

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЛИНЕЙНО-ВЕСОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК С АКТИВНОСТЬЮ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ В БЕЛЫХ МЫШЦАХ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП СИГОВ ИЗ ОЗЕРА КАМЕННОЕ (РЕСПУБЛИКА КАРЕЛИЯ)

М. В. Чурова, О. В. Мещерякова, Н. Н. Немова

Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,
e-mail: mchurova@yandex.ru.

Введение

Исследование особенностей роста рыб, механизмы формирования размерно-весовой изменчивости является одним из важных вопросов в популяционной биологии, биохимии рыб, аквакультуре (Дгебуадзе, 2001, Huss et al., 2007, Huss et al., 2008). Рыбы растут в течение всей жизни, и особи одной популяции, одной когорты могут отличаться темпами роста в зависимости от различных факторов, что приводит к формированию вариаций размеров в группе рыб одного поколения и популяции в целом. Рыбы разные по размерам отличаются между собой и по уровню метаболизма вследствие различных энергетических затрат на рост, развитие и другие процессы жизнедеятельности. Многочисленные исследования показывают, что некоторые ферменты энергетического и углеводного обмена являются индикаторами интенсивности и направления важнейших путей энергетического и пластического обмена, и определение их активности может использоваться в оценке роста и развития рыб, их физической активности. В исследованиях взаимосвязи биохимических параметров с размерными характеристиками рыб (масса и длина) большое внимание уделяется ферментам белых мышц, участвующим в процессах аэробного и анаэробного синтеза АТФ (Somero, Childress, 1990; Burness et al., 1999; Norton et al., 2000, Tripathi, 1999; Tripathi, Verma, 2004; Davies, Moyes, 2007). У рыб, мышцы составляют большую часть тела (около 60% веса) и, таким образом, играют большую роль в метаболизме всего организма и отражают темпы роста всего тела рыбы. Скелетная мышца выполняет не только локомоторную функцию, но

и играет важную роль в метаболическом гомеостазе всего тела (Sanger and Stoiber, 2001; McClelland G.B. et al., 2006). Целью нашего исследования был поиск взаимосвязей активности и уровня экспрессии генов ферментов энергетического и углеводного метаболизма белых мышц с размерами рыб внутри возрастных групп (2+ и 3+) сигов (*Coregonus lavaretus* L.), обитающих в озере Каменное (республика Карелия). Также для описания ростовых процессов во взаимосвязи с размерами в белых мышцах рыб определяли уровень экспрессии тяжелой цепи миозина и показатель РНК/ДНК, используемые в исследованиях для оценки темпов роста рыб (Houlihan et al., 1993; Grant, 1996, Peragon et al., 2001, Overturf and Hardy, 2001, Imsland et al., 2006).

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили сиги (*Coregonus lavaretus* L.) разных возрастных групп выловленные в озере Каменное и озере Тумасозеро в июне 2009 года (табл. 1).

Таблица 1. Линейно-весовые характеристики сигов из озера Каменное

		2+	3+
АС, см	M±m	18.96±0.27	20.5±0.28
	min-max	17,6–19,7	19,6–21,4
масса, г	M±m	56.86±2.38	84.71±4.9
	min-max	50,00–67,00	73–110
Количество особей		9	9

Олиготрофное озеро Каменное относится к бассейну реки Кеми (басс. Белого моря). Площадь водоёма составляет 95,5 км², максимальная глубина – 26 м, средняя 8 м. Вода озера ха-

рактируется высокой прозрачностью, малой минерализацией (9,5 мг/л) и низким содержанием органических соединений (общий азот – 0,41 мг/л, общий фосфор – 0,005 мг/л). содержание кислорода – 6,5 мг/л. Вследствие низкой минерализации и невысокой интенсивности биологических процессов вода озера отличается низкими величинами pH (5.97–6.49) (Поверхностные воды..., 2001).

Сиги из озера Каменное относятся к мелкой форме малотычковых сигов. Особи отличаются смешанным типом питания. По частоте встречаемости из бентосных организмов доминируют (около 50%) личинки хиромид, подёнок, моллюски. Планктон представлен главным образом ветвистоусыми рачками, веслоногие рачки малочисленны.

Сбор рыбы осуществлялся разноячеистыми сетями в литоральной зоне на глубине 2–6 метров. Температура воды была 11 °С.

