

Российская Академия Наук



Отделение биологических наук РАН

Научный Совет по гидробиологии и ихтиологии РАН

Российский фонд фундаментальных исследований

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанова Российской академии наук

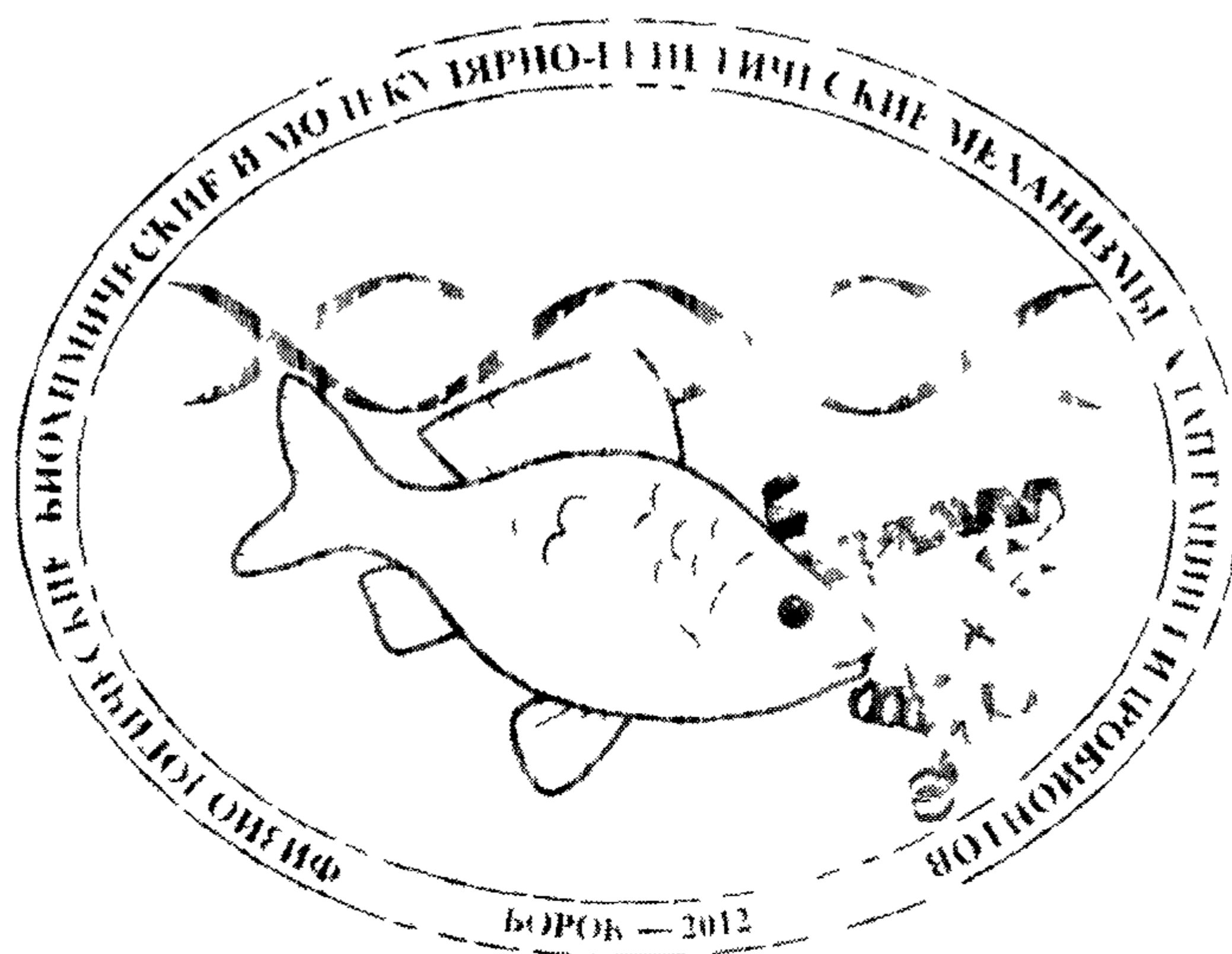
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего профессионального образования

