



ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ И ПРОТЕОЛИЗ БЕЛКОВ ПЕЧЕНИ САДКОВОЙ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СРЕДОВЫХ ФАКТОРОВ

© 2022 г. Н. П. Канцерова*, #, Е. Д. Тушина*, И. В. Суховская*, Л. А. Лысенко*

*Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Россия, 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

Поступила в редакцию 05.08.2021 г.

После доработки 07.09.2021 г.

Принята к публикации 18.09.2021 г.

В эксперименте показана динамика взаимосвязанных показателей — уровня окислительной модификации (карбонилирования) тканевых белков и активности протеиназ, осуществляющих контроль качества и утилизацию поврежденных, в том числе окисленных, белков (протеасом) — в печени культивируемой радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walb.), как в периоды, благоприятствующие росту рыб, так и при воздействии естественных неблагоприятных факторов. Оба показателя демонстрировали корреляцию с темпом роста рыб, отражающим уровень общего метаболизма и окислительных процессов: содержание белковых карбониллов — положительную ($r = 0.42, p < 0.01$), а активность протеасом — отрицательную ($r = -0.46, p < 0.01$). При действии повреждающих факторов физиологическая динамика образования и утилизации белковых карбониллов нарушалась. Так, кратковременная гипоксия, вызванная падением уровня растворенного в воде кислорода, и метаболическая депрессия по окончании подледного периода приводили к уменьшению окислительного повреждения белков печени рыб, а инфекционные патогены, напротив, — к накоплению окисленных белков, менее выраженному при введении в рацион растительной добавки с антиоксидантной активностью. Активность протеасом, играющих ведущую роль в поддержании протеостаза клетки в условиях окислительного стресса, в рассматриваемых нами ситуациях повышалась лишь при воздействии множественных стрессоров — гипоксии с последовавшим инфицированием рыб. Экспериментальный рацион, содержащий натуральные биоактивные вещества, не изменял физиологическую динамику окисления белков и скорости их утилизации у рыб, растущих в оптимальных условиях, но способствовал сохранению баланса в этой системе и, в целом, повышению устойчивости рыб к действию повреждающих факторов.

Ключевые слова: белковые карбонилы, протеасомы, радужная форель, гипоксия, температура среды, бактериальная инфекция

DOI: 10.31857/S0132342322030083

ВВЕДЕНИЕ

Окислительные процессы лежат в основе энергообмена клетки и служат источником свободных радикалов — активных форм кислорода (АФК), азота и др., которые участвуют в физиологических процессах, но, образуясь в избытке, способны повреждать клеточные компоненты — органеллы, мембраны и макромолекулы. Свободно-радикальные процессы усиливаются при старении, действии прооксидантов и неблагоприятных средо-

вых факторов [1–3] и, в случае их преобладания над эффективностью антиоксидантной системы (АОС), приводят к оксидативному стрессу и накоплению поврежденных макромолекул, в том числе продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) [4]. По современным представлениям, АОС включает не только классические ферменты (каталазу, SOD, GPx, GST и др.) и молекулярные антиоксиданты (глутатион, ретинол, токоферолы), но и ряд транскрипционных факторов (например, Nrf2) и протеиназы контроля качества белков [5]. Контроль качества клеточных белков (в том числе элиминация окисленных (карбонилированных), аминокислотные остатки в которых необратимо модифицированы альдегидными или кетонowymi группами, и в силу этого утративших нативную структуру и биологическую функцию [6])

Сокращения: АГ — арабиногалактан; АОС — антиоксидантная система; АФК — активные формы кислорода; ДГК — дигидрокверцетин; МДА — малоновый диальдегид; ОМБ — окислительная модификация белков; ПОЛ — перекисное окисление липидов; 2,4-ДНФГ — 2,4-динитрофенилгидразин.
Автор для связи: (тел.: +7 (8142) 76-98-10; эл. почта: nkantserova@yandex.ru).

осуществляется путем их протеолитической деградации в аутофаголизосомах [7] и протеасомах [5]. В печени рыб преобладает протеасомный путь гидролиза окисленных белков, включающий энергезависимые этапы их распознавания протеиназами и, в ряде случаев, селективного мечения убиквитином [8]. Убиквитин-протеасомная система (УПС) включает 20S и 26S протеасомные комплексы, в полости которых расщепляются мономерные неубиквитинированные или меченные убиквитином полипептиды [9]; недостаточность протеасомной активности приводит к накоплению дефектных белков.

Помимо физиологической зависимости окислительных процессов в организме рыб от темпа их роста и эффективности АОС, снижающихся с возрастом, уровень белкового окисления у искусственно выращиваемой рыбы зависит от действия множественных стрессоров. Так, в условиях садкового рыбоводства радужная форель *Oncorhynchus mykiss* Walb. подвержена воздействию слабой проточности воды, высокой плотности посадки, летнего подъема температуры воды и ассоциированного с ними кислородного голодания [10, 11]. Стрессоры приводят к снижению темпов роста рыбы, распространению бактериальных инфекций, повышению летальности [12–14]. В современной аквакультуре отдается приоритет стимуляции естественной резистентности выращиваемых видов к повреждающим факторам и сопутствующему окислительному стрессу путем использования натуральных антиоксидантов. Показано, что экстракты гвоздики *Eugenia caryophyllus* и корицы *Cinnamomum zeylanicum*, богатые фенольными соединениями с антиоксидантной активностью, снижают степень перекисного окисления липидов (ПОЛ) в скелетных мышцах нильской тиляпии *Oreochromis niloticus* [15]. При введении в состав корма солодки *Glycyrrhiza glabra* и астрагала *Astragalus membranaceus* усиливается ответная реакция АОС печени желтого окуня *Perca flavescens* на кратковременные гипер-, гипотермию и гипоксию [16]. Стимулирующий потенциал веществ из лиственничного сырья – дигидрокверцетина (ДГК), флавоноида с доказанной антиоксидантной, противовоспалительной и противовирусной активностью [17, 18], и арабиногалактана (АГ), полисахарида с пребиотическим и иммуномодулирующим действием, – успешно применяется в медицине и ветеринарии [18, 19], но недостаточно изучен в аквакультуре [20–22]. Преимущество использования подобных соединений заключается прежде всего в их безопасности для живых организмов и окружающей среды.

