

**Влияние антиоксидантных добавок на
показатели роста и оксидативного стресса
у искусственно выращиваемых рыб.
Садковая форель как модельный объект**



**ЛЫСЕНКО Л.А.
КАНЦЕРОВА Н.П.
СУХОВСКАЯ И.В.
ЧУРОВА М.В.
НЕМОВА Н.Н.**

3 сектора

- рыба 66,3% (ок. 17% потребляемого человеком белка)
- моллюски 22,8%
- ракообразные 9,7%

Развитие аквакультуры связано с развитием знаний в области

- генетики организмов
- современных подходов к питанию и поддержанию здоровья животных, профилактике заболеваний (пробиотики, вакцинация)
- усовершенствования кормопроизводства
- оценки благополучия и снижения уровня стресса у животных
- современных подходов к выявлению и лечению болезней (антибиотики и др.)

Повышение продуктивности рыбоводства должно соответствовать требованиям

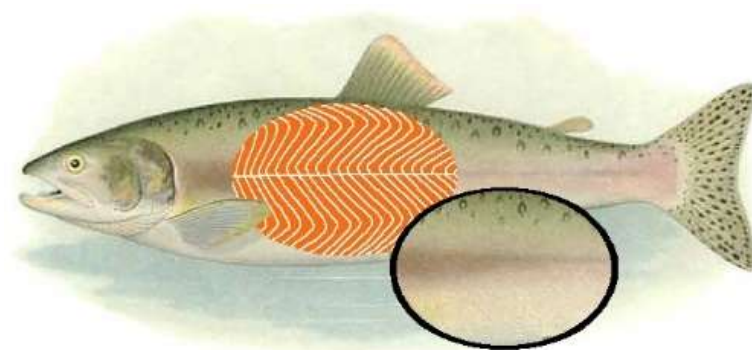
- гипотеза «One health»
- сохранение естественных водоемов

Рост Костистых рыб (Teleostei) недетерминирован

- максимальная скорость роста – до половой зрелости
- наибольшая индивидуальная вариабельность – от 5 до 300 г (у Лососевых)
- скорость роста зависит от экологических факторов и обеспеченности пищей

Классические маркеры роста

- соотношение РНК/ДНК
- уровень экспрессии миозина, *MyHC*
- активность ключевых ферментов пищеварения и метаболизма
- содержание липидов, особенно триацилглицеринов
- соотношение триацилглицерины / холестерин



Особенности роста рыб

Функции скелетных мышц

– структурная

– метаболическая (основное депо белков)

скелетные мышцы >50% массы тела рыб

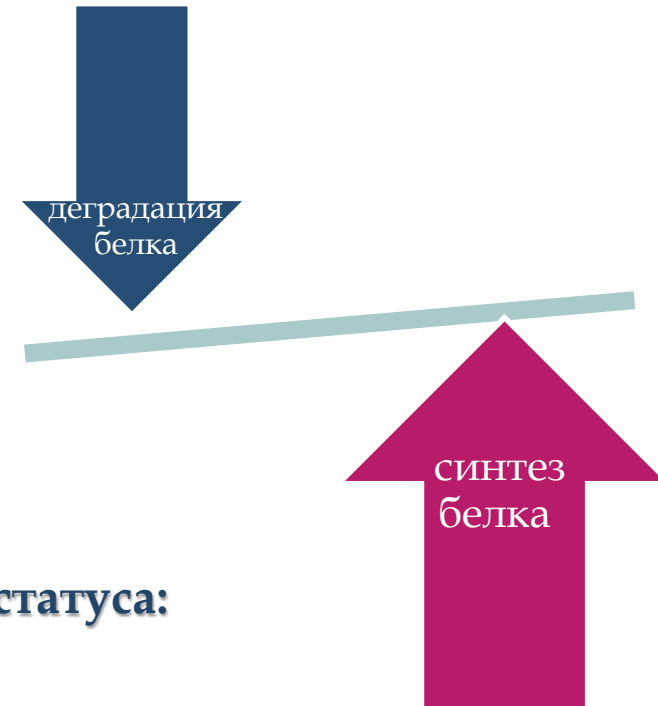
миофибриллярные белки – 50% всего белка в организме

миозин – 50% мышечных белков

25% всего белка в организме

Аккумуляция белка определяется соотношением

синтез белка / деградация белка



Анаболические и катаболические изменения

в зависимости от физиологического статуса:

- период активного роста
 - высокая скорость синтеза и обмена белка
- периоды созревания гонад, голодания, нерестовой миграции
 - преобладает катаболизм белка

Сигнальные пути регуляции белкового синтеза в мышцах

Гормон роста – гормон IGF

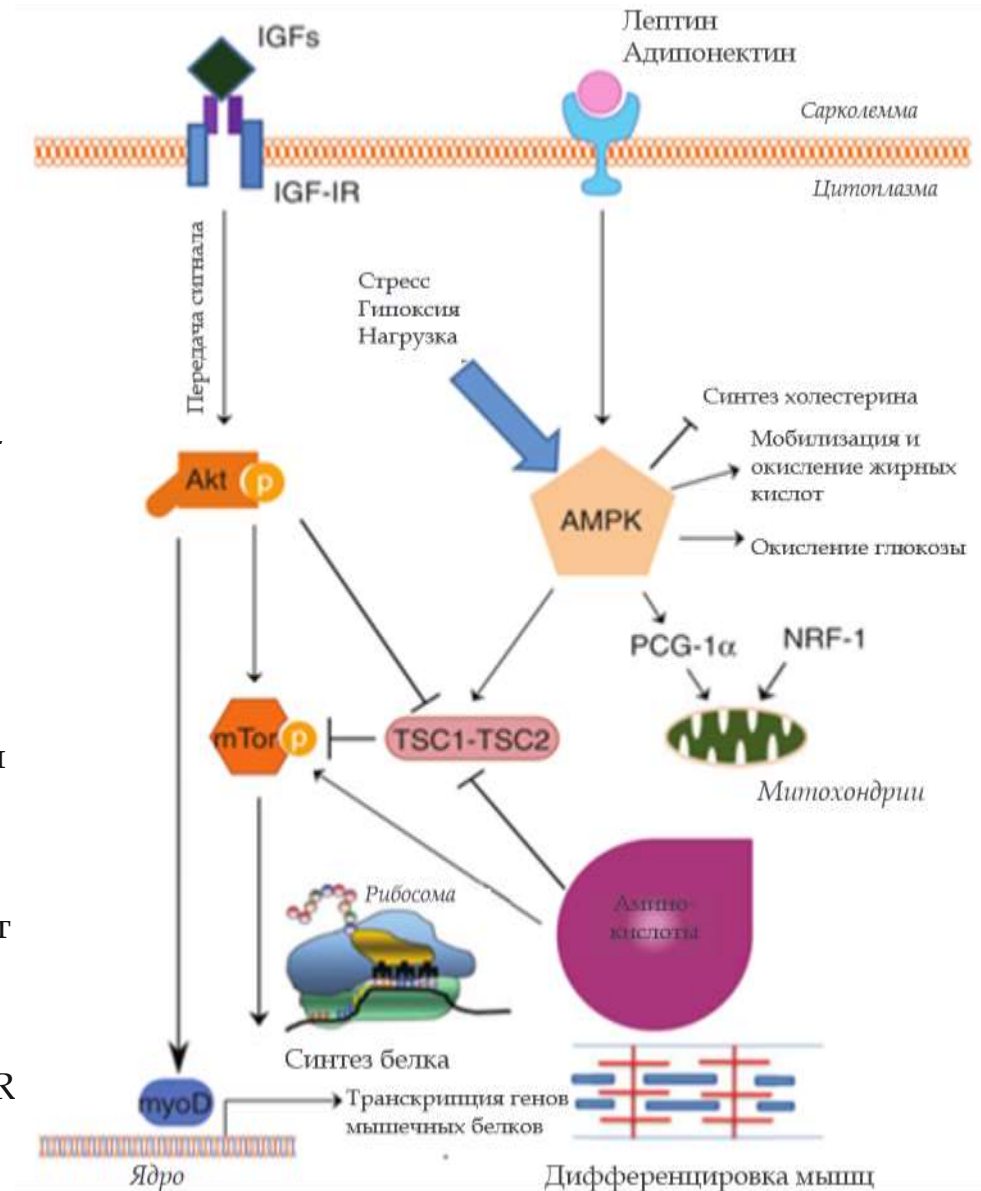
сигнальный каскад фосфорилирования

протеинкиназа Akt:

1. фосфорилирует TOR – повышение уровня белкового синтеза за счет регуляции белков контроля трансляции мРНК
2. повышает транскрипционную активность *myoD* – повышение транскрипции миогенных генов

Гормоны **лептин, адипонектин и стресс-индуцирующие факторы** (вкл. гипоксию, физнагрузку) активируют путь AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK):

1. активация катаболических путей, включая поглощение и окисление глюкозы и жирных кислот
2. ингибирование анаболических энергозависимых процессов, включая синтез холестерина и белка. Ингибирование трансляции – через ингибитор TOR



Генетически модифицированный лосось (AquaBounty fish)

ГМ лосось

Длина: 61 см
Вес: 3,0 кг



FISH AT 18 MONTHS OLD

WT лосось

Длина: 33 см
Вес: 1,3 кг



Атлантический лосось



чавыча



угревидная бельдюга



Source: U.S. Food and Drug Administration, AquaBounty Technologies

« + »

Удовлетворение растущего
потребительского спроса на рыбу
Снижение прессы на естественные
популяции лососевых
Потребляет на 25% меньше корма
Снижение затрат на выращивание