«Тюменский государственный университет»

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИЙ ГИДРОБИОНТОВ

Материалы Всероссийской конференции с международным участием



4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding//Analytical Biochemistry. 1976. V. 72. P. 248–254.
5. Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei) / I. Fernandez, F.J. Moyano, M. Diaz, T. Martinez // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2001. V. 262. P. 1–12.
6. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae)/ F.J. Alarcón, T.F. Martínez, P. Barranco et al.//Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2002. V. 32. P. 265–274.
7. Digestive proteases of three carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: partial characterization and protein hydrolysis efficiency/ S. Kumar, F.L. Garcia-Carreno, O. R. Chakrabarti et al.//Aquaculture Nutrition. 2007. V. 13. P. 381–388.
8. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream/ S. Deguara, K. Jauncey, C. Agius//Journal of Fish Biology. 2003. V. 62. P. 1033–1043.
9. Hidalgo M.C., Urea E., Sanz A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities//Aquaculture. 1999. V.170. P. 267–283.
10. Prabhakaran S.K., Kamble S.T. Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of German Cockroach, *Blattella germanica* (L.)//Insect Biochemistry and Molecular Biology. 1995. V. 25. P. 519–524.

PH VALUES AND ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES IN DIGESTIVE TRACTS OF FISHES (CHANY LAKE)

Chernov Sergey, Solovyev Mikhail, Kashinskaya Elena

In this work we have studied different correlations between pH optimum activity of various digestive enzymes and real pH values in digestive tract of fishes. Range of real pH values in stomachs (perch, pikeperch and pike) and different parts of intestine (perch, pikeperch, pike, carp, ide and crucian) were 3,5-4,5 and 6,2-7,2 respectively. The highest values of activity of alkaline protease, nonspecific lipase and esterase were registered in pH range 8-9. The highest values of activity of acid protease were registered in pH range 2-3. We have observed two peaks of activity of α -amylase under pH values 7 and 9. We have concluded that optimums pH activity of alkaline protease, nonspecific lipase and esterase did not correlate with real pH values in digestive tracts of fishes.

ИЗМЕНЕНИЕ ЛОКОМОЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ И ОТНОСИТЕЛЬНОЙ МИКРОВЯЗКОСТИ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ САЗАНА ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА

С.Д. Чернявских, Нгуен Тхи Тьук, То Тхи Бик Тхуи

Белгородский государственный национальный исследовательский университет «БелГУ»,

Белгород, Россия

e-mail: Chernyavskikh@bsu.edu.ru

У низших позвоночных защитную функцию наряду с лейкоцитами выполняют ядерные эритроциты (Punescu, 1971). В регуляции многих так называемых диффузионно-контролируемых функций важную роль играет физическое состояние (микровязкость) липидной фазы клеточных мембран (Владимиров, Добрецов 1980). Это в полной мере относится и к процессу активации фагоцитов. Вместе с тем, проблема взаимосвязи функциональной активности фагоцитов и изменения физического состояния клеточных мембран изучена недостаточно, а имеющиеся экспериментальные данные носят противоречивый характер (Ищенкова, 2000; Новицкий и др., 2004).

В настоящей работе показано действие температурного фактора на локомоторную активность и микровязкость мембраны эритроцитов сазана *Cyprinus carpio*.

В работе использовали периферическую кровь, взятую из хвостовой вены у наркотизированных эфиром животных (30 особей). В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 10 ед./мл. Кровь центрифугировали 4 мин при 400 g, отбирали эритроциты и подсчитывали в камере Горяева.