Цель настоящей работы – изучение уровня карбонилированных белков и протеолитической активности протеасом в печени садковой радужной форели, выращенной на стандартном или обогащенном ДГК и АГ корме, при воздействии

сезонных изменений средовых факторов, включая повреждающие (летнюю гипертермию, кислородное голодание и бактериальные патогены).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено сравнение биохимических и физиологических показателей у двух групп радужной форели, получавших в течение двух выростных сезонов стандартный коммерческий корм (BioMar, Дания) без добавок (контрольные садки) или с добавкой, включавшей 25 мг ДГК и 50 мг АГ на 1 кг корма (опытные садки). В этот период на выращиваемую в садках форель действовали следующие неблагоприятные факторы: бактериальная инфекция, сезонное повышение температуры воды, гипоксия.

Рост и выживаемость форели. Статистически достоверные различия по темпу роста форели, выращиваемой в течение двух выростных сезонов на стандартном (контроль) и обогащенном смесью ДГК и АГ (опыт) корме, обнаружены не были (табл. 1). Тем не менее можно говорить о тенденции к более высокой скорости роста рыб, выращенных на экспериментальном рационе, поскольку к концу эксперимента средняя масса рыб контрольной группы составила 1947.3 ± 314.7 г, опытной – 2289.3 ± 120.3 г. Несмотря на ранее описанное активирующее влияние смеси ДГК и АГ на механизмы роста мышечной ткани радужной форели (снижение отрицательной регуляции миогенеза миостатином, повышение уровня экспрессии гена тяжелой цепи миозина) при кратковременном действии неблагоприятных факторов

Таблица 1. Относительный темп роста радужной форели, выращиваемой на стандартной диете (контроль) и с добавлением смеси ДГК + АГ (опыт)

Год	Дата	Относительный темп роста, % массы/сутки	
		контроль	опыт
2017	14.07	2.2 ± 1.2	1.7 ± 0.8
	26.07	2.7 ± 0.4	2.7 ± 0.9
	12.08	2.8 ± 1.4	3.7 ± 0.9
	28.08	3.5 ± 1.6	4.3 ± 1.0
	12.09	4.3 ± 1.4	5.3 ± 0.6
	16.11	4.4 ± 0.9	4.2 ± 0.7
2018	12.05	2.2 ± 0.9	2.2 ± 0.6
	27.06	2.7 ± 1.2	3.4 ± 0.9
	17.07	3.5 ± 1.5	3.7 ± 1.3
	24.08	3.9 ± 1.3	4.8 ± 1.6
	18.09	4.1 ± 1.5	4.9 ± 0.7

Примечание: данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($n = 60$).

[21], добавка, по-видимому, не обладает способностью к стимуляции роста рыб в долговременной перспективе.

Летальность среди рыб контрольной и опытной групп была сходной в начале периода наблюдений (июнь 2017 г.) – 0.96 против 0.95% и достоверно различалась ($p < 0.05$, значения в контроле и опыте соответственно) на пике инфекционного заболевания (середина июля – начало августа 2017 г.) – 2.18 против 0.67%, в период низких температур (подледный период декабрь 2017 г. – апрель 2018 г.) – 3.15 против 0.19%, в период высоких температур (конец июля – начало августа 2018 г.) – 1.15% против 0.82%. Полученные результаты согласуются с отмеченной ранее способностью растительных добавок повышать выживаемость культивируемых видов рыб, например, нильской тилапии – на 11% при введении в состав корма экстракта прополиса и алое [23], морского окуня *Dicentrarchus labrax*, инфицированного *Photobacterium damsela*, при скармливании 5% экстракта морских водорослей *Gracilaria* sp. [24].

Окислительная модификация белков печени форели. Окислительная модификация белков печени садковой форели, оцениваемая по концентрации карбонилированных групп в их составе, варьировала в ходе наблюдения вслед за изменением внешних факторов и различалась в ряде случаев у рыб контрольной и опытной групп. Относительно низкое содержание белковых карбониллов в печени форели, выловленной по окончании подледного периода (май 2018 г.; рис. 1), по всей видимости, связано со сниженным уровнем общего метаболизма, включая окислительные процессы, у рыб в ходе зимовки. Описанная реакция была в равной степени выражена у рыб, выращенных на контрольном или обогащенном ДГК и АГ рационе (1.4 ± 0.3 против 1.3 ± 0.3 нмоль/мг белка). Содержание белковых карбониллов, аналогично скорости весового прироста, повышалось в соответствии с сезонным ростом температуры воды (в пределах температурного оптимума *O. mykiss* 14–19°C) у рыб, обитающих в благоприятных для роста условиях и в отсутствие повреждающих факторов (рис. 1). Сезонное накопление окисленных белков в печени форели, коррелирующее с весовым приростом рыб ($r = 0.42$, $p < 0.01$) и достигающее максимума к концу выростного сезона, особенно ярко проявилось в 2018 г. Положительная сезонная динамика ОМБ нарушалась при действии некоторых средовых факторов. Так, при кратковременной гипоксии, вызванной резким падением растворенного в воде кислорода до 5.0 мг/л (при оптимальном >7.0 мг/л для форели) 11–19 июля 2017 г., в печени исследуемых рыб наблюдалось двукратное снижение уровня белковых карбониллов – с 4.2 ± 0.5 до 1.9 ± 0.3 нмоль/мг белка ($p < 0.05$; рис. 1). Это согласуется с имеющимися данными