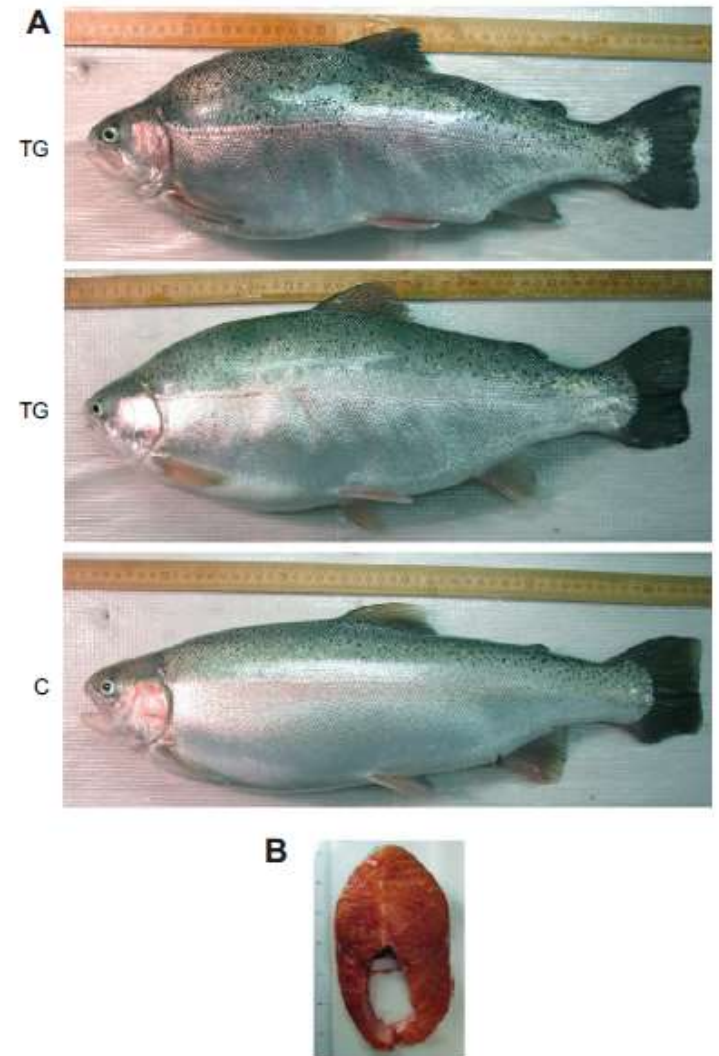
« - »

Долговременные эффекты не изучены
При попадании в водоемы угрожают
естественным популяциям
Необходимость маркировки

Рост лососевых рыб. Миостатин

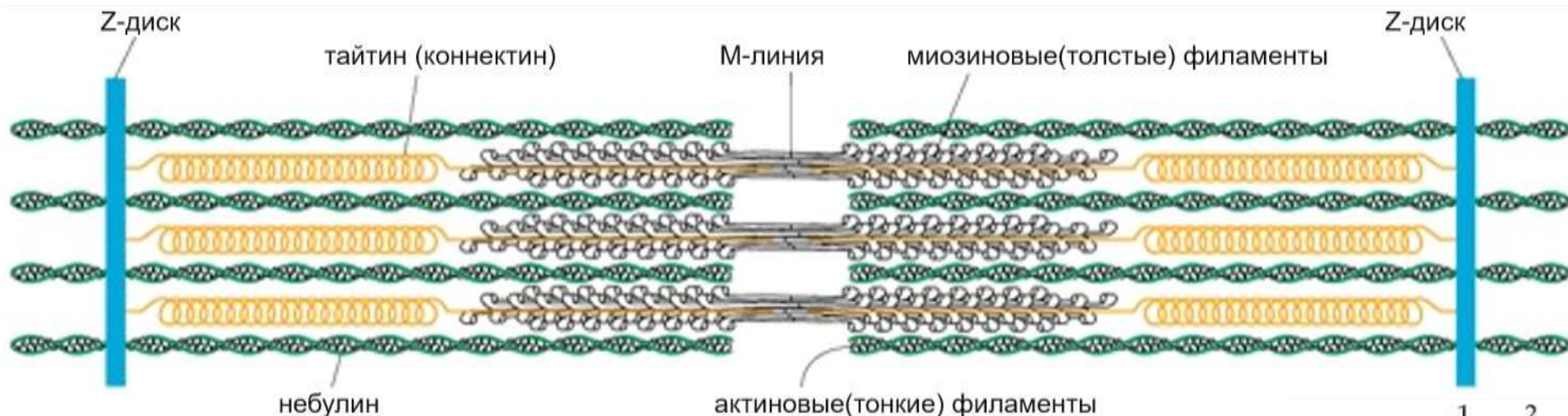
Миостатин

- цитокин семейства $TGF\beta$
- высоко консервативный полипептид у рыб и наземных позвоночных
- у костистых рыб – множественные формы миостатина, дифференциально экспрессирующиеся в большинстве тканей
- рецептор миостатина и активина A – *acvr2b*, у рыб – две и более формы
- *in vitro* ингибиторы миостатина – фоллистатин и продомен миостатина, механизмы регуляции общие с млекопитающими



A – локализованная закладка мускулатуры у радужной форели, трансгенной по *acvr2b δ* (TG, P1) в сравнении с контролем (C).
B – асимметричный рост мышц на поперечном срезе

Архитектура скелетных мышц



Миозин + актин = 90% миофибриллярных белков

Миозин (тяжелая цепь миозина) – основной компонент толстых (миозиновых) филаментов. В легко отщепляемых миофиламентах ниже содержание актина и α -актинина.

Миофиламенты скелетных мышц рыб короче и менее компактны, чем у млекопитающих

➡ легче подвергаются «разборке»



