углеводов в кишечнике. Высказана гипотеза, что гомеостаз мембранного пищеварения при изменении температуры акклимации поддерживается не за счет регуляции активности и свойств кишечных ферментов, а за счет изменения массы слизистой оболочки кишечника: при понижении температуры она увеличивается, а при повышении - уменьшается.

На основе исследования физико-химических свойств мембранной, детергентной и протеазной форм кишечной мальтазы карповых рыб установлены видовые различия фермент-мембранного комплекса, а также внутривидовые особенности у карпов украинской и ропшинской породных групп, которые исчезают при разрушении комплекса фермент-мембрана. Выявленные различия свидетельствуют о фенотипических температурных адаптациях ферментных систем кишечника рыб.

Полученные данные позволяют более полно охарактеризовать закономерности гидролиза углеводов и приблизиться к пониманию механизмов эволюционных и адаптивных перестроек пищеварительной системы при изменениях температуры среды обитания рыб. Установленные факты могут быть использованы при проведении селекционной работы и для оптимизации температурных условий выращивания карповых рыб.

Апробация работы. Материалы работы докладывались и представлялись на Ленинградской городской конференции молодых ученых и специалистов "Механизмы регуляции физиологических функций" /Ленинград, /1988/, на XXXVII научно-методической конференции профессорско-преподавательского состава АТИРПИХ /1988/, на VII Всесоюзной конференции по экологической физиологии и



биохимии рыб /Нрославль, 1989/, на XV Всесоюзной конференции по физиологии пищеварения и всасывания /Краснодар, 1990/, на IУ Всесоюзном совещании по рыбохозяйственному использованию теплых вод /Курчатов, 1990/, расширенном заседании лаборатории питания института физиологии им.И.П.Павлова АН СССР /июль, 1990/ и на расширенном заседании методсовета "Корма, кормление и кормопроизводство для рыб" НИ "Аквакультура" НПО по рыбоводству /июнь, 1991/.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ.

Объем диссертации. Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста, иллюстрирована 28 рисунками, содержит 5 таблиц. Список литературы включает работы 130 отечественных и 109 иностранных авторов.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в течение 1986-1991 г.г. в лабораторных условиях на 655 экз. сеголетков и годовиков карпа, выращенных в прудах Астраханской и Ленинградской обл., а также 78 экз. сеголетков белого толстолобика, выращенных в Астраханской обл. Рыб, отловленных неводом, в течение двух недель выдерживали в аквариумах объемом 200 л с хорошо аэрируемой водой при температуре 18°C. Затем делили на три группы: для первой - температура воды в аквариуме повышалась до 28°C, для второй - понижалась до 8 и 12°C для голодающих и питающихся рыб соответственно, для третьей /контрольной/ - не изменялась.

Исследование влияния температуры акклимации на морфо-функциональные характеристики кишечника карпа проводили через каждые 7 дней от начала эксперимента. Получение различных форм

кишечной мальтазы карпа украинской, ропшинской породных групп и белого толстолобика осуществляли из препаратов слизистой оболочки кишечника рыб, выловленных непосредственно из прудов.

Рыб обездвигивали, проводили морфометрический анализ, извлекали кишечник и промывали его 20 мл охлажденного раствора Рингера для холоднокровных животных /рН - 7.4/. Кишечник измеряли, взвешивали и при помощи специального скребка снимали слизистую оболочку, которую взвешивали и немедленно замораживали в сухом льду при температуре /-71°C/. Исходный ферментативно-активный препарат получали после разморозки слизистой оболочки и гомогенизации её в растворе Рингера в соотношении 1:9. Детергентную и протеазную формы мальтазы получали после обработки гомогенатов слизистой 1%-ным тритоном-X-100 или трипсином /1 мг на мл препарата/ соответственно и последующего центрифугирования при 100000 g в течение 30 мин, при этом активность этих форм фермента определяли в супернатанте. Под мембранной формой мальтазы подразумевали активность фермента, находящегося в осадке при ультрацентрифугировании, без предварительной обработки солюбилизирующими агентами /Кузьмина и др., 1981/.