о том, что гипоксия и аноксия приводят к снижению продукции АФК [25], карбонилированных белков и продуктов ПОЛ в органах и клетках (включая иммунные) рыб, а возвращение к нормоксии – к постепенному восстановлению их уровня [26, 27]. Гипоксия нередко (как и в нашем эксперименте) провоцирует бактериальное заражение рыб; предполагают [27], что повышению восприимчивости рыб к инфекциям способствует вызванная гипоксией дисфункция иммунных клеток крови, цитотоксическое действие которых зависит от АФК. Последовавшее за кислородным голоданием спонтанное инфицирование форели бактериальными патогенами (вторая половина июля 2017 г.) и, возможно, антибиотикотерапия энрофлоксацином (начало августа) вызвали двукратное повышение уровня белковых карбониллов, сохранившееся в контрольной группе рыб до конца выростного сезона 2017 г., в опытной – с частичной отменой эффекта (рис. 1). Бактериальные инфекции, по данным многих исследователей [24, 28], приводят к развитию окислительного стресса и, как следствие, к увеличению содержания белковых карбониллов и продуктов ПОЛ у рыб, а натуральные антиоксиданты способны замедлить окисление белков и липидов в этих условиях [24, 29].

Положительная сезонная динамика ОМБ также нарушалась в период повышения температуры воды сверх оптимальных для форели значений (август 2018 г.; рис. 1), критичного для жизнестойкости особей в целом. Сочетанное действие гипертермии и вызванного ею снижения уровня растворенного кислорода (показатели связаны обратной зависимостью) до нижней границы оптимума *O. mykiss* привело к умеренному снижению ОМБ и, вероятно, других кислород-зависимых процессов (энергопродукции, иммунных реакций цитотоксичности) в тканях рыб. При этом ведущим действующим на рыб фактором, по всей видимости, стала именно умеренная гипоксия, поскольку изолированное влияние гипертермии, по данным литературы, оказывает противоположный биологический эффект – разобщение дыхательной цепи митохондрий, утечку протонов, неполное восстановление кислорода и увеличение продукции АФК [30, 31].

Достоверная разница по содержанию карбонильных производных белков в печени форели контрольной и опытной групп наблюдалась в конце каждого выростного сезона; их содержание было ниже у рыб, получавших с кормом ДГК и АГ, чем у рыб контрольной группы ($p < 0.05$): в 2017 г. – 2.5 ± 0.5 против 4.1 ± 0.6 , в 2018 – 3.5 ± 0.6 против 6.5 ± 1.2 нмоль/мг белка (рис. 1). Полученные результаты, свидетельствующие о способности добавки снижать степень окисления клеточных белков в период нормального роста и при действии повреждающих факторов, согласу-

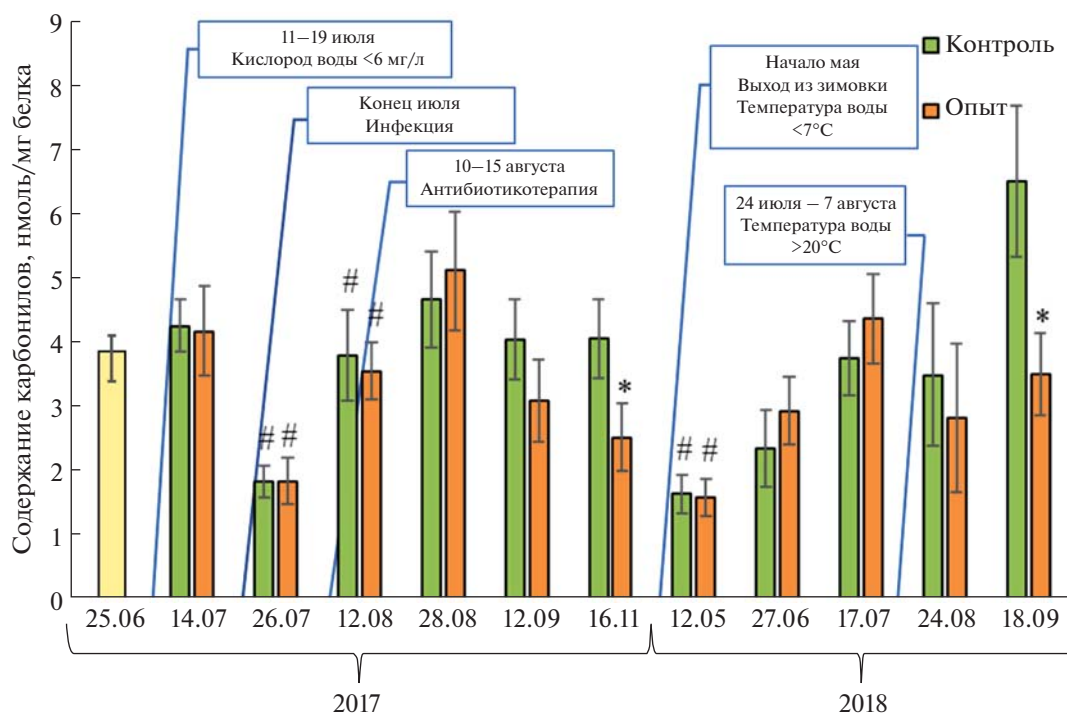


Рис. 1. Содержание карбонилированных белков в печени садковой форели, выращиваемой на стандартной диете (контроль) и с добавлением смеси ДГК + АГ (опыт). * Различия достоверны между контролем и опытом. # Различия достоверны между значениями в текущую и предыдущую дату взятия материала ($p < 0.05$).