Электрофореграмма скелетных мышц

1 – фракция миофибрилл

2 – фракция несвязанных миофиламентов

Пути внутриклеточного протеолиза

✦ лизосомально-аутофагический

катепсины – у рыб более 20, ключевые ферменты – CatD, CatB

✦ нелизосомальный

кальпаины

Ca²⁺-зависимые протеиназы

протеасомы

АТФ-зависимые

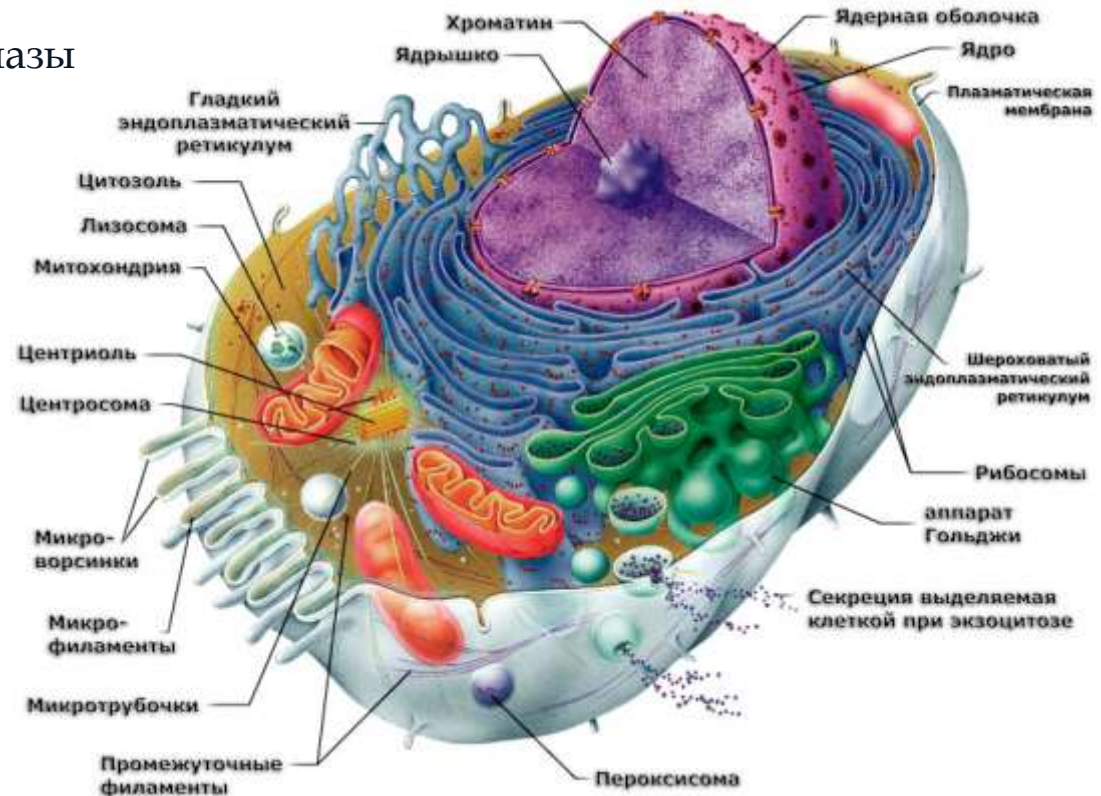
каспазы

Lon-протеиназы

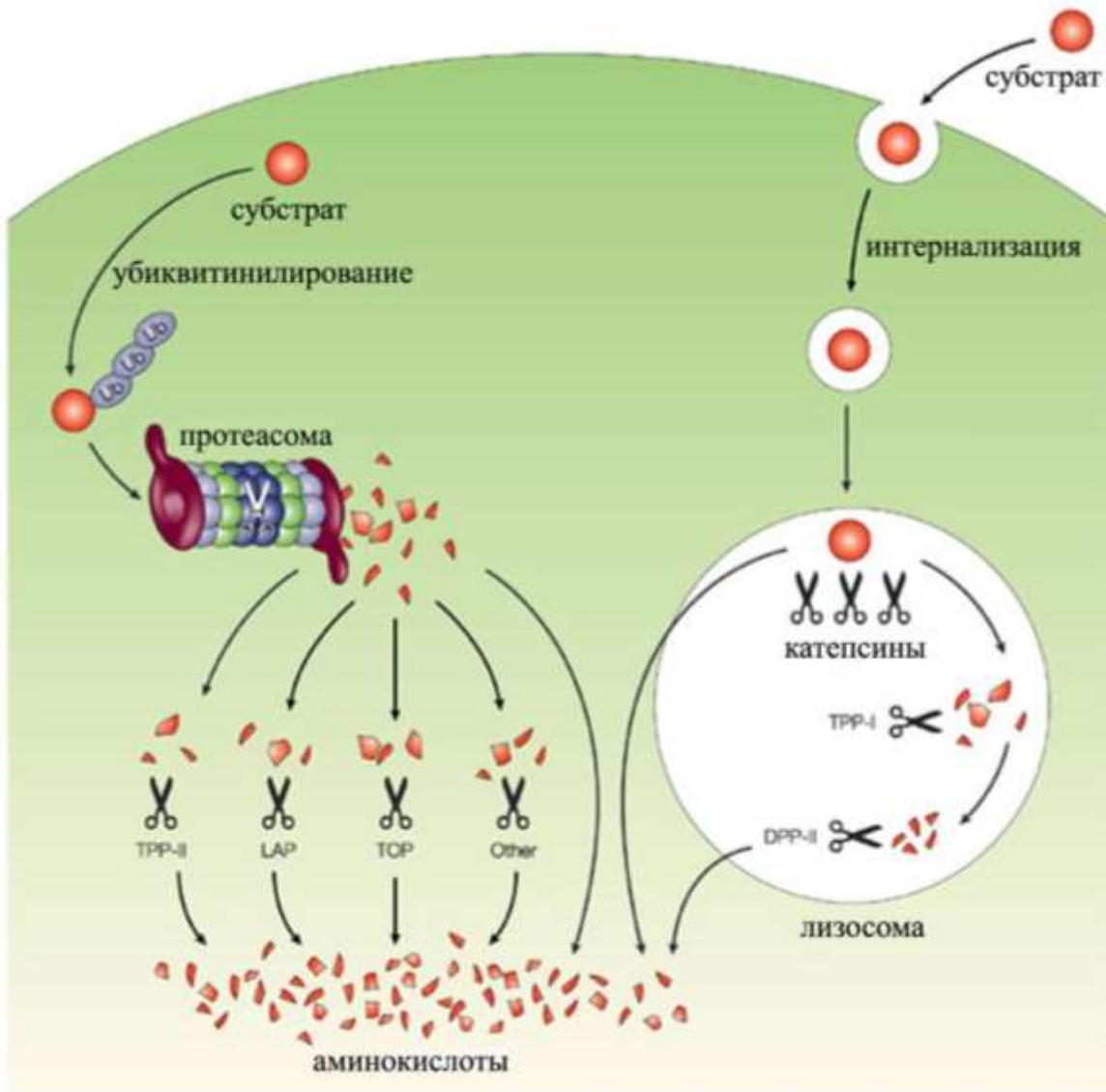
АТФ-зависимые, МХ

протеин конвертазы

ЭПР



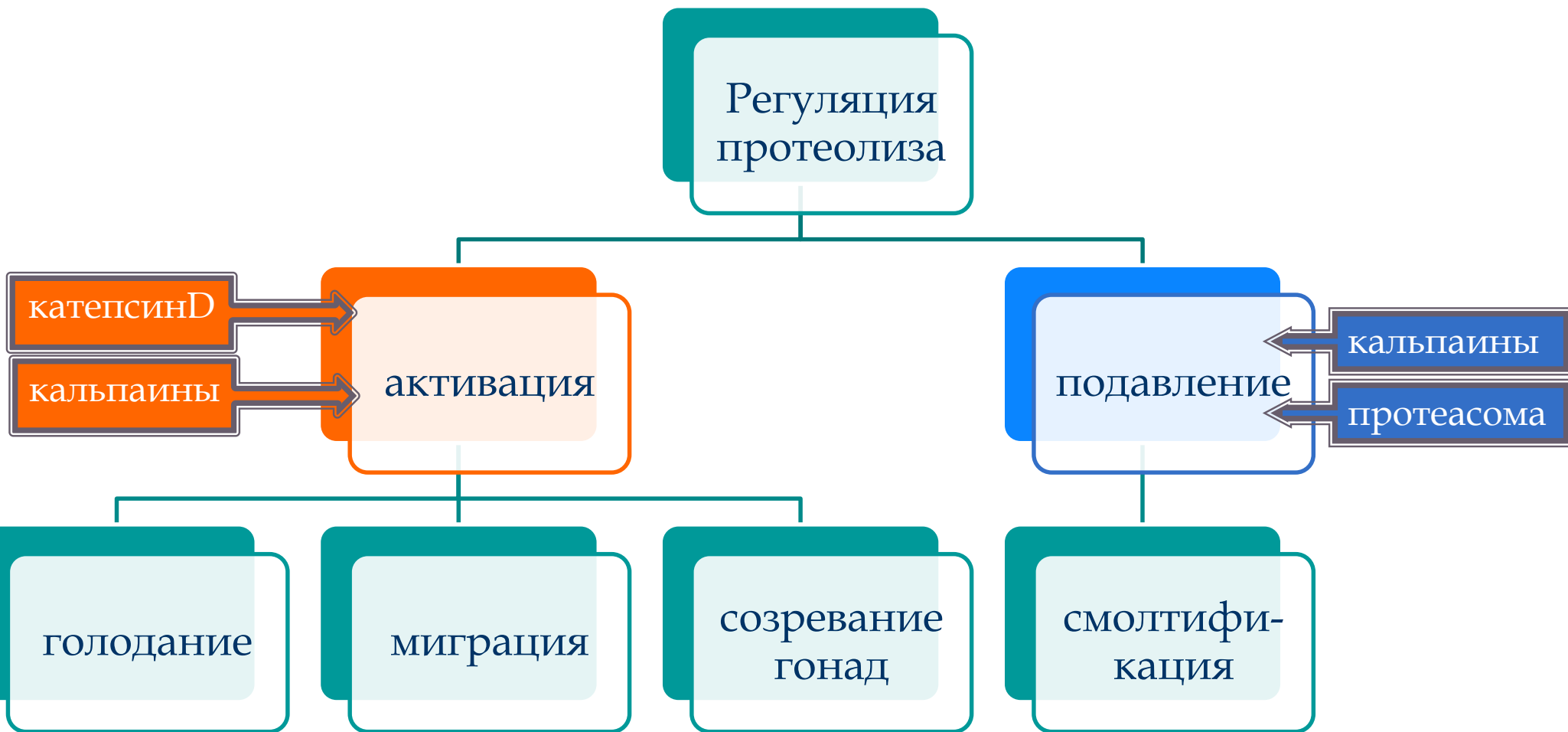
Белковая деградация



Особенность скелетных мышц – протеасома не способна расщеплять белки в составе миофибрилл, необходима их «разборка» кальпайнами

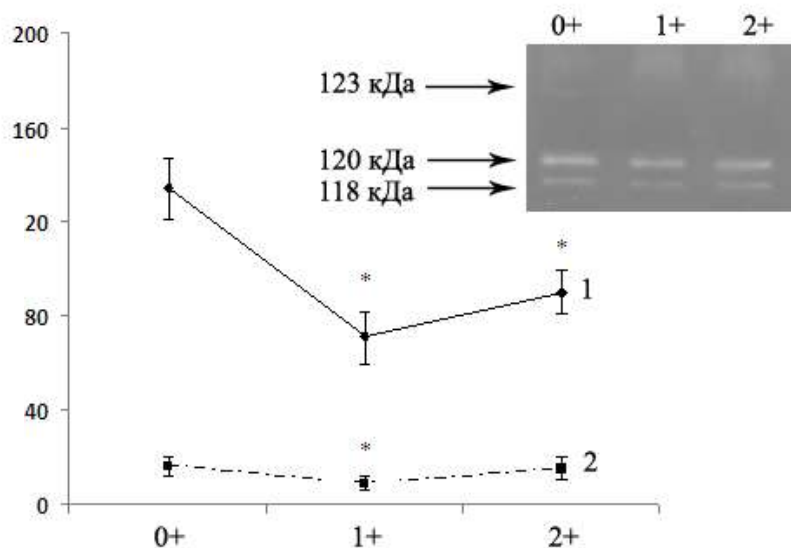


Физиологическая регуляция протеиназ



Протеолитическая активность в мышцах лосося

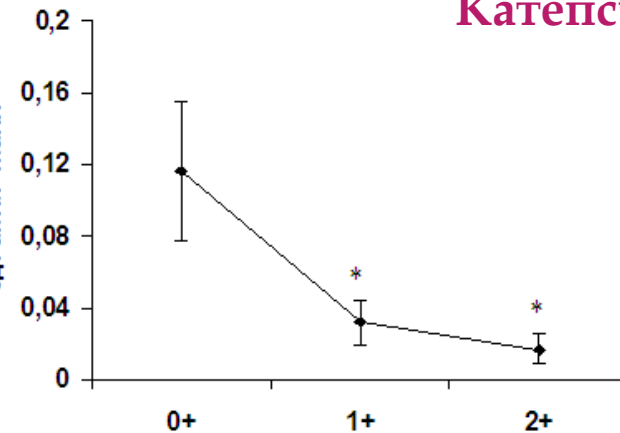
Кальпаины



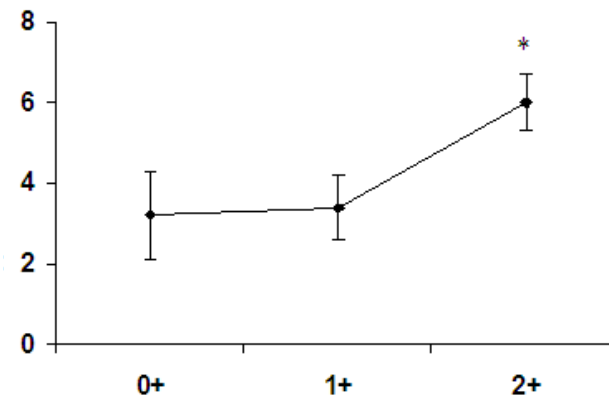
* Отличие от парров 0+

Возраст	Длина, см	Вес, г
0+ сеголетки	5.64 ± 0.13	1.38 ± 0.09
1+ парры	9.75 ± 0.15	6.96 ± 0.31
2+ парры	11.56 ± 0.69	9.95 ± 0.86