Исследование влияния температуры на скорость ферментативных реакций проводили в диапазоне температур 0-75°C в специальном политермостате /Варламов и др., 1971/ в течение коротких интервалов времени /5-10 мин/. Мальтазную активность /КФ 3.2.1.20/ определяли при помощи глюкозооксидазного метода /Dahlquist, 1964/, сахаразную /КФ 3.2.1.48/ - методом Нельсона в модификации А.М.Уголева и Н.Н.Иезуитовой /1969/. В качестве субстратов использовали 55 мМ растворы мальтозы и сахарозы, приготовленные на растворе Рингера. Активность фермен-



тов выражали в мкмоль продуктов гидролиза, образовавшихся за 1 мин инкубации в расчете на 1 г влажного веса ткани /мкмоль. мин<sup>-1</sup>.г<sup>-1</sup>/. Энергию активации рассчитывали графическим способом Аррениуса. В целом выполнено 285 опытов и проведено более 6,2 тыс. биохимических анализов. Полученные результаты обрабатывали при помощи методов вариационной статистики /Закс, 1976/. Достоверность различий определяли с помощью критериев Стьюдента и Манна-Уитни.

### ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### Влияние температуры среды содержания и функционального состояния карпа на морфологические характеристики его кишечника

Известно, что характер питания и факторы среды оказывают существенное влияние на строение и функционирование пищеварительной системы рыб /обзоры: Краухин, 1963; Поляков, 1975; Щербина, 1973, 1984; Остроумова, 1983 и др./. В частности, для молоди карпа, выращиваемой в прудах, полученные данные свидетельствуют, что морфологические и функциональные показатели пищеварительной системы подвержены сезонным изменениям и зависят от интенсивности питания рыб /Соболев, 1991/. Большинство авторов полагает, что среди причин, вызывающих эти изменения, главной является температура, однако исследований влияния температуры одновременно и на структуру, и на ферменты слизистой оболочки кишечника рыб, не проводилось.

В связи с этим, нами исследованы весовые и линейные характеристики кишечника карпа, акклимированного к повышенной /28°C/ и пониженной /8 и 12°C/ температуре воды, в качестве контрольной служила температура 18°C.

Результаты, полученные при исследовании влияния темпера-

туры на структуру кишечника питающихся карпов, представлены в табл. № 1.

Таблица 1

Морфологические показатели кишечника питающихся карпов, содержащихся в течение 14 дней при различных температурах среды

Показатель	Температура, °C		
	12	18/контроль/	28
Масса рыб, г	47,0 ± 4,0 /n = 8/	53,0 ± 2,0 /n = 8/	48,0 ± 4,0 /n = 8/
Относительная масса кишечника, мг/г	24,9 ± 1,3	20,4 ± 1,4	13,0 ± 0,5
% к контролю	122	100	64
Относительная масса слизистой оболочки кишечника, мг/г	15,9 ± 1,1	12,4 ± 0,7	6,22 ± 0,2
% к контролю	128	100	50
Относительная масса мышечной оболочки кишечника, мг/г	9,2 ± 0,4	8,3 ± 0,5	7,3 ± 0,4
% к контролю	110	100	88
Относительная длина кишечника, % к длине тела	138,0 ± 3,4	133,0 ± 4,4	128,0 ± 4,7

Можно видеть, что при повышении температуры от 18 до 28°C, относительная масса кишечника рыб уменьшается в 1,6 раза /р < 0.01/, в то время как при понижении от 18 до 12°C значения этого показателя, напротив, увеличиваются в 1,2 раза /р < 0.05/. Изменения массы кишечника карпа при выдерживании в течение двух недель в среде с повышенными и пониженными температурами связаны, в основном, с изменениями массы слизистой оболочки кишечника рыб. Действительно, эта величина выше у карпов, акклимированных к 12°C, чем к 28°C, в 2,6 раза /р < 0.01/,



в то время как масса мышечной оболочки выше только в 1,3 раза /  $p < 0.05$ /. Необходимо также отметить, что относительная длина кишечника рыб, акклиматизированных к различным температурам, статистически не различается.

При исследовании влияния температуры на морфологические характеристики кишечника голодающих в течение двух недель карпов, установлена сходная закономерность /табл. № 2/. Однако, необходимо отметить, что масса слизистой оболочки кишечника голодающих рыб, акклиматизированных к 12 и 28°C, по сравнению с питающимися, различается менее значительно - лишь в 1,9 раза /  $p < 0.05$ /. Кроме того, при понижении температуры акклиматизации от 12 до 8°C, этот показатель статистически не изменяется.