ются с ранее описанными эффектами других антиоксидантов близкой ДГК структуры. Например, природный флавоноид ресвератрол снижал *in vitro* уровень МДА и белковых карбониллов в эритроцитах человека, обработанных *трет*-бутилгидропероксидом [32], а также возраст-зависимое накопление окисленных белков в скелетных мышцах камбалы [33] и мышцы [34].

Интенсивность протеасомного протеолиза в печени радужной форели. Полученные данные указывают на физиологически обусловленную зависимость изученных параметров — активности протеасом и белкового окисления — от общего уровня белкового обмена, повышенного в периоды, благоприятные для роста рыб и, напротив, сниженного при действии субоптимальных факторов, включая температурный (гипо- и гипертермию). В нашем эксперименте подтверждено, что более высокий темп роста и метаболизма и сопутствующий им базальный уровень окислительных процессов у молоди рыб компенсируется развитой антиоксидантной системой [34, 35]. Аналогично скорости роста рыб, эффективность АОС, оцениваемая по активности протеасом в печени, была максимальной у рыб первого года жизни, а на втором демонстрировала возрастной регресс (рис. 2). Возрастное снижение интенсивности внутриклеточного белкового обмена и про-

теолитических процессов обнаружено у многих организмов, включая рыб [35, 36].

В благоприятный для роста рыб сезон 2018 г. уровень активности протеасом в их печени положительно коррелировал ($r = 0.325$, $p < 0.05$) с содержанием карбонилированных белков, сходным образом для садковой форели контрольной и опытной групп; однако взаимосвязь нарушалась при действии множественных повреждающих факторов в 2017 г. ($r = -0.11$). Наблюдаемая зависимость отличалась от ранее описанной для клеточных культур, испытывающих внешние воздействия или возрастные изменения, включая астроциты крысы [37], кератиноциты человека при старении [38], фибробласты кожи человека при воздействии УФ-излучения [39], в которых при снижении протеасомной активности возрастало содержание окисленных белков. Как следует из наших и ранее опубликованных наблюдений, подобная взаимосвязь прослеживается не всегда, что предполагает неоднозначную зависимость двух показателей друг от друга и многофакторность их регуляции. Так, в нашей работе повышенная активность протеасом не повлияла на содержание окисленных белков в печени форели при понижении температуры среды (ноябрь 2017 г., по сравнению с сентябрем 2017 г.; рис. 1, 2), аналогично ранее описанному эффекту акклимации молоди рыб семейства Anarhichadidae к гипотер-

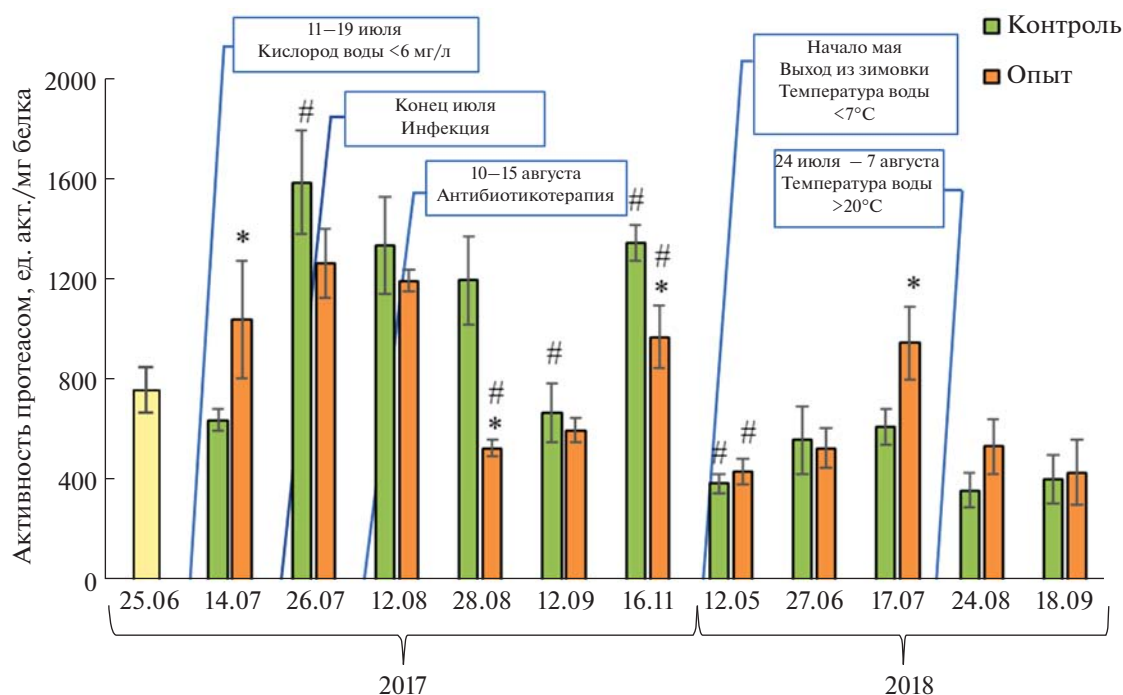


Рис. 2. Химотрипсиноподобная активность протеасом в печени садковой форели, выращиваемой на стандартной диете (контроль) и с добавлением смеси ДГК + АГ (опыт). * Различия достоверны между контролем и опытом. # Различия достоверны между значениями в текущую и предыдущую дату взятия материала ($p < 0.05$).