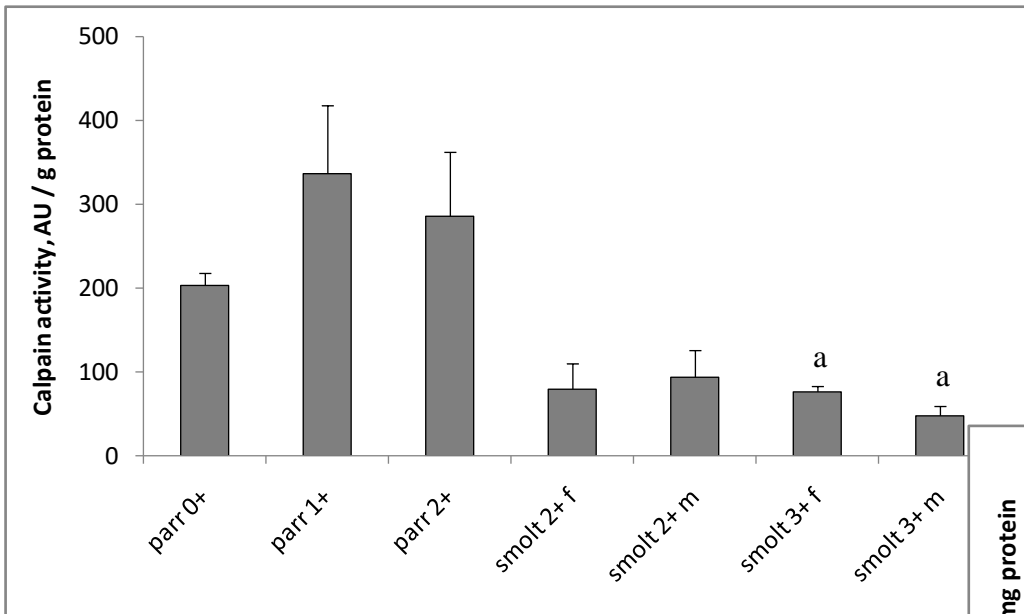
Катепсин D



Катепсин В



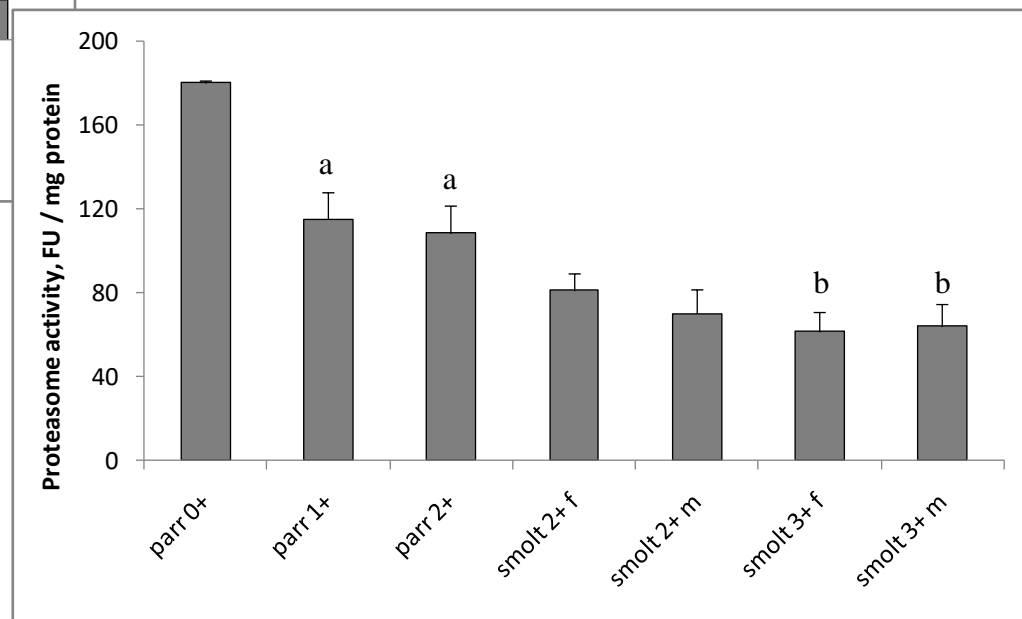
Протеолитическая активность у парров и смолтов лосося



Кальпайны

a – отличие от парр 2+

У парров лосося уровень протеолитической активности связан положительной корреляцией с уровнем экспрессии *MyHC* и миогенных факторов

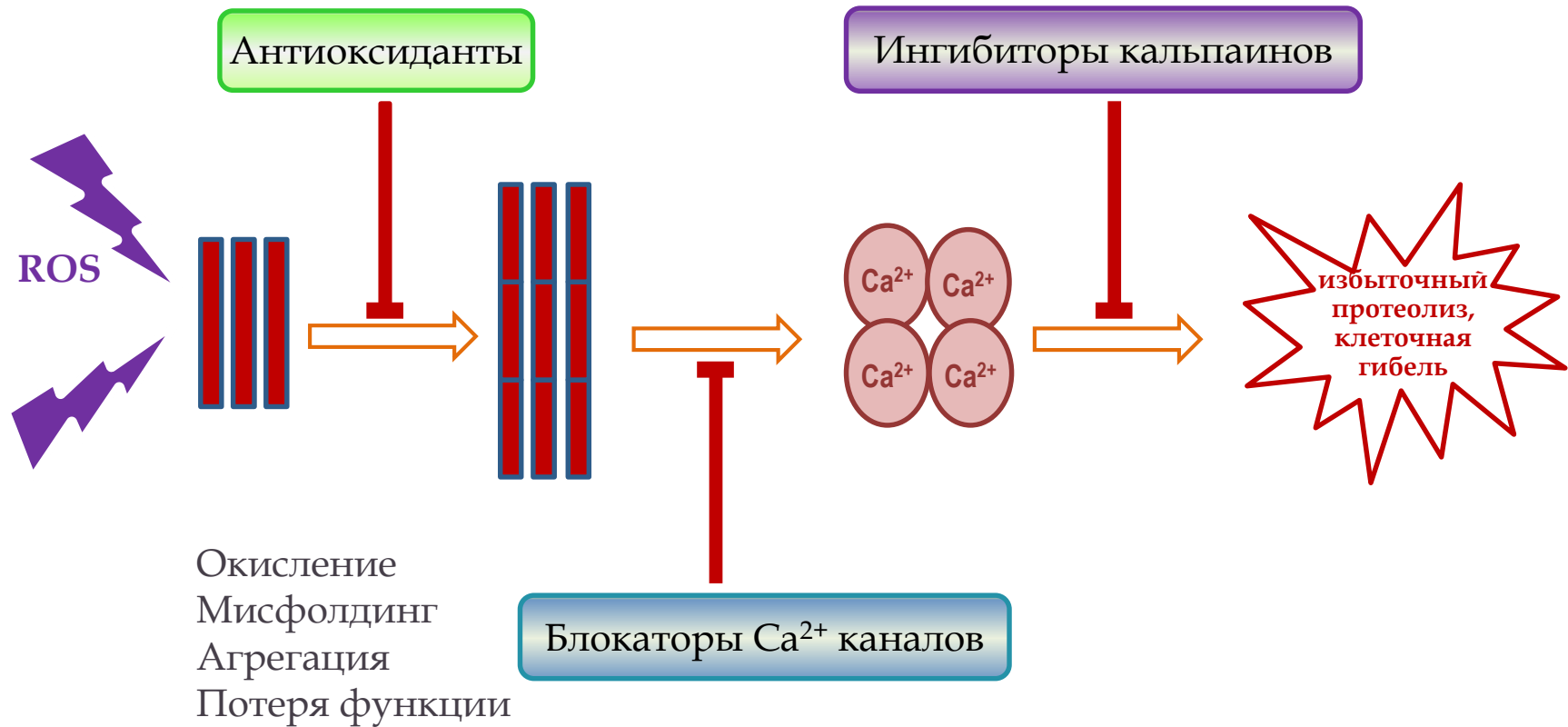


Протеасома

a – отличие от парр 0+, b – отличие от парр 2+

Мышцы смолтов и парр лосося сходного возраста достоверно различаются протеолитической активностью, но не миогенным потенциалом