Таблица 2

Морфологические показатели кишечника голодающих карпов, содержащихся в течение 14 дней при различных температурах среды

Показатель	Температура, °C			
	8	12	18/контроль/	28
Масса рыб, г	43,0±2,0 /n=6/	38,0±3,0 /n=7/	42,3±5,5 /n=8/	47,0±6,0 /n=8/
Относительная масса кишечника, мг/г	17,8±0,6	18,8±1,6	14,6±3,7	11,3±0,8
% к контролю	122	129	100	77
Относительная масса слизистой оболочки кишечника, мг/г	10,8±0,6	11,4±1,1	8,2±1,6	6,1±0,5
% к контролю	132	139	100	74
Относительная масса мышечной оболочки кишечника, мг/г	7,1±0,3	7,5±0,4	6,6±1,9	5,3±0,3
% к контролю	108	114	100	80
Относительная длина кишечника, % к длине тела	141,5±3,3	136,6±10,5	126,0±2,4	122,0±7,8

Важно также подчеркнуть, что у голодающих рыб, по сравнению с питающимися, более выражено снижение массы мышечной оболочки кишечника при повышении температуры среды содержания от 12 до 28°C /в 1,4 раза,  $p < 0.05$ /, и наблюдается достоверное уменьшение длины кишечника. По-видимому, это вызвано отсутствием функциональной нагрузки на пищеварительную систему и переходом на эндогенное питание.

Таким образом, нами установлено, что температура воды оказывает значительное влияние на весовые характеристики кишечника карпа и практически не влияет на линейные. При понижении температуры акклиматизации в диапазоне 28 - 12°C, когда карп способен активно потреблять пищу, независимо от функционального состояния увеличивается масса кишечника рыб. Увеличение массы кишечника вызывается увеличением как массы слизистой, так и массы мышечной оболочек. Однако, масса слизистой оболочки кишечника увеличивается в большей степени.

Гипертрофия органов пищеварительной системы при адаптации к холоду отмечена ранее рядом исследователей. В частности, С.Китчин и Д.Моррис /Kitchin, Morris, 1971/ обратили внимание на увеличение объема слизистой кишечника карася, адаптированного к холоду. В последнее время продемонстрировано /Lee, Cossins, 1988/, что у карпов, акклиматизированных к 10°C, объем слизистой кишечника и его диаметр больше, а складки выше и шире, чем у акклиматизированных к 30°C. При этом установлено, что количество выростов стенки кишечника одинаково у обеих групп рыб. Сопоставление этих данных с результатами, полученными нами, позволяет предположить, что при понижении температуры увеличивается количество энтероцитов в слизистой оболочке кишечника рыб.



Влияние температуры акклимации на активность и свойства ферментов кишечника карпа

Известно, что карп относится к безжелудочным рыбам, поэтому гидролиз всех компонентов его пищи осуществляется в кишечнике. Более половины питательных веществ, поступающих в пищеварительный тракт карпа, составляют углеводы /Щербина, 1973, 1984/. Полисахариды при помощи панкреатической  $\alpha$ -амилазы преобразуются в олигосахариды, которые под действием дисахаридаз слизистой оболочки кишечника, таких как сахараза, мальтаза и изомальтаза, разрушаются до конечных продуктов, способных к всасыванию - моносахаридов.

В литературе имеется ряд указаний на то, что температура акклимации оказывает значительное влияние на уровень активности  $\alpha$ -амилазы в кишечнике карпа /Василевский, Самойлова, 1987; Palasova et al., 1988/ и, за исключением одной работы /Кузьмина, Поддубная, 1986/, отсутствуют сведения, касающиеся такого влияния на активность дисахаридаз кишечника рыб. В связи с этим, исследовали влияние изменения температуры акклимации на активность и свойства мальтазы и сахаразы слизистой оболочки кишечника карпа.

Данные по влиянию температуры инкубации на активность мальтазы и сахаразы кишечника карпа, акклимированного к различным температурам, представлены на рис.1. Как видно на рисунке, уровень активности ферментов с увеличением температуры инкубации увеличивается у рыб, находившихся в течение 14 суток при повышенной до 28°C температуре, от  $0,7 \pm 0,2$  и  $0,07 \pm 0,03$  до  $15,9 \pm 2,1$  и  $0,43 \pm 0,06$ , при пониженной до 8°C температуре - от  $1,2 \pm 0,7$  и  $0,13 \pm 0,05$  до  $21,6 \pm 3,1$  и  $0,53 \pm 0,14$ ; в контроле - от  $0,9 \pm 0,4$  и  $0,23 \pm 0,06$  до  $17,8 \pm 3,4$  и  $0,77 \pm 0,07$  мкмоль.г<sup>-1</sup>.мин<sup>-1</sup>, для мальтазы