мии, сопровождавшемуся активацией 20S протеасом в скелетных мышцах при отсутствии влияния на ОМБ [40]. По другим свидетельствам [41], высокая нагрузка на антиоксидантную систему радужной форели, вызванная действием сточных вод, приводила к повышению содержания окисленных белков в печени, но не к изменению активности 20S протеасомы. К настоящему моменту данные об особенностях регуляции протеасом у рыб практически отсутствуют, вместе с тем известно, что активность их каталитических субъединиц регулируется на трансляционном и посттрансляционном уровнях [42]. Установлено, что 20S протеасома более устойчива к воздействию окислительного стресса, чем 26S протеасома; кроме того, последняя в условиях окислительного стресса диссоциирует на коровую частицу 20S и регуляторные комплексы 19S [5], что увеличивает тотальную неселективную (убиквитин-независимую) активность 20S протеасом в клетках. Известно, что 4-гидроксиноненал, продукт ПОЛ, способен связываться с 20S протеасомой и инактивировать ее [43]. Кроме того, показано [5, 42, 44], что накопление сильно окисленных белков может приводить к образованию устойчивых к протеолизу агрегатов, которые подвергаются убиквитинированию и связываются с протеасомами, ингибируя их активность. Таким образом, на активность протеасом могут влиять различные факторы – как эндогенные (продукты окисления

белков и липидов, возраст организма), так и экзогенные (средовые факторы, токсиканты).

В нашем эксперименте особенно выраженное стимулирующее действие на протеасомный механизм утилизации окисленных белков оказал фактор инфицирования рыб. Известно, что провоспалительные сигнальные пути, активирующиеся при инфекции, приводят к усилению катаболических процессов в клетках и подавляют транскрипцию факторов иммунной защиты [45, 46]. У рыб, содержащихся на контрольном рационе, в ответ на действие иницирующего фактора – гипоксии и, возможно, латентной стадии инфекции (14 июля, рис. 2) – наблюдалась инактивация протеасом (644.7 ± 45.2 , $p \leq 0.05$), сопоставимая с ранее описанным эффектом подавлением протеасомной активности у рыб в гипоксических условиях [47], вместе с тем у особей, получавших обогащенный ДГК и АГ корм, в этих условиях развивалась обратная реакция – срочная активация протеасом (1045.8 ± 233.1 , $p \leq 0.05$). Вероятно, активация защитного клеточного механизма – протеасомного пути, развивающаяся в более короткий срок в присутствии биодобавки, отражает один из механизмов ее гепатопротекторного действия, подтвержденного, в частности, для ДГК-содержащего лекарственного средства Legalon® [17, 18]. Гипоксия, как мы предполагаем, сыграла триггерную роль в развитии у рыб бактериальной инфекции, в связи с чем гипоксическое состоя-

ние сменилось окислительным стрессом, который предсказуемо привел к активации протеасомного пути. Более выраженный протеасомозависимый ответ у рыб контрольной группы (26 июля, рис. 2) позволяет предположить у них окислительный стресс большей силы. Как показано ранее, именно 20S протеасомы путем убиквитин-независимого протеолиза поддерживают протеостаз клетки в условиях окислительного стресса [48, 49].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Схема эксперимента и отбор проб. Исследования проводили на форелевом хозяйстве Республики Карелия с июня 2017 г. по сентябрь 2018 г. В июне 2017 г. самок форели (1+) сходной массы 100 ± 2.3 г поместили в садки (5 тыс. особей на садок) и выращивали по сентябрь 2018 г. на дифференцированном рационе в соответствии со схемой эксперимента. В течение двух выростных сезонов (с мая по сентябрь) форель контрольной группы получала стандартный коммерческий корм (BioMar, Дания) без добавок, форель экспериментальной группы – стандартный корм с добавлением смеси ДГК и АГ (25 и 50 мг на кг корма соответственно); дозировка рекомендована производителем (ОАО “Аметис”, Россия; сертификат № 396-08.17); скармливание добавки проводили двухнедельными курсами с двухнедельными перерывами. По окончании выростного сезона 2017 г. обе выборки форели были оставлены на подледный период в тех же садках. В мае 2018 г. рыба (возраст 2+) была выведена из голодания, отсортирована по размеру, и особи среднего размера (733 ± 62.1 и 770 ± 87.1 г для контрольного и опытного садков соответственно) включены в продолжение эксперимента в 2018 г.

Ежедневно фиксировали температуру воды в садках и содержание растворенного кислорода оксиметром Seven2Go Pro S9 (Mettler Toledo, Швейцария). В период наблюдений 2017 г. максимальная температура воды в водоеме составляла 17°C , при этом содержание растворенного кислорода было высоким (7.0–10.9 мг/л), за исключением периода его резкого падения (11–19 июля) до 6.0 мг/л, в отдельные дни – до 5 мг/л (при оптимуме для форели >7.0 мг/л). В 2018 г., с 17 июля по 22 августа, отмечался температурный максимум $19\text{--}22^\circ\text{C}$ (при оптимуме для форели $14\text{--}19^\circ\text{C}$), сопровождавшийся снижением уровня растворенного кислорода до 7.2–8.0 мг/л, минимального за выростной сезон 2018 г.

Помимо естественных вариаций средовых факторов, форель подверглась действию спорадического фактора – бактериальных патогенов. Во второй половине июля 2017 г. у форели обеих групп манифестировала бактериальная геморрагическая септицемия, вызванная ассоциацией

Pseudomonas putida и *Cytophaga psychrophila* (заключение микробиологической экспертизы № 939/22 от 23.08.2017, ФГБНУ “ФНЦ – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко” РАН), в связи с чем рыба обеих групп была подвергнута антибактериальной терапии энрофлоксацином (25 мг/кг рыбы; 10–15 августа 2017 г.). Рыба получала антибиотик с кормом.