Известные способы подавления кальпаинового пути

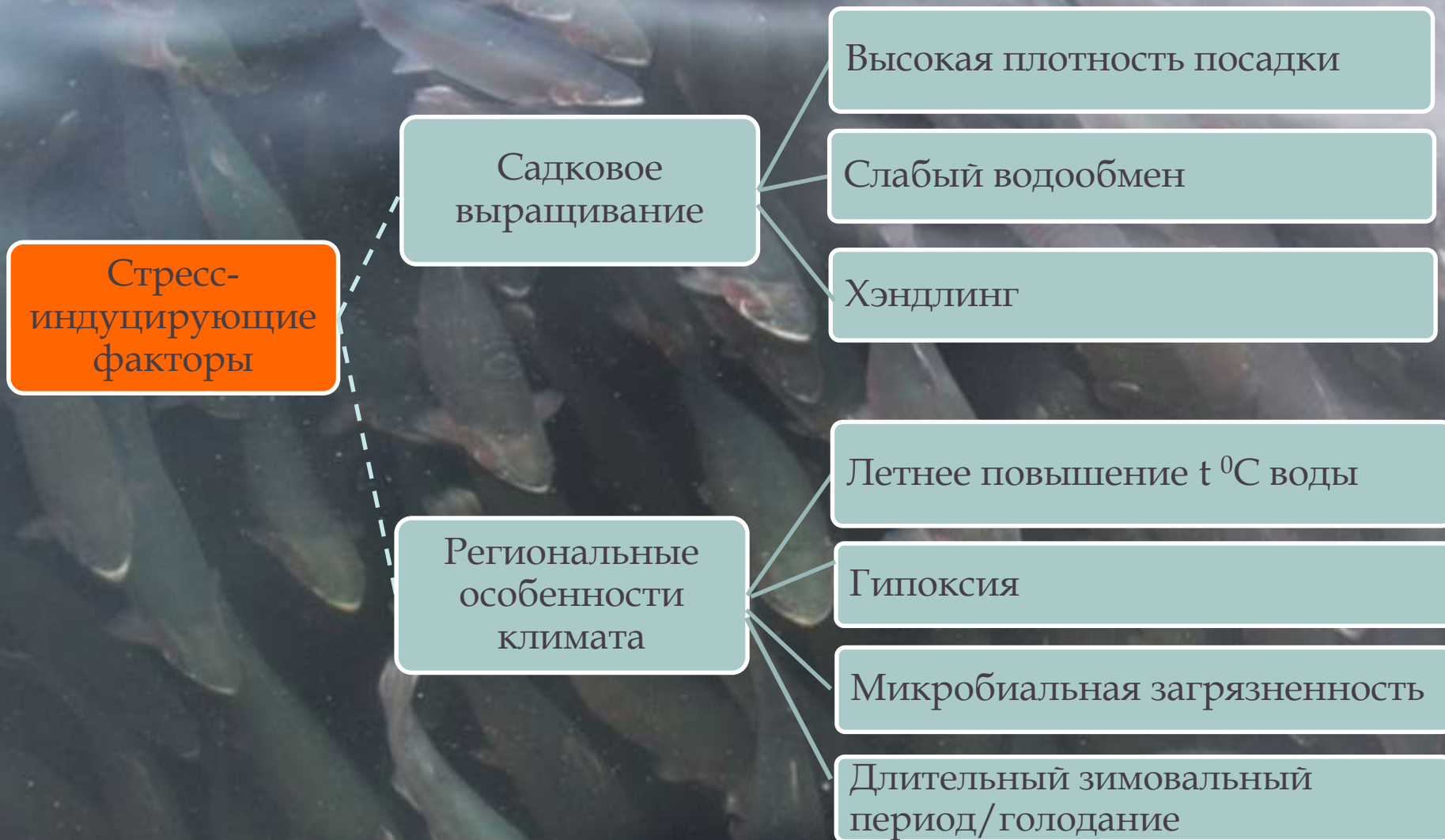


Баланс синтеза и деградации белка определяет интенсивность аккумуляции белков и скорость роста

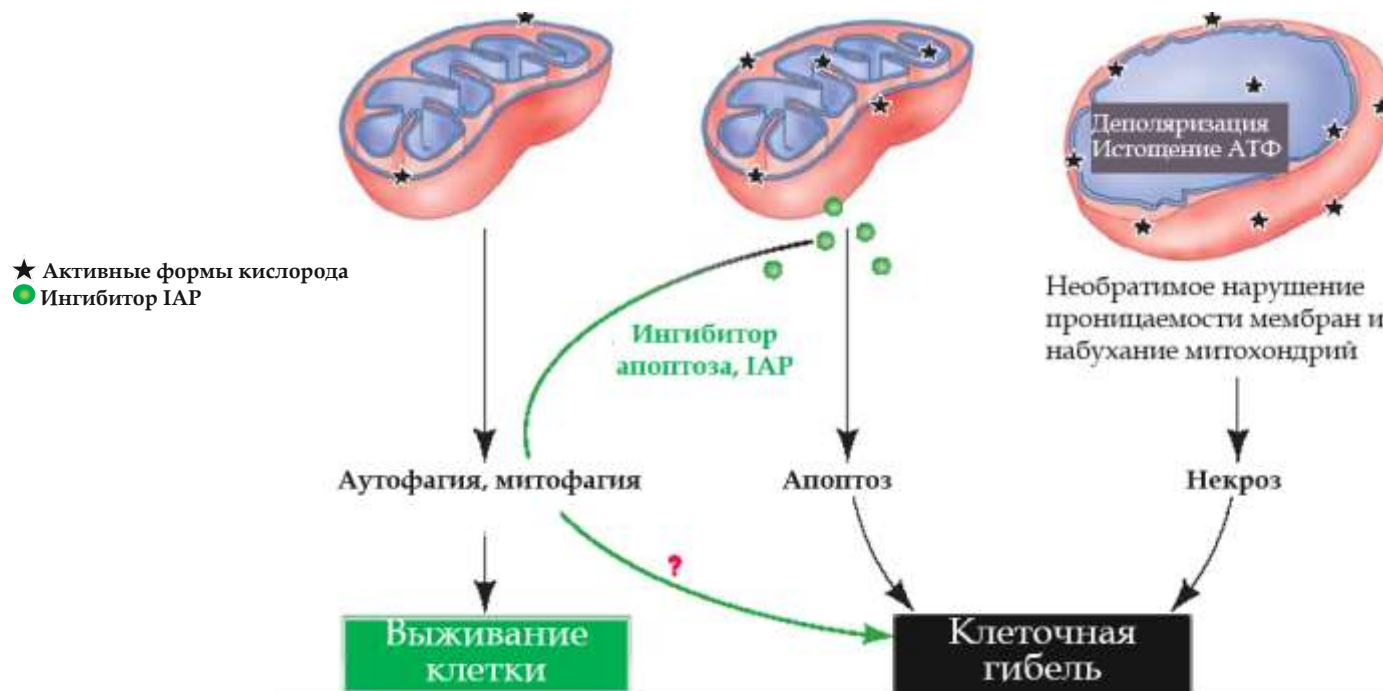
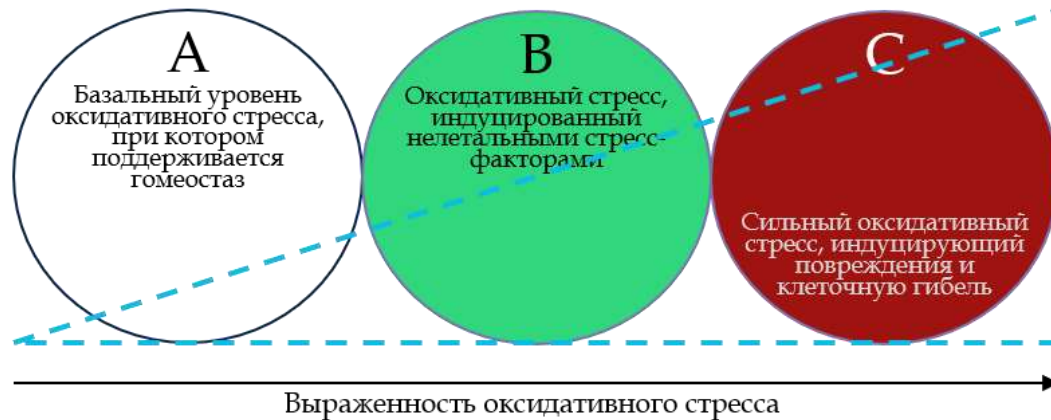
Активность протеиназ – потенциальный биомаркер скорости роста рыб

Учитывая доминирующую роль кальпаинов в тотальной белковой деградации, они представляются потенциальной мишенью для управления ростовыми процессами у рыб