Определение активности ферментов. Активность ферментов определяли в белых мышцах и печени сигов. Ткань гомогенизировали в 0.01 М. трис-HCl буферном растворе (pH 7.5). Общую активность ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ, 1.1.1.49), 1-глицерофосфатдегидрогеназы (1-ГФДГ, 1.1.1.8), малатдегидрогеназы (МДГ, 1.1.1.37) в печени и мышцах определяли по общепринятым методикам (Кочетов, 1980). Активность альдозазы (КФ 4.1.2.13) определяли по методике Векс в модификации Ананьева и Обуховой (Колб, Камышников, 1976). Активность цитохром с оксидазы (цитохромоксидаза, ЦО, КФ 1.9.3.1.) определяли по методу Смита (Smith, 1955), при этом цитохром с восстанавливали двукратным по массе количеством аскорбиновой кислоты в 0.02 М фосфатном буферном растворе (pH 7.0) в течение 2 ч и затем на колонке с сефадексом G-25 выделяли в восстановленной форме свободным от избытка восстановителя.

Определение концентрации РНК и ДНК. 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) (Маниатис, 1984).

Проведение полимеразной цепной реакции. Уровень экспрессии генов тяжелой цепи миозина, цитохром с оксидазы и лактатдегидрогена-

зы-А 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 x для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I (Синтол, Россия). Праймеры подбирали с помощью программы Beacon Designer 5.0. В связи с отсутствием данных по нуклеотидным последовательностям исследуемых генов для сигов, использовали генетические базы данных для лосося (*Salmo Salar* L.). Последовательности праймеров следующие: тяжелая цепь миозина *MyHC* (GenBank DN164736) прямой 5' – TTCAGTGGCGTGCTTCTC – 3', обратный 5' – AAGAGGCTGGAGGATGAGG – 3'; лактатдегидрогеназа-A4 (*LDHA4*): прямой 5' – CGTTGACATCCTGACCTAC – 3', обратный 5' – TCTCCGTGCTCTCCAATG – 3' (GenBank BT043598); цитохром с оксидаза субъединица IV (CCOIV): прямой 5'-TACGTGGGGCACATGGTGTT – 3', обратный 5' – CCCAGGAGCCCTTCTCCTTC – 3' (GenBank BT043749); фактор элонгации *EF-1* (GenBank AF321836) прямой 5' – TGCTGGTGGTGGTGGTGAG – 3', обратный 5' – AAACGCTTCTGGCTGTAGGG – 3'. Протокол ПЦР: денатурация ДНК при 95 °С 5 мин; повторяющиеся циклы (50): денатурация ДНК при 95 °С 20 с, отжиг праймеров при 59 °С по 30 с, элонгация ДНК при 72 °С по 30 с; с последующей процедурой плавления фрагментов ДНК. Концентрацию матричной РНК в виде кДНК определяли по стандартной кривой (Gahr et al., 2008). Уровень экспрессии исследуемых генов нормализовали по уровню экспрессии референсного гена *EF-1*. Данные выражались как отношение концентрации мРНК исследуемого гена к концентрации мРНК *EF-1*.

Сравнение выборок по исследуемым показателям оценивали по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Степень влияния исследуемых факторов оценивали при помощи многофакторного дисперсионного анализа MANOVA. Взаимосвязь исследуемых показателей с размерами особей и между собой оценивали при помощи линейной

регрессии и корреляционного анализа по Спирмену (Юнкеров, Григорьев, 2002).

Результаты и обсуждение

Корреляция активностей ферментов в белых мышцах с линейно-весовыми характеристиками сигов. Согласно результатам исследования наблюдалась положительная взаимосвязь активности ферментов ЛДГ, ЦО, МДГ, альдолазы с длиной и массой сигов обеих возрастных групп (табл. 2).

Цитохром с оксидаза, ключевой фермент дыхательной цепи, и малатдегидрогеназа, фермент цикла трикарбоновых кислот, в исследованиях используются как показатели аэробного обмена (Goolish, Adelman, 1987; Merrit, Quattro, 2003; Gauthier et al., 2008, Koedijk et al., 2010). Основным источником энергии служит аэробный обмен, высокий уровень которого отражается на проявлении активной жизнедеятельности организма, особенно в период роста и развития молоди рыб (Озернюк 2000).

Таблица 2. Регрессионные уравнения зависимости исследуемых показателей в белых мышцах от длины и массы тела сигов двух возрастных групп