В ходе эксперимента, с 25 июня 2017 г. (до введения добавки, нулевая точка) и далее каждые две недели выростного сезона 2017 г. и ежемесячно – в 2018 г., проводили измерения массы и длины форели. Относительный темп роста (% массы/сутки) рассчитывали по формуле: $(W_2 - W_1)/W_1/(t_2 - t_1) \times 100$, где W_1 – начальный вес, W_2 – конечный вес рыб, $(t_2 - t_1)$ – количество суток между измерениями (табл. 1). В те же сроки на льду отбирали образцы (100–200 мг) печени рыб (от 8 особей из каждого садка). Образцы хранили в жидком азоте до начала анализа.

Реагенты и оборудование. В работе использовали химические реагенты, ингибиторы и субстраты протеиназ (Sigma-Aldrich, США), гомогенизатор TissueLyser LT (Qiagen, Германия), центрифугу Allegra 64R (Beckman Coulter, США), мультимодальный планшетный ридер CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия).

Получение препаратов протеиназ. Паренхиму печени гомогенизировали в 20 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.5) с добавлением 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА-Na, 20 мМ ДТТ, 0.1%-ного Triton X-100, 1 мМ АТФ, 5 мМ MgCl₂, ингибиторов протеиназ (1 мМ PMSF, 1 мкг/мл лейпептина, 1 мкг/мл пепстатина) в соотношении 1 : 10 (w/v) и центрифугировали (20000 g, 20 мин).

Анализ протеолитической активности протеасом. Химотрипсиноподобную (ХТП) активность протеасом определяли по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC. Реакционная смесь содержала 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 1 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ АТФ и 30 мкМ субстрат. Флуоресценцию образцов измеряли при длине волны 380 (ex) и 440 нм (em). Истинную ХТП-активность протеасом рассчитывали за вычетом активности примесных протеиназ, определенной в присутствии 5 мкМ MG132, ингибитора ХТП-активности протеасом. Активность (ед. акт.) выражали в условных единицах показаний флуориметра и нормализовали по содержанию в пробах белка.

Содержание белковых карбонильных групп оценивали по методу Levine et al. [50]. К 100 мкл исследуемого образца, полученного при гомогенизации ткани в 20 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7.5 (соотношение 1 : 10, w/v) и дальнейшем центрифугировании (20000 g, 20 мин), добавляли 500 мкл 0.2%-ного

2,4-ДНФГ, растворенного в 2 М HCl (опыт), или 500 мкл 2 М HCl (контроль). Реакционную смесь инкубировали 1 ч в темноте при комнатной температуре, затем добавляли 500 мкл 20%-ной ТХУ, выдерживали 10 мин при 4°C и центрифугировали (10000 g, 10 мин). Осадок промывали дважды смесью этанол : этилацетат (1 : 1), высушивали и растворяли в 1 мл 6 М гуанидингидрохлорида при нагревании до 90°C. Продукты реакции кетонных и альдегидных функциональных групп с 2,4-ДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразоны – регистрировали спектрофотометрически при 370 нм. Количественное содержание динитрофенилгидразонов рассчитывали с использованием коэффициента их молярной экстинкции, равного $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, и выражали в нм/мг белка.

Анализ содержания белка. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [51] с использованием BSA в качестве стандарта.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ результатов проводили при помощи критерия Краскела–Уоллиса с последующим сравнением выборок с использованием критерия Манна–Уитни. Коэффициенты корреляции между сравниваемыми показателями определяли по Пирсону.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе работы изучен уровень карбонилированных белков и протеолитической активности протеасом в печени садковой радужной форели, выращенной на стандартном или обогащенном ДГК и АГ корме, при воздействии средовых факторов (летней гипертермии, кислородного голодания и бактериальной инфекции). Изученная в работе динамика содержания окисленных клеточных макромолекул и активности протеасомного пути их утилизации оказалась тесно связана с процессами роста рыб и, по всей видимости, интенсивностью обменных процессов, включая белковый метаболизм и окислительные пути энергопродукции, приводящие к генерации АФК. Нами установлена зависимость уровня белкового окисления в печени форели от сезонной вариативности природных факторов, включая повреждающие – гипо- и гипертермию, гипоксию, бактериальную инфекцию. В условиях окислительного стресса, вызванного инфекционным заболеванием, избыточное образование белковых карбониллов приводит к активации протеасом – компонентов АОС, отвечающих за деградацию необратимо поврежденных окислением белковых молекул. Наблюдаемое накопление окисленных тканевых белков, вызванное действием на организм повреждающих средовых факторов, может быть следствием как их избыточного образования, так и подавления путей их элиминации; по нашим данным, обогащение ра-

циона кормовой растительной добавкой с антиоксидантным действием способствует поддержанию баланса этих процессов.

Основным показанием к практическому применению изученной добавки может служить профилактика заболеваемости и повышение естественной резистентности рыб в условиях искусственного выращивания, связанного с действием неблагоприятных факторов различной природы (погодных, инфекционных, антропогенных). Учитывая природное происхождение ДГК и АГ, получаемых водно-спиртовой экстракцией из отходов заготовки лиственницы, и, как следствие, их безопасность, нетоксичность, биоразлагаемость, становится очевидным преимуществом изученной добавки в сравнении с применяемыми в рыбоводной практике антибиотиками, гормонами, вакцинами, как для здоровья выращиваемой рыбы, так и для экосистем водоемов, используемых для садкового рыбоводства.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность О.Н. Кремневу за организацию работы на форелевом хозяйстве.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ “Карельский научный центр РАН”.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Садковый эксперимент и камеральная обработка биологического материала выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-74-20098). Фундаментальные сведения о биологической роли протеасом у рыб изучены в рамках государственного задания КарНЦ РАН FMEN-2022-0006.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работы проведены на самках радужной форели с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС), и правил проведения работ с экспериментальными животными.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parvez S., Raisuddin S. // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2005. V. 20. P. 112–117.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.11.002>
2. Lu Y., Wu Z., Song Z., Xiao P., Liu Y., Zhang P., You F. // Fish Shellfish Immunol. 2016. V. 58. P. 125–135.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.008>