Стресс-индуцирующие факторы



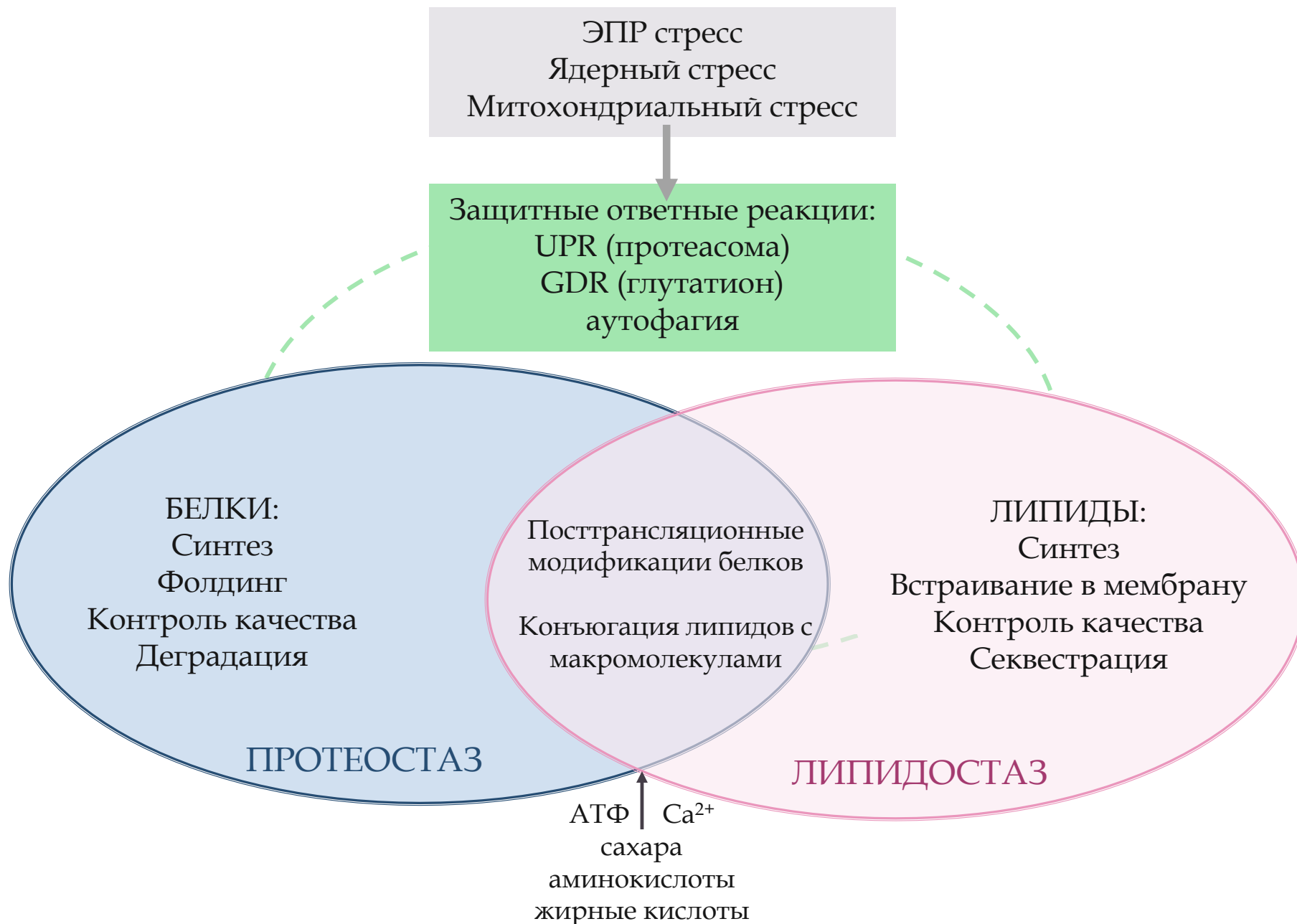
Окислительный стресс



Окислению подвержены все классы макромолекул клетки



Клеточный стресс

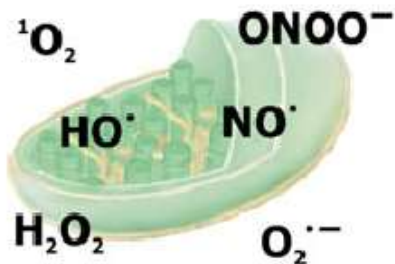


Прооксиданты vs Антиоксидантная система

Избыток
активных форм кислорода и азота



ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС



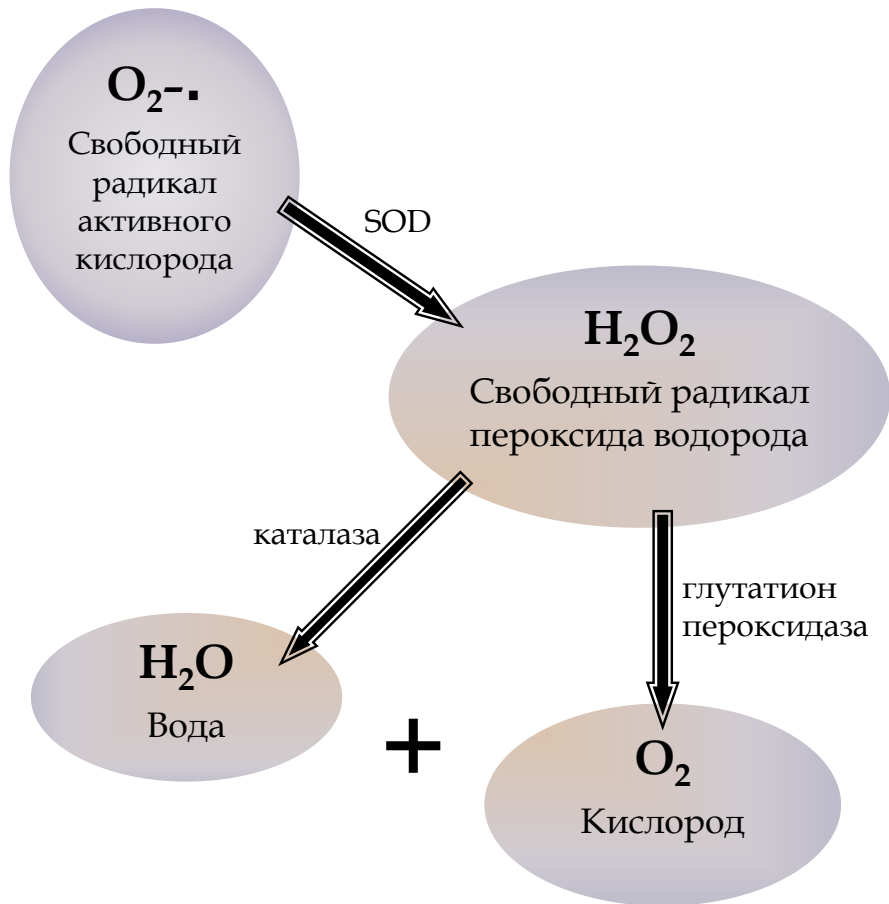
Контролируемая продукция
активных форм кислорода и азота



ГАШЕНИЕ
СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ
ПРОЦЕССОВ



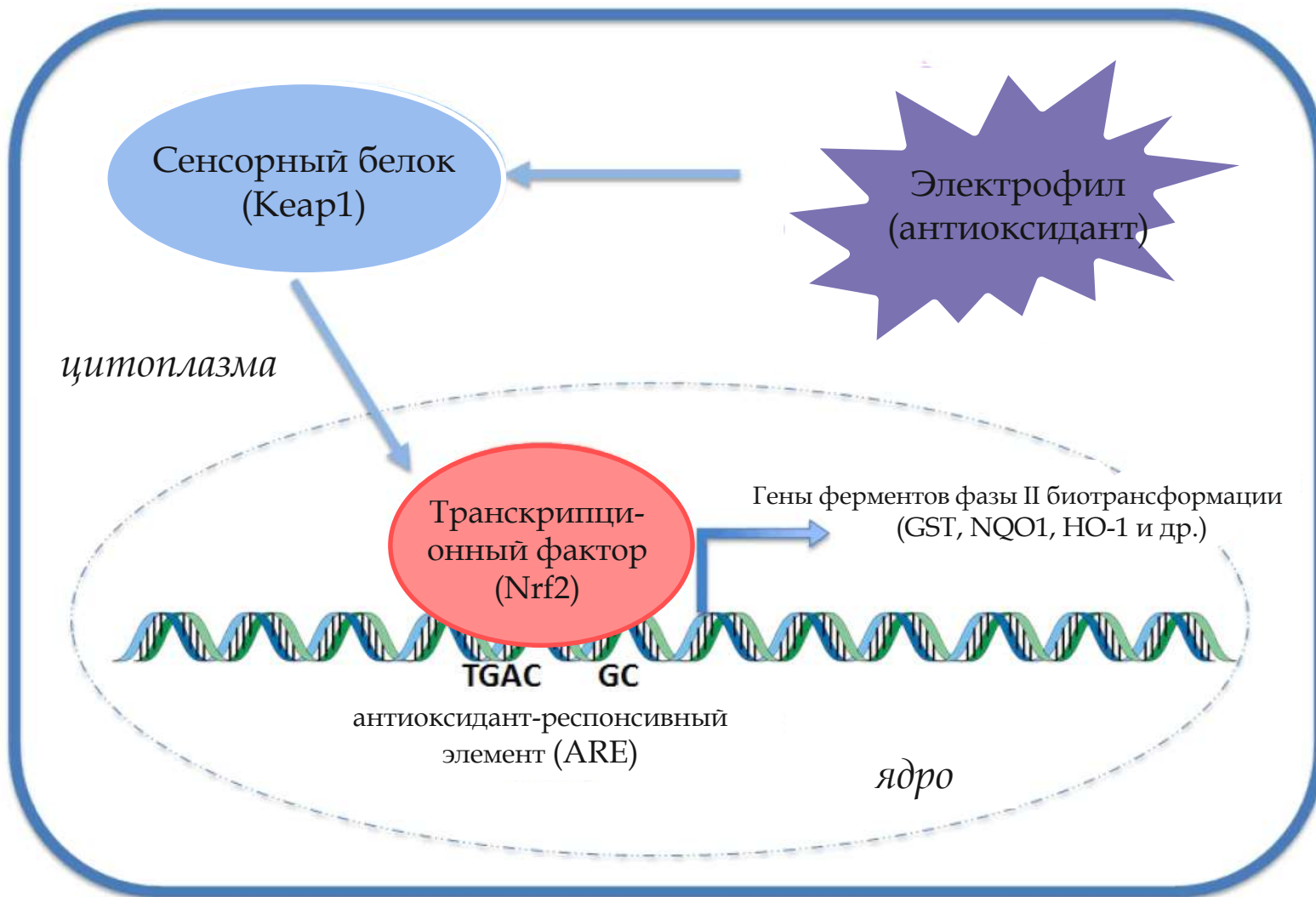
Ферментативное звено



Молекулярное звено

- токоферолы (витамин E)
- каротиноиды
- ретинол (витамин A)
- восстановленный глутатион (GSH)
- билирубин

Антиоксиданты влияют на экспрессию генов



Синтетические

- этоксиквин (ethoxyquin)
- бутилированный гидрокситолуол (ВНТ)
- бутилированный гидроксианизол (ВНА)

Недостатки:

- токсичность
- загрязнение среды
- не имеют естественных путей метаболизма (ВНТ, ВНА – синтетические аналоги vit E)

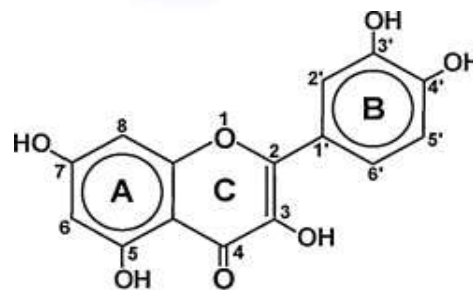
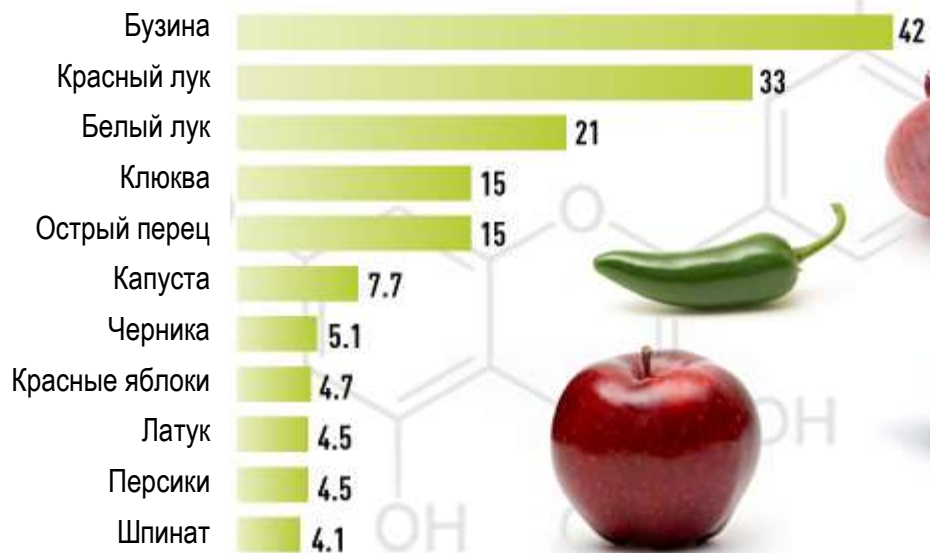
Природные

