

**ШУЛЬГИНА**

Наталья Сергеевна

**АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА И  
УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ МЫШЕЧНЫЙ  
РОСТ, У МОЛОДИ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ (*SALMO SALAR* L.) В  
УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОГО ВОСПРОИЗВОДСТВА ПРИ ВЛИЯНИИ  
РАЗНЫХ РЕЖИМОВ ОСВЕЩЕНИЯ**

1.5.4. - Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Петрозаводск – 2023

Работа выполнена в Институте биологии – обособленном подразделении Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (ИБ КарНЦ РАН), г. Петрозаводск

**Научный руководитель: Немова Нина Николаевна**

доктор биологических наук, профессор, академик Российской академии наук, руководитель научного направления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (КарНЦ РАН)

**Официальные оппоненты:**

Андреева Алла Михайловна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией экологической биохимии водных организмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

Карамушко Лариса Ивановна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории ихтиологии и физиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Мурманского морского биологического института РАН

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Защита состоится 19 декабря 2023 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.152.02 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН) по адресу: 19422, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИЭФБ, с авторефератом – на сайте ВАК РФ, с диссертацией и авторефератом – на сайте ИЭФБ РАН: <https://www.iephb.ru/>

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, д.б.н.



Р.Г. Парнова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Известно, что адаптации организма включают целый комплекс механизмов, среди которых особую роль играют биохимические механизмы, лежащие в основе развития компенсаторных реакций клетки (Шмидт-Ниельсен, 1982; Озернюк, 1992). Адаптации молоди рыб к условиям среды связаны с изменением в скоростях и направлениях важнейших метаболических процессов и обусловлены как особенностями раннего развития, так и принадлежностью рыб к эктотермным организмам, определяющей их полную зависимость от среды обитания (Хочачка, Сомеро, 1988). Одним из связующих звеньев клеточного метаболизма является энергетический метаболизм, который оказывает влияние на все процессы жизнедеятельности организмов, в том числе рыб, особенно в период их раннего онтогенеза, когда формируются предпосылки для реализации дальнейшей жизненной стратегии. Об энергетическом статусе рыб на различных этапах жизненного цикла можно судить по значению активности важнейших ферментов путей аэробного и анаэробного синтеза АТФ. В частности, такие показатели уровня энергетического обмена, как активность ферментов гликолиза, дыхательной цепи митохондрий в мышцах рыб, используются для оценки темпов роста и развития, а также состояния рыб в исследованиях по изучению влияния изменений условий окружающей среды на рост рыб (Davies, Moyes, 2007; Savoie et al., 2008; Koedijk et al., 2010). Известно, что белые мышцы составляют значительную часть тела рыб, и, таким образом, отражают темпы их роста и во многом определяют характер метаболизма и связанные с ним адаптивные возможности всего организма (Houlihan et al., 1993). При этом рост мышц у молоди рыб зависит от таких факторов, как генотип, обеспеченность пищей, температура окружающей среды, фотопериод, доступность кислорода, а также гидрологические характеристики среды обитания (Veggetti et al., 1990; Johnston, 2006). Мышечный рост у рыб в период эмбриогенеза и после выклева личинки из оболочки контролируется экспрессией генов определенных транскрипционных факторов семейства bHLH - миогенных регуляторных факторов (МРФ) - MyoD, Myf5, MyoG и MRF4 (Watabe, 2001). Характер экспрессии генов МРФ изменяется в том числе и под воздействием факторов окружающей среды (Johansen, Overturf, 2006; Macqueen et al., 2007; Nagasawa et al., 2012). Исследование особенностей экспрессии генов МРФ, наряду с экспрессией гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*), продуктом которого является миозин - основной функциональный компонент мышечных волокон, а также экспрессии гена негативного регуляторного фактора - миостатина (*MSTN*), позволит объяснить некоторые механизмы регуляции мышечного роста у молоди лосося при изменении условий окружающей среды (Hevrøy et al., 2006; Dhillon et al., 2008).