ФЕРМЕНТ (Y)	ВОЗРАСТ	X	УРАВНЕНИЕ	R ²	R	P
ЦО	2+	длина	$y = -13.797 + 0.815x$	0.73	0.85	<0.01
		масса	$y = -3.243 + 0.086x$	0.59	0.77	0.01
	3+	длина	$y = -2.549 + 0.184x$	0.51	0.71	<0.05
		масса	$y = -0.061 + 0.015x$	0.85	0.92	0.001
ЛДГ	2+	длина	$y = -3935.24 + 238.38x$	0.64	0.80	< 0.01
		масса	$y = -1022.19 + 28.162x$	0.66	0.81	<0.01
	3+	длина	$y = -1197.29 + 73.165x$	0.58	0.76	< 0.05
		масса	$y = -3.571 + 3.734x$	0.39	0.62	<0.05
Г-6-ФДГ	2+	длина	$y = -4.055 + 0.237x$	0.50	0.71	<0.05
		масса	$y = -0.792 + 0.022x$	0.30	0.55	НД
	3+	длина	$y = 4.801 - 0.218x$	0.42	-0.65	<0.05
		масса	$y = 1.154 - 0.01x$	0.30	-0.49	НД
1-ГФДГ	2+	длина	$y = -27.822 + 1.965x$	0.63	0.79	0.01
		масса	$y = -1.522 + 0.192x$	0.44	0.66	<0.05
	3+	длина	$y = -43.815 + 2.457x$	0.75	0.87	<0.01
		масса	$y = -1.577 + 0.1x$	0.31	0.56	НД
МДГ	2+	длина	$y = -5.538 + 0.470x$	0.55	0.74	<0.05
		масса	$y = 0.625 + 0.048x$	0.42	0.65	< 0.05
	3+	длина	$y = -15.332 + 0.889x$	0.71	0.84	<0.01
		масса	$y = -0.254 + 0.038x$	0.34	0.58	< 0.05
Альдолаза	2+	длина	$y = -651.468 + 41.386x$	0.61	0.78	0.01
		масса	$y = -96.485 + 4.022x$	0.42	0.79	<0.05
	3+	длина	$y = -83.958 + 8.926x$	0.47	0.69	<0.05
		масса	$y = 45.446 + 0.647x$	0.63	0.79	0.01

Ранее было показано, что активность ферментов аэробного обмена (Цитратсинтаза и цитохромоксидаза) коррелирует с темпами роста рыб (Mathers et al., 1992, Couture et al., 1998, Lemeux et al., 2003). Продуцируемая в аэробном процессе энергия АТФ может быть затрачена на компенсацию повышенных энергетических затрат на синтез структурных белков, ферментов. Так как белые мышцы составляют большую часть веса рыб, где главным образом происходит синтез белков для растущей рыбы, то высокий уровень аэробного метаболизма необходим для поддержания высокого темпа роста (Couture et al., 1998, Gauthier et al., 2008).

Активность фермента лактатдегидрогеназы в белых мышцах рыб связана преимущественно с участием в анаэробном гликолизе, кото-

рый является главным процессом энергообеспечения при интенсивных сокращениях мышц. Согласно данным литературы, активность ферментов гликолиза лактатдегидрогеназа и пируваткиназа в мышцах увеличивается с массой тела разных видов рыб: клариевого сома (Tripathi. 1999a, 1999b), радужной форели (Somero, Childress, 1990; Burness et al., 1999) некоторых видов морских окуней (Norton et al. 2000, Davies, Moyes, 2007), пятнистой зубатки (Imsland et al., 2006), ювенильных особей Атлантической трески (Koedijk et al., 2010). Повышение активности ферментов гликолиза в белых мышцах у более крупных особей, видимо, связано с необходимостью поддержания необходимого уровня энергии для совершения интенсивных рывковых дви-

жений. Кроме того, в обеих возрастных группах наблюдалась корреляция между активностью ферментов ЦО и ЛДГ (табл. 3), что также указывает на взаимосвязанное усиление процессов аэробного и анаэробного обмена с

размерами особей. Такая же взаимосвязь активности ферментов ЛДГ и ЦО в белых мышцах с массой и длиной рыб была показана нами раньше на ряпушке и форели (Мещерякова и др., 2008, Чурова и др., 2010).

Таблица 3. Значения коэффициентов корреляции между активностью исследуемых ферментов мышц сигов двух возрастных групп

	ЛДГ		Г6ФДГ		1-ГФДГ		МДГ		альдолаза	
	2+	3+	2+	3+	2+	3+	2+	3+	2+	3+
ЦО	0.86*	0.82*	0.79*	-0.2	0.94*	0.90*	0.83*	0.4	0.86*	0.88*
ЛДГ			0.09	-0.8	0.43	0.8	0.93*	0.4	0.90*	0.49
Г-6-ФДГ					0.90*	-0.5	0.95*	-0.3	0.26	-0.4
1-ГФДГ							0.97*	0.68*	0.61	0.79*
МДГ									0.94*	0.81*

* Достоверные значения коэффициентов корреляции при $p < 0,05$.

Альдолаза, фермент гликолиза и глюконеогенеза. Значение активности изофермента альдолазы А, определяемого в нашем исследовании, характеризует уровень использования углеводов в процессах аэробного и анаэробного синтеза АТФ. Положительная взаимосвязь активности альдолазы с массой и весом особей (табл. 2), а также с ферментами ЦО, ЛДГ и МДГ (табл. 3) свидетельствует о связанном с размерами увеличении использования углеводов в энергообеспечении мышц.