- токоферолы (vit E)
- аскорбиновая кислота (vit C)
- лимонная кислота
- экстракт розмарина

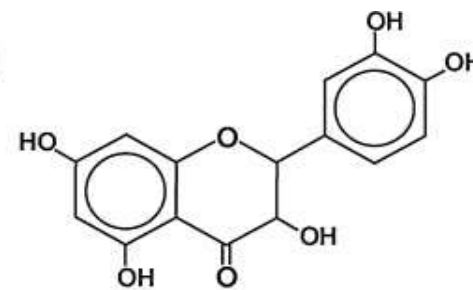
быстро разлагаются (5-6 мес),
особенно при действии
повышенных температур

Дигидрокверцетин

Содержание
кверцетина, мг/100 г



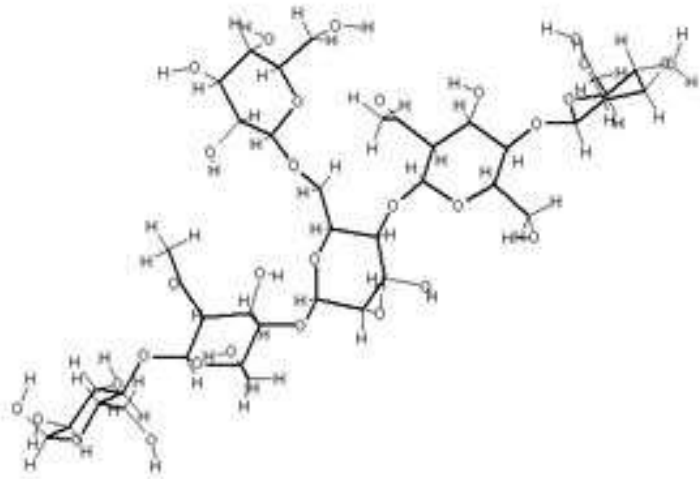
кверцетин



дигидрокверцетин

Биофлавоноиды – полифенолы растительного происхождения, группа флавонолов включает также рутин, ресвератрол

Арабиногалактан



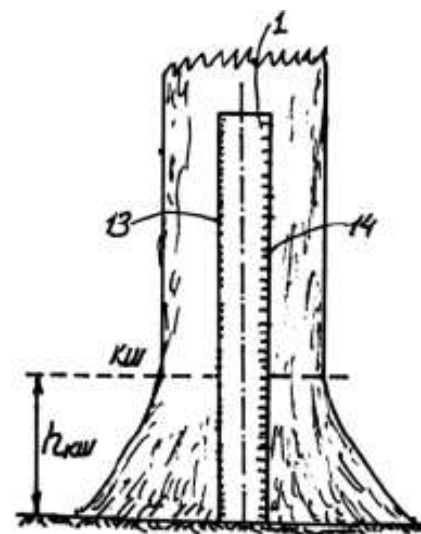
Полисахарид (галактоза+арабиноза), Mr 13-20 кДа

- пребиотик
- иммуностимулятор
 - активация хемотаксиса, адгезии,
 - поглотительной и бактерицидной способности макрофагов

Дигидрокверцетин



Источник выделения –
комлевая часть
лиственничных, т.е. отходы
лесозаготовки
Способ – водная экстракция



Садковый эксперимент с радужной форелью



2 садка по 15 000 особей *O. mykiss* (1+)

Стандартный коммерческий корм BioMar (Denmark)

Контроль – без добавок, опыт – 50 мг ДКГ + 25 мг арабиногалактана/кг корма

Длительность наблюдений – июнь-сентябрь 2017

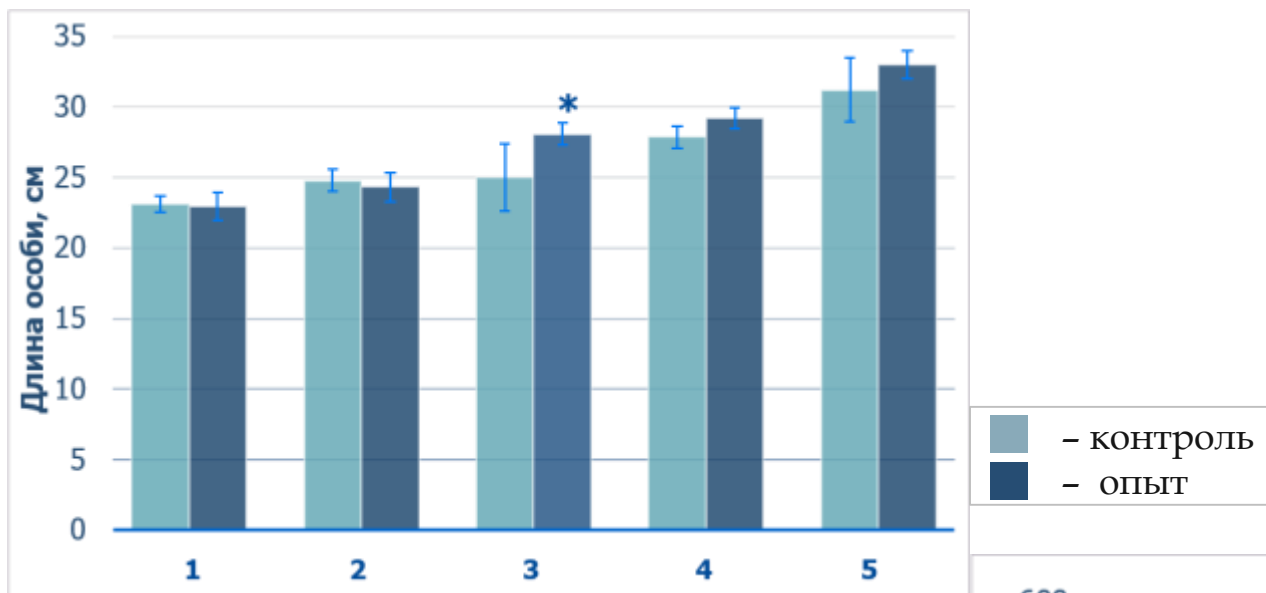
Динамика внешних факторов



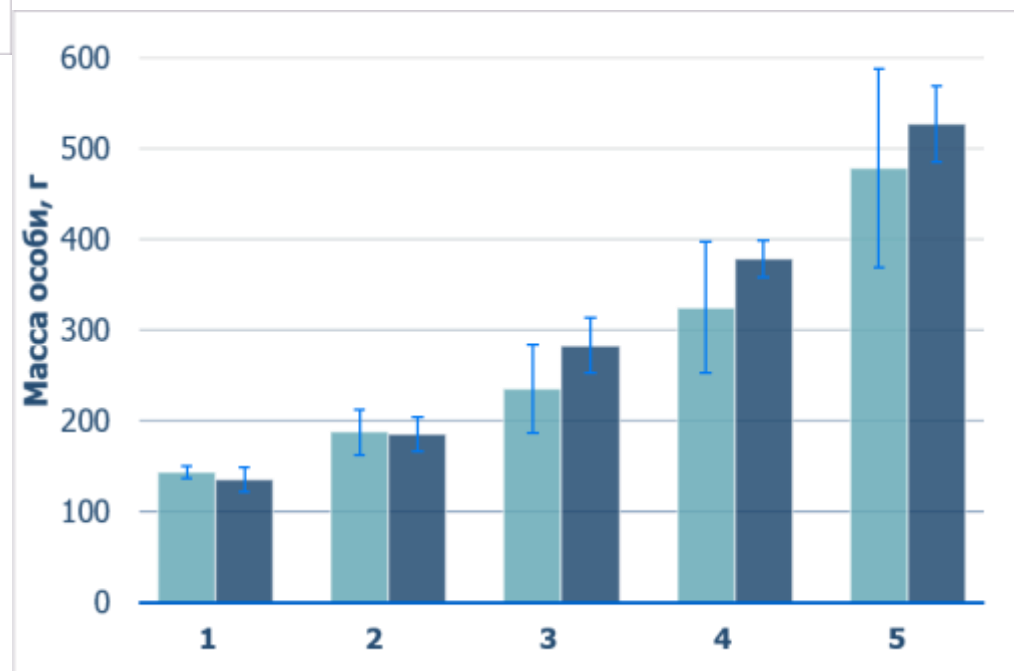
Год наблюдений – 2017

- аномально низкие летние температуры
- в пределах температурного оптимума *O. mykiss* – 16-17 °C
- пессимум от 20 °C, летальность – при 25 °C