Свет и, в частности, фотопериод (отношение количества световых часов к часам темноты за 24 часа) является одним из важнейших абиотических факторов, который влияет на некоторые показатели продуктивности рыб в культуре, инициируя ряд изменений в их питании, росте и репродуктивной функции (Boeuf, Le Bail, 1999; Jobling, 2010; Brown et al., 2014). Ранее было показано, что, когда рыбы некоторых видов, относящихся к семействам Лососевые (*Salmonidae*), Карповые (*Cyprinidae*), Тресковые (*Gadidae*) и Цихловые (*Cichlidae*), подвергаются воздействию удлиненных световых дней (то есть круглосуточному или длительному освещению), происходит усиление их роста (Taylor et al., 2005; Imsland et al., 2007; Власов и др., 2013; Lundova et al., 2019a). Следует отметить, что в некоторых странах искусственное удлинение продолжительности светового дня широко используется в качестве метода увеличения

скорости роста рыб в условиях аквакультуры (Taylor et al., 2009; Noori et al., 2015; Лиман и др., 2017). Удлиненные фотопериоды могут оказывать положительное воздействие на пищевое поведение и рост рыб посредством стимуляции гипоталамо-гипофизарной оси в их мозге, что приводит к увеличению выработки и секреции гормона роста и инсулиноподобных факторов роста (McCormick et al., 2007; Nordgarden et al., 2003). Изменение концентрации гормонов и факторов роста влияет на обмен веществ, поведение миогенных клеток-предшественников, ответственных за формирование и рост мышечных волокон, что способствует стимуляции мышечного роста у рыб (Johnston et al., 2003a). Для понимания механизмов биохимического ответа на увеличение длины светового дня, атлантический лосось *Salmo salar* L. представляет особый интерес, поскольку его жизненный цикл включает периоды раннего развития, связанные с переходом из пресной среды обитания в морскую, что требует трансформации молоди из выклюнувшейся личинки к сеголетку и далее через стадию пестрятки к смолту, в ходе которой этот вид проявляет высокую чувствительность к изменениям фотопериода (Казаков, 1998). Основная часть исследований, рассматривающих влияние света на рост и развитие атлантического лосося, относится к изучению его пищевой и двигательной активности, смолтификации, ритмов размножения и гаметогенеза в условиях различных режимов фотопериода (Imsland et al., 2014; Good et al., 2016; Hansen et al., 2017; Strand et al., 2018). В меньшей степени представлены биохимические исследования влияния периодичности светового фактора на энергетические характеристики, регуляцию мышечного роста и состояние лососевых рыб. Использование биохимического подхода к изучению эффектов влияния фотопериода на рост и развитие атлантического лосося позволит расширить понимание механизмов, лежащих в основе регуляции мышечного роста рыб и, как следствие, их темпов роста, на раннем этапе развития при адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. В связи с вышеизложенным актуальность работы обусловлена, прежде всего, необходимостью получения новых знаний в области понимания механизмов роста и развития рыб в раннем онтогенезе, которые могут быть использованы и в прикладном аспекте при искусственном разведении атлантического лосося в условиях аквакультуры.

**Цель исследования** - оценить участие ферментов энергетического метаболизма, некоторых транскрипционных факторов, регулирующих мышечный рост, в биохимических адаптациях сеголеток (0+) и двухлеток (1+) атлантического лосося (*Salmo salar* L.), выращиваемых в условиях искусственного воспроизводства при воздействии разных режимов освещения.