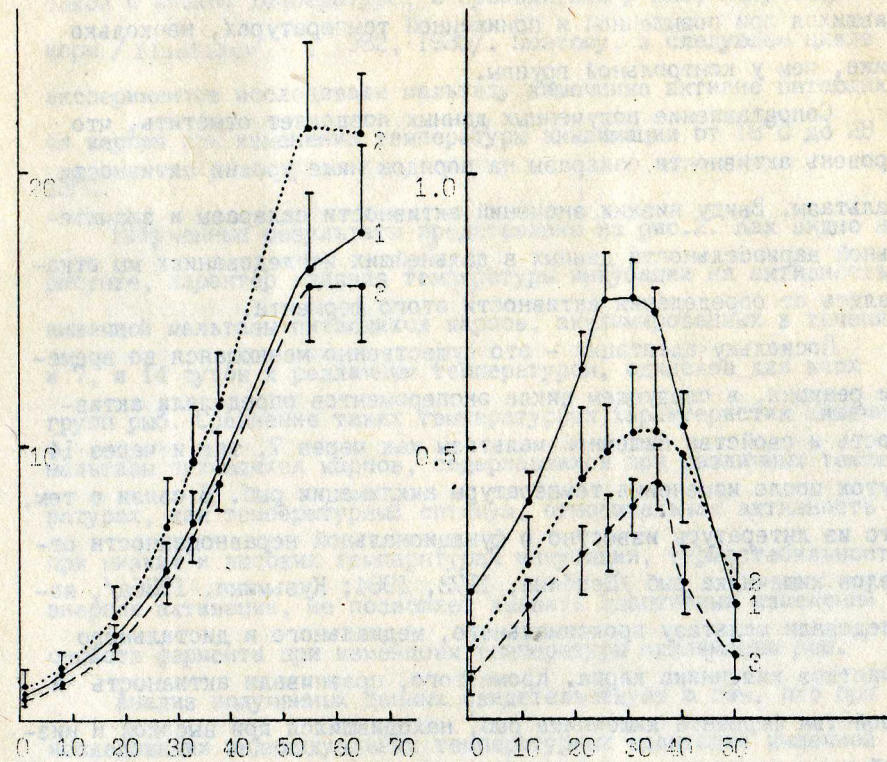


Рис.1. Влияние температуры инкубации на активность мальтазы /слева/ и сахаразы /справа/ слизистой кишечника карпа, акклимированного в течение 14 суток к различным температурам среды: 1 - 18°C /контроль/, 2 - 8°C, 3 - 28°C. По оси абсцисс - температура инкубации /°C/; по оси ординат - скорость реакции /мкмоль.г<sup>-1</sup>.мин<sup>-1</sup>/.

и сахаразы соответственно. В области низких температур инкубации различия в уровне активности мальтазы для всех групп рыб отсутствуют, тогда как при высоких температурах инкубации большая активность фермента наблюдается у рыб, акклимированных к низкой температуре. Активность кишечной сахаразы рыб, содер-



жавшихся при повышенной и пониженной температурах, несколько ниже, чем у контрольной группы.

Сопоставление полученных данных позволяет отметить, что уровень активности сахаразы на порядок ниже уровня активности мальтазы. Ввиду низких значений активности сахаразы и значительной вариабельности данных в дальнейших исследованиях мы отказались от определения активности этого фермента.

Поскольку адаптация - это существенно меняющаяся во времени реакция, в следующем цикле экспериментов определяли активность и свойства кишечной мальтазы как через 7, так и через 14 суток после изменения температуры акклимации рыб. В связи с тем, что из литературы известно о функциональной неравноценности отделов кишечника рыб /Щербина, 1973, 1984; Кузьмина, 1986а/, исследовали мальтазу проксимального, медиального и дистального участков кишечника карпа. Кроме того, сравнивали активность и свойства фермента кишечника рыб, находившихся при высокой и низкой температурах, а затем реакклимированных к контрольной температуре /18°C/ в течение 7 и 14 суток.

Результаты, полученные для фермента различных отделов кишечника карпа, оказались сходными. В частности, через 7 суток после повышения или понижения температуры среды, различия в уровне активности мальтазы медиального отдела кишечника всех групп рыб не установлены. При исследовании мальтазы медиального отдела кишечника карпа, реакклимированного к контрольной температуре также продемонстрировано отсутствие статистически значимых различий в уровне активности фермента.

Необходимо отметить, что результаты, изложенные выше, были получены нами на голодающих в течение эксперимента карпах. Однако известно, что различия в активности пищеварительных ферментов могут отсутствовать у голодающих рыб, акклимированных к вы-

сокой и низкой температуре, и проявляться у рыб, получающих корм /Plantikov, 1982, 1985/. Поэтому, в следующем цикле экспериментов исследовали мальтазу кишечника активно питающихся карпов при изменении температуры акклимации от 18°C до 28 и 12°C.