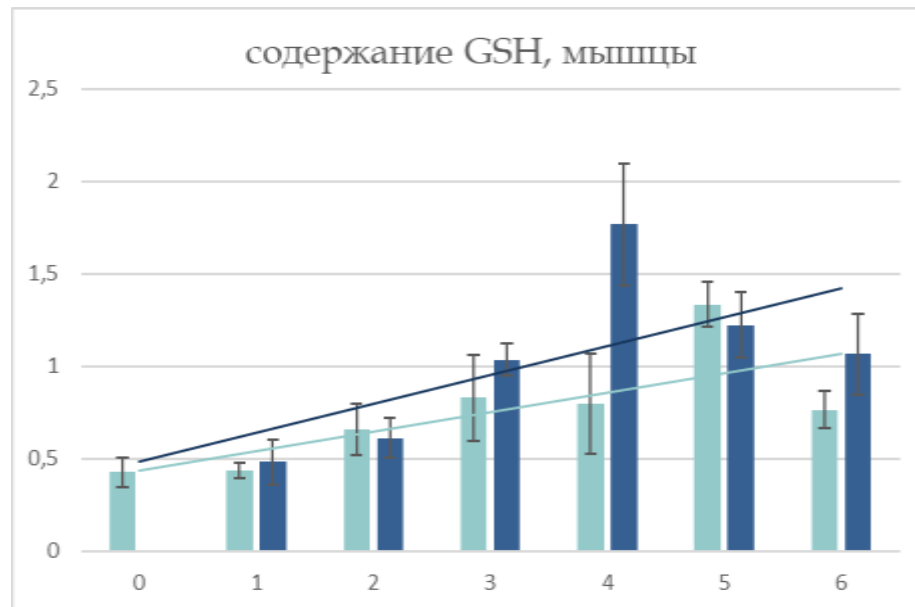
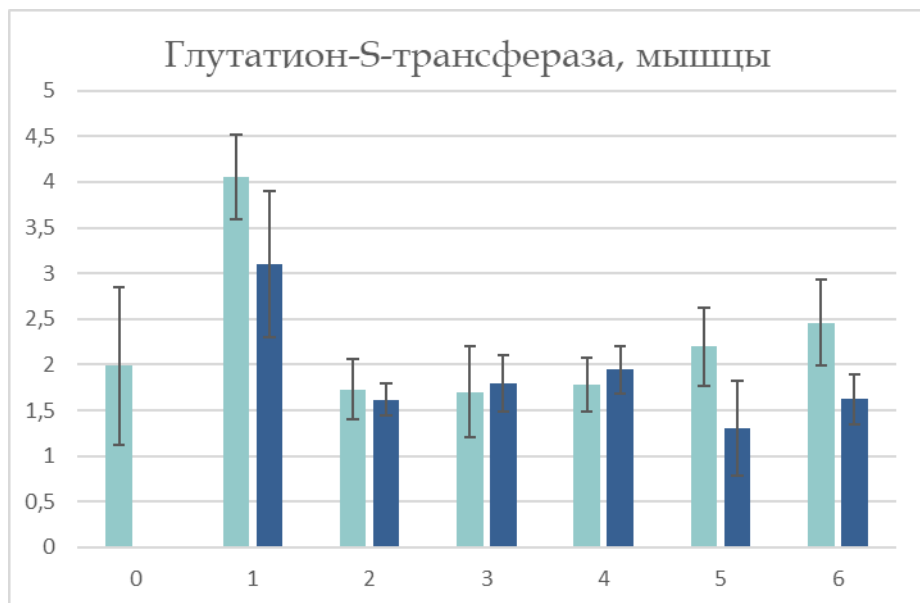
Размерно-массовые показатели форели



Отход
4,0 % - контроль (без ДГК)
*1,7 % - опыт (с ДГК)



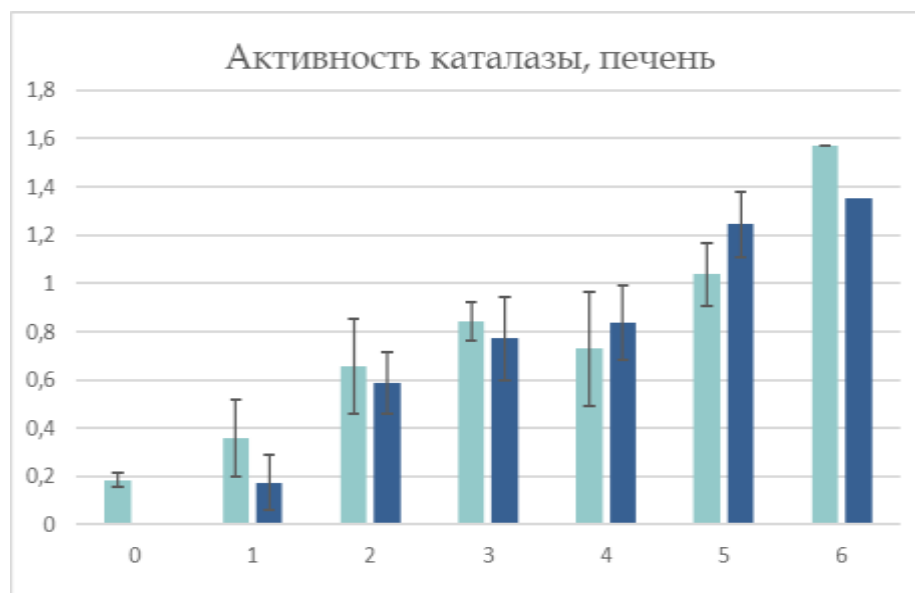
Состояние антиоксидантной системы



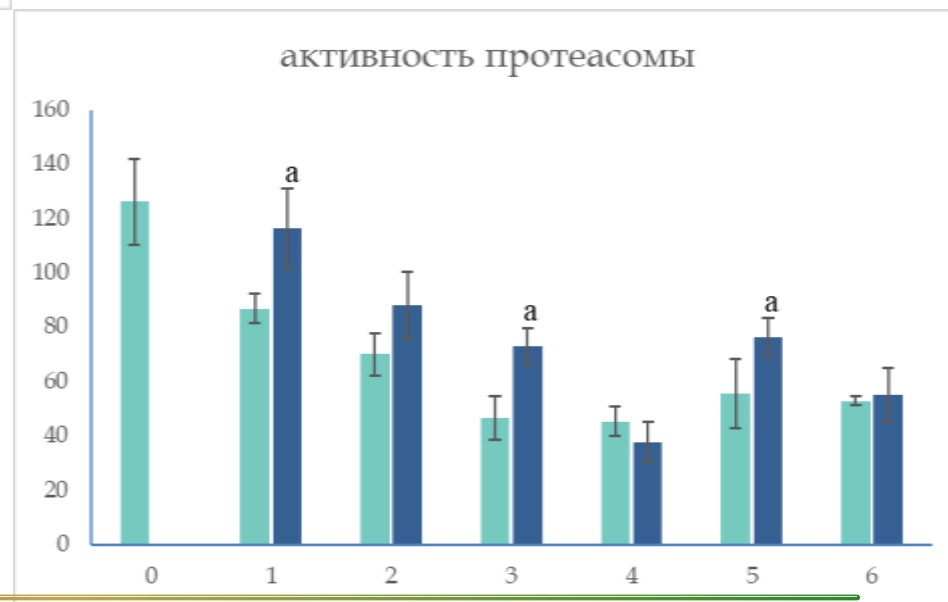
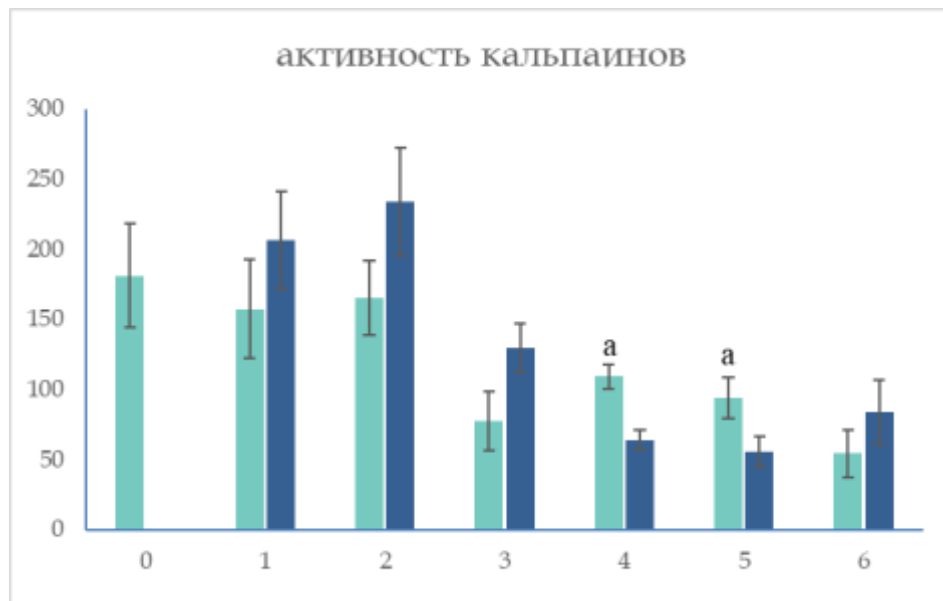
1-6 – время отбора проб – с 30 июня по 30 сентября
(периодичность 2 недели)

3 – вспышка бактериальной инфекции
+6 сут энрофлоксацин

4 – температурный максимум



Протеолитическая активность в мышцах



Пищевые добавки с антиоксидантной активностью снижают степень окисления макромолекул (белков, липидов, нуклеиновых кислот), нагрузку на систему контроля качества белков и энергетические затраты на гидролиз и последующий ресинтез белков и органелл

Пищевые добавки с иммуномодулирующей активностью (арабиногалактан) – повышают устойчивость рыб к бактериальным инвазиям

Лимитирование стресс-индуцирующих факторов за счет введения пищевых добавок способствует усилению белкового синтеза – потенциальный способ ускорения роста и аккумуляции белка у искусственно выращиваемых рыб



Институт биологии
Карельского научного центра РАН,
Петрозаводск

Исследования поддержаны
Российским научным фондом,
проект № 17-74-20098
*«Оценка эффективности использования
дигидрокверцетина для увеличения
производительности форелевых хозяйств в
условиях Северо-западного региона России»*



чл.-корр. РАН, д.б.н.
Нина Николаевна Немова



руководитель проекта
к.б.н. Надежда Канцерова



к.б.н. Ирина
Суховская



к.б.н. Мария
Чурова



Спасибо за внимание!