**Задачи исследования:**

1. Сравнить рост сеголеток и двухлеток атлантического лосося, содержащихся в экспериментальных условиях с использованием искусственного освещения разной продолжительности (режимы 16С:8Т и 24С:0Т) и в группах молоди рыб без дополнительного освещения (контроль);
2. Оценить активность ферментов энергетического обмена (цитохром с оксидазы, лактатдегидрогеназы и альдолазы) в белых мышцах у сеголеток и двухлеток атлантического лосося из экспериментальных (с освещением) и контрольных (без дополнительного освещения) групп;
3. Оценить уровень экспрессии генов транскрипционных факторов регуляции миогенеза (*Myf5*, *MyoG*, паралога *MyoD1*: *MyoD1a*, *MyoD1b*, *MyoD1c*), генов паралога миостатина (*MSTN1a* и *MSTN1b*) и гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*) у сеголеток и двухлеток атлантического лосося из экспериментальных и контрольных групп;

4. Оценить динамику изменений исследуемых биохимических показателей у особей атлантического лосося двух возрастов (0+ и 1+) из экспериментальных и контрольных групп на протяжении весенне-осеннего (6 месяцев) и летне-осеннего (3 и 4 месяца) периодов в разные годы исследования.

**Научная новизна.** Впервые получены данные о влиянии периодичности светового фактора на комплекс показателей: рост (прирост массы), уровень экспрессии генов мышечных белков, участвующих в регуляции миогенеза, и показатели энергетического обмена (активность ЦО, ЛДГ и альдолазы) разновозрастной молодежи атлантического лосося *Salmo salar* L. Впервые проведено исследование уровней экспрессии генов, регулирующих мышечный рост (*Myf5*, *MyoG*, паралога *MyoD1*: *MyoD1a*, *MyoD1b*, *MyoD1c* и миостатина: *MSTN1a* и *MSTN1b*) в мышцах молодежи лосося, содержащегося в условиях разных режимов освещения. Впервые получены данные по сезонной динамике изменений уровней экспрессии генов транскрипционных факторов регуляции миогенеза (*Myf5*, *MyoG*, паралога *MyoD1*), гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*) в белых мышцах у сеголеток и двухлеток атлантического лосося из экспериментальных и контрольных групп.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Теоретическое значение работы связано с получением новых знаний о биохимических адаптациях с участием ферментов энергетического метаболизма и некоторых молекулярных механизмов регуляции мышечного роста, а также закономерностях раннего роста и развития у рыб северных широт, обитающих в специфических условиях чередования длинного и короткого светового дня в весенне-летний и осенне-зимний периоды. Научная значимость работы заключается также в том, что полученные впервые экспериментальные данные о биохимической индикации физиологических процессов роста молодежи атлантического лосося, выращиваемой в искусственных условиях, позволяют рассматривать их и при сравнительной оценке особенностей биохимических механизмов адаптации молодежи естественных популяций лососевых рыб в Северо-Западном регионе России. Результаты будут иметь значение для развития различных направлений биологической науки, таких как экологическая биохимия, экологическая физиология, экология, биология развития, ихтиология и гидробиология.

Результаты работы могут быть использованы при подготовке методических рекомендаций по усовершенствованию (путем введения дополнительного освещения) используемой в настоящее время на рыбоводных хозяйствах Республики Карелия стандартной технологии, что ожидаемо может повысить эффективность искусственного выращивания молодежи лосося за счет ускорения процессов роста, готовности к смолтификации и миграции в морскую среду, что будет способствовать восстановлению естественных популяций атлантического лосося в водоемах Республики Карелия и Кольского полуострова.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Введение в технологический процесс выращивания молодежи лосося круглосуточного освещения (24С:0Т) оказывает положительный эффект на прирост массы рыб, что сопровождается изменениями исследуемых биохимических показателей (активности ЦО, ЛДГ и альдолазы, экспрессии генов *MyHC*, *Myf5*, *MyoG*, паралога *MyoD1*);

2. Уровни экспрессии генов транскрипционных факторов регуляции миогенеза (*Myf5*, *MyoG*, паралога *MyoD1*) в белых мышцах разновозрастной молодежи атлантического лосося изменяются под влиянием разных режимов освещения и продолжительности их воздействия;

3. Динамика изменений уровней экспрессии генов транскрипционных факторов регуляции миогенеза (*Myf5*, *MyoG*, паралога *MyoD1*) и гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*) в белых мышцах разновозрастной молодежи лосося носит сезонный характер.