1-Глицерофосфатдегидрогеназа фермент челночного механизма, играет важную роль в поддержании баланса НАД/НАДН. По нашим данным в обеих возрастных группах сигов наблюдалась положительная взаимосвязь 1-ГФДГ с массой и длиной особей (табл. 2), а также с активностью ЦО и МДГ (табл. 3). Таким образом, с увеличением энергозатрат у более крупных особей также усиливается функционирование глицерол-фосфатного челночного механизма, обеспечивающего по-

ступление восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь.

Нами была проведена возрастная динамика активности этих ферментов. В возрасте 3+ по сравнению с возрастом 2+ происходило снижение активности ЦО, МДГ, 1-ГФДГ, альдолазы, активность ЛДГ достоверно не изменялась (рис. 1). Это указывает на снижение уровня аэробного обмена с возрастом. Ранее на сиговых было также показано снижение активности аэробных ферментов (ЦО и цитратсинтазы) у взрослых особей по сравнению с сеголетками (Hinterleitner et al., 1987). Наблюдаемые различия в активности ферментов белых мышц с возрастом являются результатом изменения двигательного режима и типа метаболизма в онтогенезе. В ходе развития рыб с увеличением массы происходит снижение интенсивности потребления кислорода, снижение тканевого дыхания и, в целом, уровня стандартного обмена (Озернюк, 1985, Goolish, 1995).

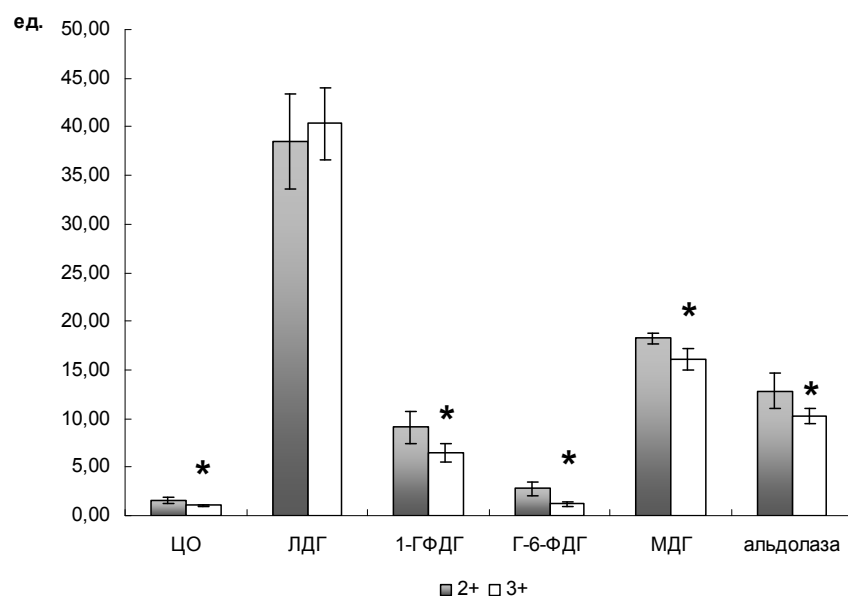


Рис. 1. Активность ферментов в белых мышцах сигов 2+ и 3+ ($M \pm m$) (мкмоль/мин/мг белка, для ЛДГ и альдолазы: мкмоль*10⁻¹/мин/мг белка, для ЦО- к/мг белка)

* Достоверность различий при $p \leq 0.05$.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФДГ), индикатор пентозо-фосфатного пути. В результате цикла происходит образование пентоз, участвующих в дальнейшем синтезе нуклеиновых кислот, а также восстановительных эквивалентов НАДФН, необходимых для биосинтеза жирных кислот, холестерина, стероидных гормонов, сфинголипидов. В различных органах и тканях пентозо-фосфатный путь имеет разную интенсивность (Tian et al., 1998). В нашем исследовании достоверных значений зависимости активности Г-6-ФДГ в мышцах с массой не наблюдалось, а значение коэффициента корреляции с длиной в возрасте 3+ менялись с положительно-го на отрицательное (табл. 2). С возрастом активность фермента также снижалась (рис. 1). Взаимосвязь активности Г-6-ФДГ с ферментами аэробного обмена наблюдалась только в мышцах сигов в возрасте 2+, у четырехлеток корреляции не обнаружено (табл. 3). Таким образом, данные по активности Г-6-ФДГ указывают на то, что в более старшем возрасте происходит перераспределение расходования углеводов в сторону энергообеспечения, а не восстановительных процессов.