Полученные результаты представлены на рис.2. Как видно на рисунке, характер влияния температуры инкубации на активность кишечной мальтазы питающихся карпов, акклимированных в течение 7, и 14 суток к различным температурам, одинаков для всех групп рыб. Сравнение таких температурных характеристик кишечной мальтазы питающихся карпов, содержащихся при различных температурах, как температурный оптимум, относительная активность при низких и высоких температурах инкубации, термостабильность, энергия активации, не позволяет выявить адаптивных изменений свойств фермента при изменении температуры акклимации рыб.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что при исследовании индивидуальных температурных адаптаций кишечной мальтазы в пределах одной породы карпа /украинской/ адаптивных изменений активности и свойств фермента не обнаружено. По-видимому, адаптация пищеварительной функции кишечника карпа к температуре осуществляется на более высоком системном уровне - органном, чем на молекулярном и клеточном. Действительно, если при понижении температуры активность ферментов на единицу массы слизистой оболочки кишечника падает, а при повышении - увеличивается /имеется в виду реальная активность ферментов, т.е. определенная при температуре инкубации, равной температуре акклимации/, тогда как общая масса слизистой оболочки кишечника, напротив, увеличивается при понижении температуры и уменьшается при увеличении, то достигается гомеостатирующий эффект на уровне пищеварительной функции кишечника рыб.



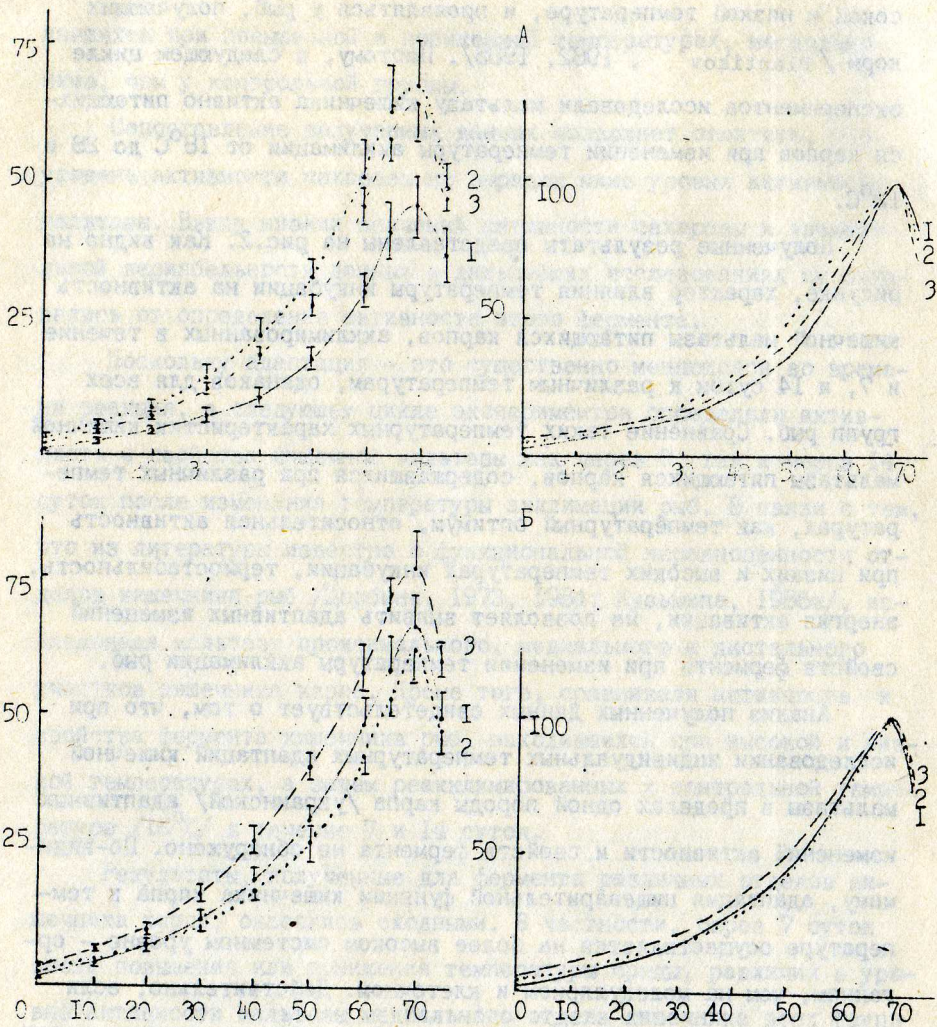


Рис.2. Влияние температуры инкубации на активность мальтазы слизистой кишечника питающихся карпов, выдержанных в течение 7 /А/ и 14 /Б/ суток при различных температурах среды: 1 - 18°C /контроль/, 2 - 12°C, 3 - 28°C.