**Методология и методы исследования.** Для решения поставленных задач использованы методы современной биохимии. Активность исследуемых ферментов, а также концентрацию белка в образцах белых мышц особей лосося определяли спектрофотометрически согласно стандартным методикам (Smith, 1955; Колб, Камышников, 1976; Кочетов, 1980; Биссвангер, 2015) на микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия). Уровень экспрессии исследуемых генов в мышцах рыб определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на термоциклере для амплификации нуклеиновых кислот с оптическим модулем CFX96 Touch system (BioRad, США).

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов обеспечена проведением исследований с использованием достаточного количества образцов для биологических и технических повторов, применением комплекса современных биохимических методов, а также общепринятых современных статистических методов обработки данных. Полученные результаты исследования прошли независимое рецензирование при их опубликовании в российских и зарубежных научных изданиях.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертации были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и зарубежных конференциях: II международной научно-практической конференции «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность» (Севастополь, 2022); Юбилейной научной конференции «Николай Константинович Кольцов и биология XXI века» (Москва, 2022); Международной научной конференции, посвященной 150-летию Севастопольской биологической станции – Института биологии южных морей имени А.О. Ковалевского, «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность» (Севастополь, 2021); Второй всероссийской конференции с международным участием «Физиолого-биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов» (Борок, 2020); Пятом всероссийском молодежном научном форуме «Наука будущего - наука молодых» (Москва, 2020); XII съезде Гидробиологического общества при РАН (Петрозаводск, 2019); Международной конференции «Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) and Italian Physiological Society (SIF)» (Италия, Болонья, 2019); III научной школе молодых учёных и специалистов по рыбному хозяйству и экологии, с международным участием, посвященной 140-летию со дня рождения К.М. Дерюгина «Перспективы рыболовства и аквакультуры в современном мире» (Звенигород, 2018); Международном конгрессе «43<sup>rd</sup> FEBS Congress» (Чехия, Прага, 2018); Международном конгрессе «31<sup>st</sup> ESCPB Congress» (Португалия, Порту, 2018); Международной конференции «Annual meeting SEB» (Италия, Флоренция, 2018).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов научных исследований, и 13 тезисов и материалов докладов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение результатов), а также заключения, выводов, списка литературы и списка сокращений. Работа изложена на 172 страницах, документирована 19 рисунками, 25 таблицами. Список литературы содержит 346 источников, из них 47 отечественных.

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю признательность и благодарность научному руководителю – д.б.н., проф., академику РАН Н. Н. Немовой, научному

консультанту – к.б.н. М. В. Кузнецовой за всестороннюю помощь, поддержку, ценные советы и рекомендации на всех этапах реализации работы, а также другим сотрудникам лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН - к.б.н. М. Ю. Крупновой - за помощь в осуществлении лабораторного анализа, к.б.н. А. Е. Курицыну - за ценные консультации при разработке экспериментов, к.б.н. Н. Л. Рендакову и аспиранту В. П. Воронину за помощь в сборе биологического материала. Особая благодарность руководству и коллективу Выгского рыбоводного завода за сотрудничество.

Исследование проводилось при финансовой поддержке РФФИ по проектам: «Лососевые рыбы Северо-Запада России: эколого-биохимические механизмы раннего развития» (№ 14-24-00102-П) и «Влияние физических факторов на эффективность искусственного (заводского) воспроизводства молоди атлантического лосося *Salmo salar*: физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика» (№ 19-14-00081).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В обзоре литературы представлены сведения о влиянии разных режимов фотопериода на показатели роста и развития лососевых рыб северных широт. Изложены современные представления об особенностях формирования и развития скелетных мышц у рыб на разных стадиях развития (в эмбриональный и постэмбриональный периоды), а также роли транскрипционных факторов (MyoD, Myf5, MyoG), миостатина и миозина в регуляции миогенеза. Рассмотрена роль аэробного и анаэробного энергетического обмена и некоторых путей углеводного обмена в процессах роста и развития рыб, а также дана краткая характеристика ферментов, исследование активности которых используется для оценки интенсивности и направления путей энергетического и углеводного обмена.