Взаимосвязь экспрессии генов LDH-A и CCO с размерами рыб и активностью этих ферментов. Одним из важных вопросов биологии является исследование механизмов регуляции концентрации ферментов во взаимосвязи с размерами тела. Регуляция синтеза ферментов de novo осуществляется на уровне транскрипции или на посттранскрипционном уровне (Burness et al., 1999). В последнее время появляется всё больше исследований по изучению экспрессии генов аэробных и анаэробных ферментов и их взаимосвязи с активностью ферментов и размерами тела (Yang, Somero, 1996, Burness et al., 1999, Davies, Moyes, 2007).

Согласно нашему исследованию наблюдалась положительная корреляция уровня экспрессии генов *LDH-A* и *CCO* с размерами тела (табл. 4). У сигов в возрасте 3+ значения коэффициентов корреляции были достоверны только с массой. Кроме того в обеих возрастных группах взаимосвязь активности этих ферментов с уровнем экспрессии генов была положительной (табл. 4). Данные результаты свидетельствуют о регуляции активностей ферментов на уровне транскрипции, связанной с размерно-весовой дифференциацией рыб. Уровень экспрессии гена *LDH-A* с возрастом усиливался, а гена *CCO* с возрастом достоверно не изменялся (рис. 2).

Уровень экспрессии тяжелой цепи миозина. Миозин является одним из основных белков в мышце и составляет 25% от общего содержания белка всего организма (Weiss et al., 1999; Baldwin and Haddad, 2001) и 50% от количества всех мышечных белков (Watabe and Ikeda, 2006). Выбранная для исследования изоформа тяжелой цепи миозина относится ко второму классу миозинов. Белки второго класса, которые считаются собственно миозинами, экспрессируются в поперечно-полосатых мышцах и непосредственно участвуют в сокращении (Regiani and Bottinelli., 2008). Расположение и обильность этих протеинов в белой мышце, делает их идеальными кандидатами для оценки роста рыб. У рыб ген тяжелой цепи миозина экспрессируется в течение всей жизни (Hevroy et al., 2006; Regiani and Bottinelli., 2008). Было показано, что экспрессия гена *MyHC* коррелирует с темпами роста некоторых видов рыб и может быть использован как показатель, отражающий закономерности прироста мышечной массы (Overturf and Hardy., 2001, Hevroy et al., 2006, Imsland et al., 2006, Dhillon R. et al., 2008).

Таблица 4. Регрессионные уравнения зависимости содержания мРНК *CCO* и мРНК *LDH-A4* в белых мышцах от длины и массы тела сигов двух возрастных групп

ПОКАЗАТЕЛЬ (Y)	ВОЗРАСТ	X	УРАВНЕНИЕ	R ²	R	P
мРНК <i>CCO</i>	2+	ДЛИНА	$Y = -5.967 + 0.377X$	0.53	0.73	< 0.05
		МАССА	$Y = -1.109 + 0.040X$	0.44	0.66	< 0.05
	3+	ДЛИНА	$Y = -1.817 + 0.129X$	0.20	0.44	НД
		МАССА	$Y = -0.127 + 0.012X$	0.44	0.67	< 0.05
мРНК <i>LDH-A4</i>	2+	ДЛИНА	$Y = -14.303 + 0.808X$	0.62	0.79	0.01
		МАССА	$Y = -5.098 + 0.107X$	0.80	0.89	0.001
	3+	ДЛИНА	$Y = -14.0034 + 0.806X$	0.26	0.51	НД
		МАССА	$Y = -4.956 + 0.089X$	0.81	0.90	0.001
мРНК <i>CCO</i>	2+	АКТИВНОСТЬ ЦО	$Y = 0.369 + 0.493X$	0.82	0.91	0.001
	3+		$Y = 0.193 + 0.569X$	0.67	0.84	0.01
мРНК <i>LDH-A4</i>	2+	АКТИВНОСТЬ ЛДГ	$Y = -0.605 + 0.003X$	0.65	0.81	<0.01
	3+		$Y = -1.145 + 0.012X$	0.34	0.58	< 0.05