3. *Johnstone J., Nash S., Hernandez E., Rahman M.S.* // *Mar. Environ. Res.* 2019. V. 149. P. 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.05.017>
4. *Шлапакова Т.И., Костин Р.К., Тягунова Е.Е.* // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 466–485. [*Shlapakova T.I., Kostin R.K., Tyagunova E.E.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 657–674.] <https://doi.org/10.1134/S1068162020050222>
5. *Vasilopoulou M.A., Ioannou E., Roussis V., Chondrogiani N.* // *Redox Biol.* 2021. V. 41. P. 101897. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101897>
6. *Nyström T.* // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 311–317. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600599>
7. *Siemieniuk E., Kolodziejczyk L., Skrzydlewska E.* // *Toxicol. Mech. Methods.* 2008. V. 18. P. 519–524. <https://doi.org/10.1080/15376510701624001>
8. *Старкова Н.Н., Королева Е.П., Ротанова Т.В.* // *Биоорг. химия.* 2000. Т. 26. С. 83–96. [*Starkova N.N., Koroleva E.P., Rotanova T.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2000. V. 26. P. 71–84.] <https://doi.org/10.1007/BF02759152>
9. *Ardley H.C., Robinson P.A.* // *Essays Biochem.* 2005. V. 41. P. 15–30. <https://doi.org/10.1042/EB0410015>
10. *Каницерова Н.П., Чурова М.В., Лысенко Л.А., Тушина Е.Д., Родин М.А., Крупнова М.Ю., Суховская И.В.* // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 729–735. [*Kantserova N.P., Churova M.V., Lysenko L.A., Tushina E.D., Rodin M.A., Krupnova M.Yu., Sukhovskaya I.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 1181–1186.] <https://doi.org/10.1134/S1068162020060114>
11. *Skov P.V., Larsen B.K., Frisk M., Jokumsen A.* // *Aquaculture.* 2011. V. 319. P. 446–452. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.008>
12. *Ackerman P.A., Forsyth R.B., Mazur C.F., Iwama G.K.* // *Fish Physiol. Biochem.* 2000. V. 23. P. 327–336. <https://doi.org/10.1023/A:1011107610971>
13. *Palmisano A.N., Winton J.R., Dickhoff W.W.* // *Mar. Biotechnol.* 2000. V. 2. P. 329–338. <https://doi.org/10.1007/s101260000005>
14. *Tort L.* // *Dev. Comp. Immunol.* 2011. V. 35. P. 1366–1375. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>
15. *Sary C., Carbonera F., Todesco H., Nunes do Prado I., Visentainer J.V., Oliveira M., da Silva M.C., Ribeiro R.P., Lewandowski V.* // *Aquac. Res.* V. 50. P. 673–679. <https://doi.org/10.1111/are.13944>
16. *Elabd H., Wang H.-P., Shaheen A., Yao H., Abbass A.* // *Aquac. Rep.* 2017. V. 8. P. 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.09.002>
17. *Teselkin Y.O., Babenkova I.V., Kolhir V.K., Baginskaya A.L., Tjukavkina N.A., Kolesnik Y.A., Selivanova I.A., Eichholz A.A.* // *Phytother. Res.* 2020. V. 14. P. 160–162. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1573\(200005\)14:3<160::aid-ptr555>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1573(200005)14:3<160::aid-ptr555>3.0.co;2-y)
18. *Weidmann A.E.* // *Eur. J. Pharmacol.* 2012. V. 684. P. 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.03.035>
19. *Ma C., Zu Y., Li J., Li W., Liu S.* // *Ind. Crop. Prod.* 2017. V. 95. P. 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.040>
20. *Awad E., Awaad A.S., Esteban M.A.* // *Fish Shellfish Immunol.* 2015. V. 43. P. 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.009>
21. *Kantserova N.P., Lysenko L.A., Churova M.V., Tushina E.D., Sukhovskaya I.V., Nemova N.N.* // *Int. Aquat. Res.* 2020. V. 12. P. 63–73. [https://doi.org/10.22034/IAR\(20\).2020.671431](https://doi.org/10.22034/IAR(20).2020.671431)
22. *Fokina N.N., Lysenko L.A., Ruokolainen T.R., Sukhovskaya I.V., Kantserova N.P., Nemova N.N.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020. V. 56. P. 356–362. <https://doi.org/10.1134/S0003683820030035>
23. *Dotta G., de Andrade J.I.A., Garcia P., Alves Jesus G.F., Mouriño J.L.P., Mattos J.J., Dias Bainy A.C., Martins M.L.* // *Fish Shellfish Immunol.* 2018. V. 79. P. 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.024>
24. *Peixoto M.J., Ferraz R., Magnoni L.J., Pereira R., Gonçalves J.F., Caldach-Giner J., Pérez-Sánchez J., Ozório R.O.A.* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 16134. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52693-6>
25. *Lushchak V.I., Bagnyukova T.V.* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2006. V. 144. P. 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.02.014>
26. *Lushchak V.I., Bagnyukova T.V., Lushchak O.V., Storey J.M., Storey K.B.* // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005. V. 37. P. 1319–1330. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.006>
27. *Maita M.* // *J. Aquac. Res. Develop.* 2015. V. 6. P. 6. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.S1.002>
28. *Adeyemi J.A.* // *Fish Physiol. Biochem.* 2014. V. 40. P. 347–354. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9847-x>
29. *Griffiths H.R.* // *Nutr. Res Rev.* 2002. V. 15. P. 3–17. <https://doi.org/10.1079/NRR200134>
30. *Becker D., Brinkmann B.F., Zeis B., Paul R.J.* // *Biol. Cell.* 2011. V. 103. P. 351–363. <https://doi.org/10.1042/BC20100145>
31. *Paital B., Chainy G.B.* // *J. Therm. Biol.* 2014. V. 41. P. 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.02.013>
32. *Pandey K.B., Rizvi S.I.* // *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2009. V. 34. P. 1093–1097. <https://doi.org/10.1139/H09-115>
33. *Wilson W.N., Baumgarner B.L., Watanabe W.O., Alam M.S., Kinsey S.T.* // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2015. V. 183. P. 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.12.014>
34. *Olesen J., Ringholm S., Nielsen M.M., Brandt C.T., Pedersen J.T., Halling J.F., Goodyear L.J., Pilegaard H.* // *Exp. Gerontol.* 2013. V. 48. P. 1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.07.015>
35. *Almroth B.C., Johansson A., Förlin L., Sturve J.* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2010. V. 155. P. 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.01.012>
36. *Nemova N.N., Lysenko L.A., Kantserova N.P.* // *Russ. J. Dev. Biol.* 2016. V. 47. P. 161–172. <https://doi.org/10.1134/S1062360416040068>