### **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **2.1 Материал исследования**

Объектами исследования были особи атлантического лосося двух возрастных групп – сеголетки (0+) и двухлетки (1+).

Для решения поставленных задач был проведен ряд экспериментов, в которых разновозрастную молодь атлантического лосося содержали при разных режимах освещения в условиях искусственного воспроизводства на Выгском рыбоводном заводе (пос. Сосновец, Беломорский район, Республика Карелия, Россия). Для каждой экспериментальной группы было отведено по два бассейна. Рыб выращивали в условиях проточного водоснабжения при естественных колебаниях температуры окружающей среды, характерных для весенне-летнего и осенне-зимнего периодов в умеренных широтах северных регионов.

В первый год исследовали влияние двух световых режимов - переменного фотопериода - 16С:8Т, и круглосуточного освещения - 24С:0Т, на рост и состояние сеголеток (0+) и двухлеток (1+) атлантического лосося. Сеголеток в этих условиях содержали в период с начала августа по 26 октября (3 месяца), а двухлеток - с начала июля по 26 октября (4 месяца). Схема эксперимента для каждой возрастной группы рыб была одинаковой: одна группа (1) была контрольной, где рыбы содержались в стандартных условиях освещения рыбоводного завода без дополнительных источников искусственного света; в группе 2 соблюдался режим освещения 16С:8Т (16 часов/сутки бассейны были освещены, 8 часов/сутки рыбы находились без освещения); в группе 3

освещение было круглосуточным (24С:0Т).

Во второй год исследовали влияние круглосуточного освещения на рост и состояние двухлеток лосося на протяжении разного периода времени (5 и 14 месяцев). Двухлетки лосося, которые в первом эксперименте, будучи сеголетками, на протяжении трех месяцев (с августа и до конца октября) содержались в условиях рыбоводного завода без дополнительного освещения (в контрольной группе), были разделены на две группы - контрольную (без дополнительного освещения, группа 1) и экспериментальную (с круглосуточным освещением - 24 часа/сутки, группа 2), в которых находились в период с начала мая и до середины октября. Для двухлеток лосося, ранее содержавшихся при круглосуточном освещении, условия освещения оставались прежними на протяжении 14-ти месяцев - с августа (эксперимент 1) и до середины октября следующего года (эксперимент 2), они составили группу 3 (с круглосуточным освещением - 24 часа/сутки).

Бассейны с освещением (группы 2 и 3) в обоих экспериментах были оборудованы двумя светодиодными светильниками и накрыты чёрной, не пропускающей свет, плёнкой (интенсивность освещения на поверхности воды составляла 400-760 люкс в разных частях бассейнов). Контрольные бассейны не накрывали, и некоторое количество естественного освещения поступало в них из окон цеха в весенне-летний период (его интенсивность у поверхности воды составляла 12 люкс днем и 2 люкс ночью), а со второй половины августа в помещении, где располагались бассейны, для проведения работ с 5-ти часов вечера до 8-ми часов утра использовалось верхнее освещение (его интенсивность в бассейнах составляла 8 люкс), которое с 10 сентября было включено круглосуточно.

Для расчета прироста массы сеголеток и двухлеток лосося за экспериментальный период проводили пятикратные взвешивания по 70-100 особей вместе от 3-х до 5-ти раз в месяц. Дополнительно раз в месяц в день отбора проб проводили замеры 30-ти сеголеток и 22-56-ти чипированных двухлеток из каждой исследуемой группы. Образцы эпаксиальных (белых) мышц для биохимического анализа (по 12 шт. на группу) отбирали у рыб после измерения их массы и длины тела в начале исследования и затем раз в месяц на протяжении каждого экспериментального периода.