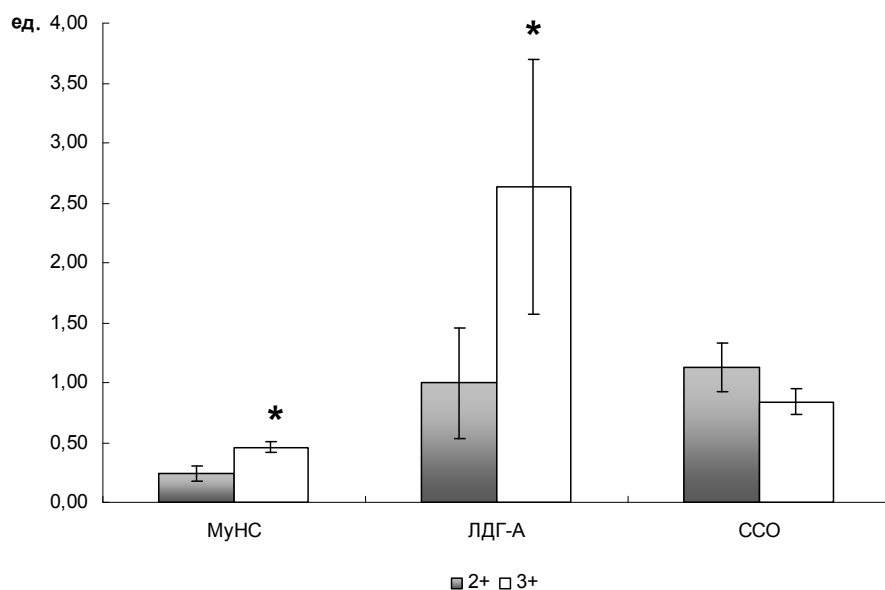


Рис. 2. Уровень экспрессии генов (мРНК исследуемого гена / мРНК *EF-1*) в белых мышцах сигов двух возрастных групп ($M \pm m$).

* Достоверность различий при $p \leq 0.05$

Согласно результатам нашего исследования уровень экспрессии гена *MyHC* положительно коррелировал с массой и длиной тела сигов из озера Каменное не зависимо от их возраста (табл. 5). При этом значение коэффициентов корреляции, а также уровень экспрессии гена миозина с возрастом увеличивались (рис. 2). Данные результаты указывают, на то, что более большие особи отличаются большим темпом прироста мышечной массы. Вероятно, что у четырёхлеток сигов прирост скелетной мускулатуры и массонакопление

происходят более интенсивно, чем у трёхлеток.

Отмеченная положительная корреляция активности цитохром с оксидазы и ЛДГ, а также уровня экспрессии генов этих ферментов с уровнем мРНК *MyHC* (табл. 6), указывают на увеличение энергетических потребностей по мере увеличения процессов прироста мышечной массы. Ранее также было показано, что для рыб существует положительная корреляция между общей активностью ЛДГ и приростом мышечной массы (Ahmad, Hasnain, 2005; Guderley, 2004).

Таблица 5. Регрессионные уравнения зависимости уровня экспрессии гена *MyHC*, показателя РНК/ДНК в белых мышцах от длины и массы тела сигов двух возрастных групп

ПОКАЗАТЕЛЬ (Y)	ВОЗРАСТ	X	УРАВНЕНИЕ	R ²	R	P
мРНК <i>MyHC</i>	2+	ДЛИНА	$Y = -0.349 + 0.030X$	0.34	0.58	<0.05
		МАССА	$Y = -0.091 + 0.005X$	0.68	0.82	0.001
	3+	ДЛИНА	$Y = -3.876 + 0.216X$	0.81	0.90	<0.01
		МАССА	$Y = -0.701 + 0.015X$	0.84	0.92	0.001
РНК/ДНК	2+	ДЛИНА	$Y = 4.481 - 0.195X$	-0.49	-0.70	НД
		МАССА	$Y = 1.870 - 0.019X$	-0.55	-0.74	НД
	3+	ДЛИНА	$Y = -2.160 + 0.158X$	0.66	0.82	< 0.01
		МАССА	$Y = 0.526 + 0.007X$	0.35	0.58	< 0.05

Таблица 6. Корреляция некоторых исследуемых показателей с уровнем экспрессии гена *MyHC* в мышцах сигов двух возрастных групп

	мРНК <i>MyHC</i>	
	2+	3+
ЦО	0.12	0.92*
ЛДГ	0.33	0.79*
мРНК <i>LDH-A4</i>	0.66*	0.94*
мРНК <i>CCO</i>	0.36	0.80*
РНК/ДНК	-0.57	0.64*

* Достоверные значения коэффициентов корреляции при $p < 0,05$.

Показатель РНК/ДНК. Многочисленными исследованиями показано, что концентрация РНК в тканях прямо связана с уровнем синтеза белка (Houlihan, 1991, Houlihan, 1993, Vinagre et al., 2008). Количество рибонуклеиновой кислоты, выражаемой как мг РНК мг-1 ДНК (отношение РНК/ДНК) используется как биохимический показатель роста в разных контекстах как для пресноводных, так и для морских видов рыб (Grant, 1996, Chicharo, Chicharo, 2008). Индекс РНК/ДНК отражает уровень синтеза протеинов на клетку, тогда как уровень клеточной РНК варьирует в зависимости от

уровня синтеза протеинов, в то время как содержание ДНК остается постоянным (Buckley, 1984).