Спонтанную локомоторную активность клеток крови изучали в тесте миграции под агарозой. За основу был взят классический метод (Nelson et al., 1975) в модификации (Федорова и др., 2001). В лунки, вырезанные в агарозном геле, нанесенном на предметное стекло, помещали по 3 мкл суспензии эритроцитов, разведенной изотоническим раствором,

содержащей около 1 млн. клеток. Стекла с эритроцитами инкубировали в среде с 5% содержанием CO₂ при комнатной (22°C) и повышенной (37°C) температурах. Длительность инкубации клеток составляла 2, 4, 6 и 8 часов. По окончании инкубационного периода эритроциты фиксировали в течение часа глутаровым альдегидом и окрашивали азур-эозином. Площадь спонтанной миграции клеток измеряли с помощью анализатора изображений «Видео тест-Размер» 5.0 (ООО «Микроскоп-Сервис», г. Санкт-Петербург).

Для определения микровязкости мембран суспензию эритроцитов разводили до оптической плотности 0,700 ед. (в 0,5 см кювете при длине волны поглощения 650 нм). Клетки с пиреном (*Koh Light*) инкубировали в течение 1 мин при постоянном встряхивании. Конечная концентрация пирена составляла 3 мкМ. Микровязкость мембран определяли методом латеральной диффузии гидрофобного флюоресцентного зонда пирена (C₁₆H₁₀) (Владимиров, Добрецов, 1980). Определение микровязкости основано на образовании эксимеров (возбужденных димеров) пирена (Добрецов, 1989). Спектры флюоресценции регистрировали на спектрофотометре СФ-56 (Ломо Спектр, г. Санкт-Петербург). Микровязкость липидного бислоя эритроцитарных мембран оценивали при длине волны возбуждения 334 нм, зон белок-липидных контактов - при 286 нм. Коэффициент эксимеризации пирена (F_э/F_м) рассчитывали по отношению интенсивности флюоресценции эксимеров (длина волны испускания 470 нм) и мономеров (длина волны испускания 395 нм). Данный коэффициент находится в обратной зависимости от относительной микровязкости.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием специальных программ на персональном компьютере. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента.

В результате проведенных исследований установлено, что при температуре 22°C площадь миграции эритроцитов сазана практически не изменяется, за исключением показателя, полученного при 6-часовом нагревании клеток по сравнению с 4-часовым, где наблюдается его временное снижение (табл. 1).

Таблица 1. Показатели площади миграции эритроцитов сазана, мм²

Продолжительность инкубации, ч	2	4	6	8
Температура инкубации, °С				
22	2,5 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,4 ± 0,1 [#]	2,5 ± 0,2
37	2,6 ± 0,2	2,5 ± 0,2 ^{&}	2,4 ± 0,2 [*]	2,4 ± 0,2 [*]

Примечание: здесь и в табл. 2: представлены значения M±m; достоверность различий по t-критерию Стьюдента (p<0,05): & - по сравнению с температурой 22°C, * -- по сравнению с 2 часами инкубации, # - по сравнению с 4 часами инкубации, ^ω - по сравнению с 6 часами инкубации.

Данные согласуются с показателями, характеризующими относительную микровязкость эритроцитарной мембраны: при комнатной температуре через 6 часов инкубации по сравнению с 4 часами происходит увеличение микровязкости в зонах аннулярных липидов и липидном бислое (табл. 2).

При температуре 37°C через 6-8 часов инкубации локомоторная активность эритроцитов снижается на 7,7% по сравнению с 2-часовой инкубацией. Зарегистрированное снижение миграционной активности происходит на фоне увеличения показателей относительной микровязкости. Через 4-8 часов инкубации по сравнению с 2 часами разница в зонах белок-липидных контактов F_э/F_м (286) составила 37,1-43,4%, в липидном бислое F_э/F_м (334) – 23,0-36,0%.

При 4-часовой инкубации при температуре 37°C отмечается уменьшение показателя площади миграции эритроцитов на 3,8% по сравнению с температурой 22°C (см. табл. 1). При 2-часовой инкубации при повышенной температуре, по сравнению с комнатной, в зонах белок-липидных контактов снижение относительной микровязкости составило 64,9%, при 6-часовой - разница уменьшилась до 12,3%. В липидном бислое при температуре 37°C, по сравнению с

температурой 22°C, через 2 часа инкубации уменьшение относительной микровязкости составило 42,3%, через 6 часов – 9,3%, а 8-часовая инкубация способствовала увеличению изучаемого показателя.