## 2.2 Методы исследования

Определение активности исследуемых ферментов. Активность ферментов, а также концентрацию белка определяли в образцах белых мышц особей лосося. Для получения экстракта ферментов ткань гомогенизировали с помощью TissueLyser в 0,05 М трис-НСl буферном растворе (рН 7,5). Полученный гомогенат центрифугировали. Супернатант, содержащий экстрагированные ферменты, использовали для дальнейшего спектрофотометрического анализа. Общую активность фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) определяли по методу Г. А. Кочетова (1980). Общую активность альдолазы (КФ 4.1.2.13) определяли по методике Век в модификации Ананьева и Обуховой (Колб, Камышников, 1976). Определение активности цитохром с оксидазы (ЦО, КФ 1.9.3.1) проводили по методу Смита (Smith, 1955). Активность указанных ферментов выражали в мкмоль субстрата/мин/мг белка. Концентрацию белка определяли методом прямой спектрофотометрии в диапазоне длин волн 200-230 нм (Биссвангер, 2015). Для построения калибровочной кривой использовали раствор бычьего сывороточного альбумина.

Определение уровня экспрессии исследуемых генов. Тотальную РНК выделяли из образцов белых скелетных мышц рыб с использованием реагента «Extract RNA»



(Евроген, Россия), в соответствии с протоколом производителя. Полученные образцы РНК обрабатывали ДНКазой (Евроген, Россия). Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали из препарата тотальной РНК с использованием набора реактивов «MMLV RT kit» в соответствии с протоколом производителя (Евроген, Россия). Качество и количество РНК и кДНК определяли на спектрофотометре NanoPhotometer C40-Touch (Implen, Германия) (Маниатис и др., 1984). Амплификацию проводили на термоциклере с оптическим модулем CFX96 Touch system (BioRad, США) с использованием набора «5x реакционная смесь qPCRmix-HS SYBR для ПЦР-РВ с интеркалирующим красителем SYBR Green I» (Евроген, Россия). Праймеры к нуклеотидным последовательностям кДНК, вычисленным по мРНК, исследуемых (*MyHC*, *Myf5*, *MyoG*, *MyoD1a*, *MyoD1b*, *MyoD1c*, *MSTN1a* и *MSTN1b*) и референсного (*Ef1a*) генов конструировали с помощью инструмента Nucleotide BLAST, представленного на сайте Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI). Кривые плавления для всех реакций имели один пик, соответствующий температуре плавления специфичного ампликона. Об эффективности амплификации судили по наклону стандартной кривой, который находился в диапазоне от -3,4 до -3,32. Стандартные кривые референсного и целевых генов показали значения коэффициента корреляции  $R^2$  не менее 0,986, что позволило использовать метод порогового цикла ( $C_t$ ) для определения относительного уровня экспрессии исследуемых генов (Schmittgen, Livak, 2008). Уровень экспрессии генов мышечных белков нормализовали по уровню экспрессии референсного гена фактора элонгации трансляции (*Ef1a*). Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали по формуле:  $2^{-\Delta C_t}$ . Данные выражали в условных единицах экспрессии (УЕ).

Статистическая обработка данных. Статистический анализ проводили с использованием компьютерных программ StatGraphics 2.5 и Past для Windows. Все выборки были проверены на нормальное распределение (критерий Shapiro-Wilks) и равенство дисперсий (критерий Kruskal-Wallis). Достоверность различий между показателями оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA) с последующим использованием непараметрического рангового критерия Уилкоксона-Манна-Уитни (Wilcoxon-Mann-Whitney). Взаимосвязь исследуемых показателей с массой рыб и между собой оценивали с помощью линейной регрессии и корреляционного анализа по Пирсону и Спирмену. Степень влияния факторов - освещение разной продолжительности, а также сезонность (в частности, температура воды), оценивали с помощью многофакторного дисперсионного анализа (MANOVA). Различия между значениями отдельных показателей в сравниваемых вариантах считали достоверными при  $p < 0,05$  (Коросов, Горбач, 2007). Данные выражались в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm SE$ ).