Было показано, что РНК/ДНК и РНК/протеин положительно коррелирует с темпами роста лососёвых (Wang et al., 1993, Widler, Stanley, 1982, Crant, 1996) и других видов рыб (Rooker, Holt, 1996, Mathers et al., 1992; Houlihan et al., 1993; Peragon et al., 2001). В нашем исследовании значение коэффициента корреляции индекса РНК/ДНК с размерами особей варьировало между возрастными группами. Положительная корреляция показателя с массой тела наблюдалась только в возрасте 3+, в возрасте 2+ значение коэффициента корреляции было отрицательное (табл. 5). Значение показателя увеличивалось с возрастом (с $0,61 \pm 0,06$ до $1,04 \pm 0,14$, $p \leq 0.05$), при этом концентрация белка в мышцах ткани также повышалась ($24,78 \pm 4,83$ до $30,65 \pm 2,35$ мг/г ткани, $p \leq 0.05$). Таким образом можно заключить, что уровень синтеза белка у рыб в возрасте 3+ выше, чем в возрасте 2+. Кроме того была отмечена положительная корреляция показателя РНК/ДНК с уровнем экспрессии гена *MyHC* у четырёхлеток (табл. 6). Это ещё раз подтверждает наше предположение об усилении роста (главным образом прироста мышечной ткани) с увеличением размеров рыб в более старшем возрасте. Согласно данным литературы взаимосвязь показателя РНК/ДНК с размерами рыб может быть как положительной (Azuma et al., 1998, Rooker, Holt, 1996, Tripathi, Verma, 2004b), так и отрицательной (Buckley and Lough, 1987, Houlihan et al., 1993), что, вероятно, зависит от стадии развития,

возраста, условий обитания исследуемых рыб, сезона (Grant G.C., 1996).

Заключение

Таким образом, проведенное нами исследование позволяет выявить некоторые закономерности энергетических и пластических процессов в мышцах при формировании размерно-весовой разнокачественности у сигов в разных возрастных группах (у сигов в возрасте 2+ и 3+). У более больших рыб усиливаются аэробный и анаэробный обмен, что связано с увеличением энергетических затрат как на обеспечение локомоторной активности, так и на процессы роста особей, прирост мышечной массы. С возрастом и размерами происходит увеличение экспрессии тяжелой цепи миозина, что свидетельствует о том, что у четырёхлеток прирост скелетной мускулатуры и массонакопление происходят более интенсивно, чем у трёхлеток. Наши результаты показывают, что значение уровня экспрессии гена миозина, в отличие от показателя РНК/ДНК, более чётко отражает процессы роста сигов и взаимосвязь их с размерами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ «Ведущие научные школы России» НШ-3731.2010.4; гранта РФФИ 08-04-01140, программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России на 2009–2011 гг.» и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» проект НК-28(12).

Литература

- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж., 1984. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир. – 480 с.
- Озернюк Н. Д., 2000. Биоэнергетика онтогенеза. М.: Изд-во МГУ. 259 с.
- Чурова М. В., Мещерякова О. В., Немова Н. Н., Шатуновский М. И., 2010. Соотношение роста и некоторых биохимических показателей рыб на примере микижи *Parasalmo mykiss* Walb. // Известия РАН. Сер. Биол. 2010. № 3. с. 289–299.
- Ahmad R, Hasnain A.U., 2005. Ontogenetic changes and developmental adjustments in lactate dehydrogenase isozymes of an obligate air-breathing fish *Channa punctatus* during deprivation of air access // Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. V. 140. P. 271–8.
- Azuma T., Yada T., Ueno Y., Iwata M., 1998. Biochemical approach to assessing growth characteristics in salmonids // NPAFC Bull. No. 1. – P. 103–111.
- Buckley L.G., 1984. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea // Mar.Biol. V. 80. P. 291–298.
- Baldwin K.M., Haddad F., 2001. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle: Invited review: Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle // J. Appl. Physiol. V. 90. P. 345–357.
- Burness G.P., Leary S.C., Hochachka P.W., Moyes, C. D., 1999. Allometric scaling of RNA, DNA, and enzyme levels in fish muscle // Am. J. Physiol. V. 277. P. R1164–R1170.
- Chicharo M.A., Chicharo L., 2008. RNA:DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology // Int J Mol Sci. V. 9. P. 1453–1471.
- Davies R., Moys C.D., 2007. Allometric scaling in centrarchid fish: origins of intra- and inter-specific variation in oxidative and glycolytic enzyme levels in muscle // The Journal of Experimental Biology. V. 210. P. 3798–3804.
- Dhillon R.S., Wang Y., Tufts B.L., 2008. Using molecular tools to assess muscle growth in fish: Applications for aquaculture and fisheries management // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. V. 148. P. 452.