Таблица 2. Коэффициенты относительной микровязкости мембраны эритроцита сазана

Температура Инкубации, °С	Коэффициенты эксимеризации пирена	Продолжительность инкубации, ч			
		2	4	6	8
22	F _э /F _м (286)	1.34 ± 0.02	1.38 ± 0.01	1.22 ± 0.04*#	1.24 ± 0.03*#
	F _э /F _м (334)	2.60 ± 0.06	2.73 ± 0.05	2.27 ± 0.03*#	2.63 ± 0.07@
37	F _э /F _м (286)	2.21 ± 0.06 ^κ	1.39 ± 0.02*	1.37 ± 0.01* ^κ	1.25 ± 0.02*#(@)
	F _э /F _м (334)	3.70 ± 0.09 ^κ	2.85 ± 0.05*	2.48 ± 0.04*# ^κ	2.37 ± 0.05*# ^κ

Примечание. F_э/F_м (286) – коэффициент эксимеризации пирена, характеризующий микровязкость в зоне белок-липидных контактов, F_э/F_м (334) – коэффициент эксимеризации пирена, характеризующий микровязкость липидного бислоя; F_э/F_м – коэффициент эксимеризации пирена ($K_{\text{экс}} = F_{470} / F_{395}$).

Согласно полученным результатам, а также данным литературы (Выборнова, 1994), при повышенной температуре инкубации происходят изменения микровязкости и, возможно, других характеристик структурной организации мембраны, приводящие к инактивации клеточной подвижности. Повышение относительной микровязкости в зонах белок-липидных контактов и липидном бислое свидетельствует о нарушении стабильности эритроцитарной мембраны и снижении ее текучести. Эти изменения, в свою очередь, ухудшают вязкоэластичные свойства мембраны и повышают ригидность клетки.

Временное снижение локомоторной активности и повышение относительной микровязкости при 6-часовой инкубации в условиях комнатной температуры нивелируются при 8-часовом нагревании, возможно, вследствие включения компенсаторных механизмов (Хочачка и др., 1977).

Таким образом, увеличение длительности инкубации при повышенной температуре способствует снижению локомоторной активности и увеличению относительной микровязкости мембраны эритроцитов сазана. Инактивация миграционной активности эритроцитов сазана при повышении температуры инкубации происходит значительно быстрее, чем нарушение стабильности эритроцитарной мембраны в липидном бислое и, особенно, в зонах белок-липидных контактов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Владимиров Ю.А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю.А. Владимиров, Г.Е. Добрецов. М., Наука, 1980. 320 с.
2. Выборнова И.И. Механизмы воздействия температурных условий и антропогенных химических факторов на функционирование биологических мембран / И.И. Выборнова, А.И. Гольцов, С.Ю. Елифанов и др. // Физиология человека. 1994. Т.20, №6. С. 124-136.
3. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липидпротеидов // М.: Наука, 1989. с. 191-206.
4. Новицкий В.В. Физиология и патофизиология эритроцита / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая. Томск: Изд. ТГУ, 2004. 202 с.
5. Пшеникова М.Г. Феномен стресса: эмоциональный стресс и его роль в патологии // Патол. физиология и эксперим. терапия. №3. 2000. С.20-26.
6. Федорова М.З. Спонтанная миграция нейтрофилов крови в смешанной популяции лейкоцитов и ее изменения под влиянием веществ аутоплазмы при различных функциональных состояниях организма / М.З. Федорова, В.Н. Левин // Клиническая лабораторная диагностика. 2001. №5. С. 16-19.
7. Хочачка П. Стратегия биохимических адаптаций / П. Хочачка, Д. Сомеро. М., Мир, 1977. 398 с.
8. Nelson R.D. Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes / R.D. Nelson, P.G. Quie, R.L. Simmons // J. Immunol. 1975. v.115. P.1650-1656.
9. Prunescu H. Natural and experimental phagocytosis by erythrocytes in Amphibians // Nature. New Biol. 1971. V. 231. N 22. P. 143-144.