Обозначения: по оси абсцисс - температура /°C/, по оси ординат - скорость реакции, слева в  $\mu\text{моль}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{г}^{-1}$ ; справа в % от максимальной, принятой за 100.

Температурные характеристики различных форм мальтазы кишечника карповых рыб

Из литературы известно, что в ряде случаев наблюдаются адаптивные приспособления свойств кишечных ферментов рыб, обитающих в среде с различными температурами /Уголев и др., 1976, 1981, 1983; Кузьмина, Леваленный, 1986/. Однако, в этих работах исследовались виды рыб, значительно различающиеся экологическими особенностями и систематическим положением, поэтому, наблюдаемые различия свойств ферментов связывались, в основном, с генетическими различиями. Исследования, посвященные фенотипическим температурным адаптациям мембраносвязанных пищеварительных ферментов рыб, в литературе отсутствуют.

В последнее время в отношении большинства собственно кишечных ферментов показано, что они обладают амфипатической структурой и состоят из гидрофильной и гидрофобной частей /обзоры: Уголев, Иезуитова, 1982; Kenny, Maroux, 1982/. Это установлено также для ферментов группы мальтаз и  $\gamma$ -амилазы /Semenza, 1981, 1986/. Ферменты с амфипатической структурой молекулы могут быть изолированы из мембраны с помощью неполярных детергентов /например, тритона- $\lambda$ -100/ и обозначаются как детергентная форма фермента. Протеолитическое расщепление связей между гидрофильной и гидрофобной частями молекулы приводит к образованию протеазной формы, лишенной гидрофобного домена.

В связи с этим, используя современные возможности, нами была получена мальтаза кишечника в мембраносвязанной, детергентной и протеазной формах от различных карповых рыб, что позволило разделить эффекты мембранных компонентов и встроенного в них ферментативноактивного белка, а также роль гидрофобного участка в температурных адаптациях пищеварительных ферментов.



Было проведено два цикла экспериментов. В первом, в качестве объектов исследований, для сравнительного изучения были выбраны украинская и ропшинская породы карпа, выращенные соответственно в южных /Астраханская обл./ и северных /Ленинградская обл./ условиях; во втором - карп и белый толстолобик, выращенные в одинаковых температурных условиях /Астраханской обл./, но различающихся теплолюбивостью.

Результаты, полученные при исследовании различных форм кишечной мальтазы украинской и ропшинской пород карпа, представлены в табл.3.

Таблица 3

Температурные характеристики различных форм кишечной мальтазы украинской и ропшинской пород карпа

Порода	Форма фермента	Температурный оптимум /°С/	Энергия активации Дж/моль ( $E_{акт}$ )
Украинская	Мембранная	75	9.2
	Детергентная	70	9.8
	Протеазная	65	8.6
Ропшинская	Мембранная	70	7.1
	Детергентная	65	9.5
	Протеазная	65	8.6

Можно видеть, что температурный оптимум и  $E_{акт}$  различаются для мембранносвязанной мальтазы кишечника исследованных пород карпа. Значение температурного оптимума мембранной формы фермента обеих пород карпа на 5°С превышает эту величину для детергентной формы. Важно отметить, что мембранная форма кишечной мальтазы ропшинской породы карпа, по сравнению с украинской, характеризуется меньшими значениями  $E_{акт}$ , это свидетельствует об адаптации комплекса фермент-мембрана к пониженной температуре

функционирования.

Различия в величинах температурного оптимума и  $E_{акт}$  наблюдаются для мембранной и детергентной форм кишечной мальтазы исследованных пород карпа, но отсутствуют для протеазной, лишенной гидрофобного участка. Это может свидетельствовать о важной роли гидрофобного домена в обеспечении свойств каталитически-активного гидрофильного участка молекулы фермента в связи с его температурными адаптациями.

Результаты, полученные при исследовании различных форм кишечной мальтазы карпа и белого толстолобика, представлены в табл.4.