- Gauthier C., Campbell P., Couture P., 2008. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*) // *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* V. 151. P. 526–532.
- Gahr S.A., Vallejo R.L., Weber G.M., Shepherd B.S., Silverstein J.T., Rexroad C.E.3rd., 2008. Effects of short-term growth hormone treatment on liver and muscle transcriptomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Physiol Genomics*. V. 32. P. 380–392.
- Goolish, E.M., Adelman, I.R., 1987. Tissue specific cytochrome c oxidase activity in largemouth bass: the metabolic cost of feeding and growth // *Physiological Zoology*. V. 60. P. 454–464.
- Grant G.C., 1996. RNA-DNA ratios in white muscle tissue biopsies reflect recent growth rates of adult brown trout // *Journal of Fish Biology*. N48. P. 1223–1230.
- Guderley H., 2004. Locomotor performance and muscle metabolic capacities: impact of temperature and energetic status // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* V. 139. P. 371–382.
- Hevroy E.M., Jordal A-E.O., Hordvik I., Espe M., Hemre G-I., Olsvik P.A., 2006. Myosin heavy chain mRNA expression correlates higher with muscle protein accretion than growth in Atlantic salmon, *Salmo salar* // *Aquaculture*. V. 252. P. 453–461.
- Houlihan D.F., Mathers E.M., Foster A., 1993. Biochemical correlates of growth rate in fish. In: *Fish Ecophysiology* / J.C. Rankin, F.B. Jensen. London UK: Chapman and Hall. P. 45–71.
- Huss M., Bystrom P., Persson L., 2008. Resource heterogeneity, diet shifts and intra-cohort competition: effects on size divergence in YOY fish // *Oecologia*. V. 158. P. 249–257.
- Imsland A.K., Le Francois N.R., Lammare S.G., Ditlecadet D., Sigurosson S., Foss A. 2006. Myosin expression levels and enzyme activity in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor*) muscle: a method for monitoring growth rates // *Can J. Fish Aquat. Sci.* V. 63. P. 1959–1967.
- Koedijk R.M., Le Francois N.R., Blier P.U., Foss A., Folkvord A., Ditlecadet., Lammare S.G., Stefansson S.O., Imsland A.K., 2010. 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*. V. 156. P. 102–9.
- Overturf K., Hardy R., 2001. 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.* V. 32. P. 315–322.
- Reggiani C., Bottinelli R., 2008. Myosin II: Sarcomeric myosins, the motors of contraction in cardiac and skeletal muscles / (Ed.) L.M. Coluccio. Myosins. Netherlands: Springer. P. 125–169.
- Somero G.N., Childress J.J., 1990. Scaling of ATP-supplying enzymes, myofibrillar proteins and buffering capacity in fish muscle: relationship to locomotory habit // *J.exp. Biol.* V. 149. P. 319–333.
- Tripathi G., 1999 (a). Scaling of some metabolic enzymes in liver of freshwater teleost: an adaptive mechanism // *Z. Naturforsch.* V. 54 c, P. 1103–1106.
- Tripathi G., 1999 (b). Scaling of cytoplasmic and mitochondrial enzymes and proteins in skeletal muscle of a catfish // *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 83, p. 50–56
- Tripathi G., Verma P., 2004. Scaling effects on metabolism of a teleost // *Experimentall Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. V. 301A. P. 718–726
- Watabe S., Ikeda D., 2006. Diversity of the pufferfish *Takifugu rubripes* fast skeletal myosin heavy chain genes // *Comp. Biochem. Physiol.* V. 1D. P. 28–34.
- Yang T., Somero G.N., 1996. Activity of lactate dehydrogenase but not its concentration of messenger RNA Increases with body Size barred sand bass, *Paralabrax nebulifer* (Teleostei) // *Biol. Bull.* V. 191. P. 155–158.

RELATIONSHIP BETWEEN GROWTH CHARACTERISTICS, ACTIVITIES OF SEVERAL ENZYMES AND GENETIC-MOLECULAR PARAMETERS IN WHITE MUSCLE OF WHITEFISH OF DIFFERENT AGES FROM LAKE KAMENNOE (REPUBLIC OF KARELIA)

M.V. Churova, O.V. Meshcheryakova, N.N. Nemova

*Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: mchurova@yandex.ru*

The present study was designed to elucidate the relationship between the several biochemical parameters with weight and length of fish. We studied, activities of cytochrome c oxidase (CCO), lactate dehydrogenase (LDH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and 1-glycerophosphate dehydrogenase (α GPDH), expression levels of several genes (*LDH-A*, *CCO-IV*, Myosin heavy chain (*MyHC*), RNA/DNA ratio in white muscles of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) of two age group (2+, 3+) from Lake Kamennoe (Republic of

Karelia). Relationships between studied parameters were also estimated.

According to the results of research activities of LDH, CCO, MDH, 1GPDH, expression levels of *LDH-A* and *CCO* genes in muscle were well correlated with length and weight of fishes within each age cohort. There were differences in relationship of RNA/DNA with weight and length between fish groups. Relationship between *MyHC* expression level in white muscle and growth characteristics of fish was positive for whitefish of both ages.