37. Zheng J., Bizzozero O.A. // *J. Neurochem.* 2010. V. 115. P. 1556–1567.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07062.x>
38. Petropoulos I., Conconi M., Wang X., Hoemel B., Brégègère F., Milner Y., Friguet B. // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2000. V. 55. P. 220–227.
<https://doi.org/10.1093/gerona/55.5.b220>
39. Catalgol B., Ziaja I., Breusing N., Jung T., Höhn A., Alper-tunga B., Schroeder P., Chondrogianni N., Gonos E.S., Petropoulos I., Friguet B., Klotz L.O., Krutmann J., Grune T. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 30076–30086.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.044503>
40. Lamarre S.G., Le François N.R., Driedzic W.R., Blier P.U. // *J. Exp. Biol.* 2009. V. 212. P. 1294–12301.
<https://doi.org/10.1242/jeb.028290>
41. Almroth B.C., Albertsson E., Sturve J., Förlin L. // *Eco-toxicol. Environ. Saf.* 2008. V. 70. P. 370–380.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.01.023>
42. Grune T., Jung T., Merker K., Davies K.J. // *Int. J. Bio-chem. Cell Biol.* 2004. V. 36. P. 2519–2530.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.020>
43. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. // *Free Radic. Biol. Med.* 1991. V. 11. P. 81–128.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)
44. Jung T., Höhn A., Grune T. // *Redox Biol.* 2014. V. 2. P. 99–104.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.008>
45. Pooley N.J., Tacchi L., Secombes C.J., Martin S.A.M. // *BMC Genomics.* 2013. V. 14. P. 747.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-747>
46. Sassin W. // *Beacon J. Stud. Ideol. Ment. Dimens.* 2020. V. 3. P. 020440211.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.4459199>
47. Abu-El-Rub E., Sequiera G.L., Sareen N., Yan W., Moudgil M., Golam Sabbir M., Dhingra S. // *Cell Death Dis.* 2019. V. 10. P. 90.
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1359-x>
48. Pickering A.M., Davies K.J. // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2012. V. 109. P. 227–248.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397863-9.00006-7>
49. Raynes R., Pomatto L.C., Davies K.J. // *Mol. Aspects Med.* 2016. V. 50. P. 41–55.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.05.001>
50. Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. // *Methods Enzymol.* 1994. V. 233. P. 346–357.
[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33040-9)
51. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Oxidative Modification and Proteolysis of Hepatic Proteins in Reared Rainbow Trout Impacted by Environmental Variables

N. P. Kantserova*, #, E. D. Tushina*, I. V. Sukhovskaya*, and L. A. Lysenko*

#Phone: +7 (8142) 76-98-10; e-mail: nkantserova@yandex.ru

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

The experiment shows the dynamics of related indices, such as the level of oxidative modification (carbonylation) of tissue proteins and the activity of proteases of quality control and utilization of damaged and oxidized proteins (proteasomes), in the liver of cultivated rainbow trout both during periods favorable for fish growth, as well as when impacted by unfavorable environmental variables. Both parameters showed a correlation with fish growth rate corresponding with the level of total metabolism and oxidative processes, while positive for the content of protein carbonyls ($r = 0.42$, $p < 0.01$) and negative for the activity of proteasomes ($r = -0.46$, $p < 0.01$). In fish affected by damaging factors, the physiological dynamics of the generation and utilization of protein carbonyls had been disturbed. Thus, short-term hypoxia caused by a drop in the level of dissolved oxygen and metabolic depression at the end of the wintering period both have led to a decrease in oxidative damage to proteins in fish liver, whereas infectious pathogens resulted in the accumulation of oxidized proteins, less pronounced if the diet included a plant supplement with antioxidant activity. The activity of proteasomes, which play a key role in maintaining cell proteostasis under oxidative stress, increased in fish under multiple stressors, including hypoxia and subsequent infection. The experimental diet containing natural bioactive substances did not change the physiological dynamics of protein oxidation and the rate of their utilization in fish growing under optimal conditions whereas maintained a balance in this system and, in general, increased fish resistance to the effect of unfavorable factors.

Keywords: protein carbonyls, proteasomes, rainbow trout, hypoxia, water temperature, bacterial infection