Таблица 4

Температурные характеристики различных форм кишечной мальтазы карпа и белого толстолобика

Вид	Форма фермента	Температурный оптимум /°С/	Энергия активации, Дж/моль ( $E_{акт}$ )
Карп	Мембранная	65.4	7.1
	Детергентная	63.8	8.4
	Протеазная	62.5	8.1
Белый толстолобик	Мембранная	62.5	5.5
	Детергентная	62.1	6.9
	Протеазная	61.7	7.8

Установлено, что температурный оптимум мембранной формы кишечной мальтазы у карпа выше, чем у белого толстолобика, тогда как для детергентной и протеазной форм фермента различия в значениях этого показателя недостоверны. Различия в  $E_{акт}$  процесса также обнаружены только для мембранной формы фермента, а для протеазной они статистически не значимы. Важно отметить более низкие значения  $E_{акт}$  мембранносвязанной мальтазы кишечника



белого толстолобика, по сравнению с значениями этого показателя для мембранной формы фермента кишечника карпа. Это свидетельствует о большей эффективности гидролиза углеводов в кишечнике фитофага белого толстолобика, чем у всеядного карпа, при одинаковых температурах среды обитания.

Таким образом, мембранносвязанная мальтаза кишечника карповых рыб характеризуется различными температурными характеристиками у различных пород и видов, но ферментативно-активная белковая глобула фермента обладает сходными свойствами.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования подтверждают данные о том, что у рыб промежуточные и заключительные этапы гидролиза углеводов пищи происходят за счет мембранносвязанных пищеварительных ферментов, которые синтезированы в клетках эпителия кишечника и встроены в мембрану щеточной каймы /обзоры: Уголев, 1972а; Кузьмина, 1978, 1986а; Кушак, 1983 и др./.

Температура среды оказывает значительное влияние на активность пищеварительных ферментов. Как правило, компенсация негативного влияния изменений температуры среды обитания на скорость ферментативных реакций у пойкилотермных животных осуществляется на клеточном и молекулярном уровне посредством изменения концентрации ферментов и за счет изменения их свойств /обзоры: Хочачка, Сомеро, 1977, 1988/. Однако, полученные нами результаты свидетельствуют, что каких-либо адаптивных изменений в активности и в свойствах для кишечных ферментов при акклимации рыб к различным температурам, вылить не удается. Гомеостатирующий эффект осуществляется на более высоком системном уровне - за счет регуляции массы слизистой оболочки кишечника;

при понижении температуры среды, активность кишечных ферментов падает, но масса последней увеличивается. Эта реакция позволяет поддерживать процесс мембранного пищеварения на относительно постоянном уровне при колебаниях температуры среды. По-видимому, в процессе эволюции подобный механизм индивидуальных температурных адаптаций в пищеварительной системе оказался предпочтительнее, поскольку он не сопровождается процессами, связанными с адаптивным синтезом молекул фермента с новыми свойствами при изменениях температуры среды обитания рыб. Эта реакция является убедительным примером адаптации путем увеличения или уменьшения числа неизменных функциональных блоков и подтверждает развиваемую в последние годы теорию о блоковом строении самых различных структур и функций /обзоры: Уголев, 1983, 1985/.

Следует также отметить, что у ропшинской породы карпа мембранносвязанная мальтаза кишечника адаптирована к пониженной температуре функционирования. Этот факт хорошо согласуется с результатами обширной литературы, демонстрирующей множество примеров адаптаций белков к температурным условиям среды обитания организмов /обзоры: Александров, 1985; Хочачка, Сомеро, 1988; Ушаков, 1990/. В то время как свойства фермента, отделенного от мембраны как с помощью детергентов, так и с помощью протеаз, очень близки у различных карповых рыб. Это свидетельствует о том, что температурные адаптации кишечных карбогидраз осуществляются на уровне фермент-мембранных комплексов энтероцитов и, видимо, не затрагивают структуры молекулы фермента. По-видимому, адаптации сложных ферментных систем к условиям функционирования реализуются за счет рекомбинации стандартных функциональных блоков, а не синтеза новых.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что мембранный гидролиз углеводов пищи может происходить



в кишечнике карпа с приблизительно одинаковой эффективностью при различных температурах окружающей среды. Ранее было показано /Неваленный, 1987/, что транспортные процессы также не лимитируют скорости поступления углеводов во внутреннюю среду организма карповых рыб. Возможно, процесс усвоения пищи при понижении температуры воды лимитируется у карповых рыб не на уровне мембранного гидролиза и всасывания, а на стадиях расщепления биополимеров, связанных с полостными ферментами.

## ВЫВОДИ

1. Температура среды содержания оказывает значительное влияние на морфологические характеристики кишечника карпа. При акклимации рыб к понижению температуры относительная масса кишечника увеличивается, что связано с гипертрофией слизистой оболочки. Так, относительная масса слизистой оболочки кишечника у акклимированных в течение двух недель к температуре среды  $12^{\circ}\text{C}$  для питавшихся карпов в 2,6 раза, а для голодавших в 1,9 раза выше, чем у рыб, акклимированных к температуре  $28^{\circ}\text{C}$ , в то время как, при изменении температуры среды содержания рыб относительная масса мышечной оболочки изменяется незначительно.

2. Изменение температуры акклимации не вызывает адаптивных изменений уровня активности мембранных гидролаз, что подтверждается отсутствием, в большинстве случаев, статистически значимых различий в активности при стандартной температуре  $/25^{\circ}\text{C}/$  как кишечной мальтазы, так и кишечной сахаразы у карпов, содержавшихся при  $18^{\circ}\text{C}$ , а затем акклимированных в течение одной-двух недель при температурах 8; 12;  $28^{\circ}\text{C}$ .

3. Содержание карпа при различных температурах не приводит к изменению исследованных свойств /температурный оптимум, отно-

сительная активность при низких и высоких температурах инкубации, термостабильность, энергия активации/ мембранносвязанной мальтазы кишечника рыб.

4. Сравнение морфологических и функциональных характеристик кишечника карпа, акклимированного к различным температурам, позволяет предположить, что гомеостаз мембранного пищеварения при изменении температуры воды обеспечивается, в частности, за счет регуляции массы слизистой оболочки кишечника рыб, тогда как активность и свойства кишечных ферментов не изменяются. По-видимому, этот механизм особенно важен для сезонных адаптаций пищеварительной системы рыб.

5. Сопоставление значений температурных оптимумов и энергии активации мембранносвязанной мальтазы кишечника карповых рыб позволило выявить видовые /карп, белый толстолобик/ и внутривидовые /украинская и ропшинская породы карпа/ различия в свойствах фермент-мембранного комплекса, направленность которых свидетельствует о наличии температурных адаптаций на уровне мембранного пищеварения.

6. Установлено, что при разрушении фермент-мембранного комплекса детергентами и протеазами видовые и внутривидовые различия в свойствах мальтазы исследованных карповых рыб исчезают. Поскольку, температурные адаптации мембранносвязанных ферментов кишечника карповых рыб осуществляются не путем образования молекул фермента с модифицированными свойствами, а на уровне комплекса фермент-мембрана - они являются фенотипическими.

7. Полученные результаты позволяют заключить, что адаптация пищеварительной функции кишечника карповых рыб к температуре среды достигается путем взаимодействия молекул ферментов и компонентов мембраны энтероцитов, а также за счет изменения массы слизистой оболочки кишечника на фоне неизменных характерис-



тик фермент-мембранных комплексов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Коростелев С.Г. Температурная адаптация некоторых кишечных карбогидраз у рыб // Механизмы регуляции физиологических функций: Тез. докл. - Ленинград, 1988. - С. 53.
2. Коростелев С.Г., Егорова В.В. Исследование кишечной мальтазы карпа при разных температурах акклимации // VII Всесоюзная конференция по экологической физиологии и биохимии рыб: Тез. докл. - Ярославль, 1989. - ч. 2. - С. 215-216.
3. Коростелев С.Г., Егорова В.В. Температурные адаптации некоторых ферментов кишечных микроворсинок карповых рыб // XV Всесоюзная конференция по физиологии пищеварения и всасывания: Тез. докл. - Краснодар, 1990. - С. 136.
4. Неваленный А.Н., Коростелев С.Г., Зайцев В.Ф. Влияние температуры на пищеварительно-транспортную функцию кишечника рыб // IY Всесоюзное совещание по рыбохозяйственному использованию теплых вод: Тез. докл. - Курчатов, 1990. - С. 155-156.
5. Коростелев С.Г. Температурные зависимости и энергия активации мальтазы слизистой кишечника карпа, экспонированного при различных температурах среды // Краткие результаты научной деятельности Астраханского технического института рыбной промышленности и хозяйства за 1989-1990 г.г.: Астрахань, 1990.
6. Коростелев С.Г., Егорова В.В., Уголев А.М. О температурных адаптациях кишечной мальтазы карповых рыб // Журн. эвол. биох. и физиол., № 6, 1990. - С. 93-94.
7. Неваленный А.Н., Зайцев В.Ф., Коростелев С.Г. Динамика уровня активности карбогидраз в кишечнике белого толстолобика при изменении температуры // Сб. научн. тр. / Вопросы экологии гидробионтов, ВНИИРХ - вып. 64, 1991. - С. 69-70.