Исследования выполнены на базе лаборатории экологической биохимии с использованием оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

## ГЛАВА 3, 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Оценка влияния разных режимов освещения на рост разновозрастной молоди лосося (0+ и 1+)

Результаты проведенного исследования показали, что уже спустя месяц после включения дополнительного освещения и вплоть до конца эксперимента у сеголеток (0+) атлантического лосося наблюдались достоверные различия по массе рыб между контрольной группой и группой, содержащейся при круглосуточном освещении, в

пользу последней (рисунок 1А). Кроме того, с середины сентября и до конца эксперимента рыбы возраста 0+ в группе с круглосуточным освещением были больше по массе, чем особи в группе с режимом освещения 16С:8Т. Более высокие темпы роста рыб из группы с круглосуточным освещением могут быть связаны с рядом факторов: увеличением светлого периода времени, когда рыбы активно питаются; нейроэндокринными изменениями, стимулирующими аппетит и пищевое поведение рыб; а также нейроэндокринными изменениями, влияющими на метаболизм таким образом, что энергетические ресурсы направляются преимущественно на прирост массы тела (Handeland et al., 2003; Wootton, 2011).

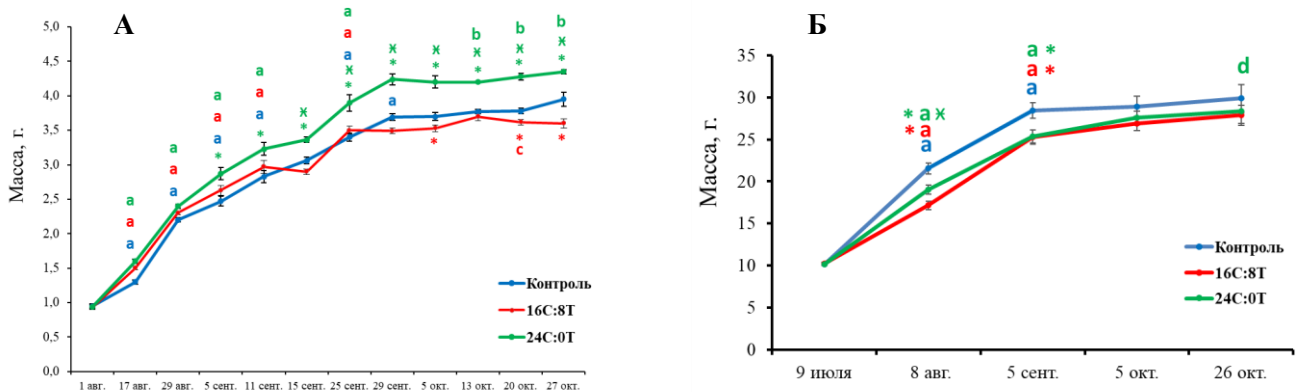


Рисунок 1. Масса сеголеток (А) и двухлеток (Б) лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения (группа 1 – контроль; группа 2 - 16С:8Т, группа 3 - 24С:0Т). Различия достоверны ( $p < 0,05$ ): \* – по сравнению с группой 1, Ж – по сравнению с группой 2, а – по сравнению с данными, полученными в предыдущий месяц, b - по сравнению с данными, полученными 25 сентября, с - по сравнению с данными, полученными 29 сентября; d – по сравнению с данными, полученными 5 сентября

В работе показано, что в отличие от сеголеток, двухлетки (1+) лосося из группы с круглосуточным освещением, а также с режимом 16С:8Т, на протяжении первых двух месяцев после включения дополнительного освещения в июле (эксперимент 1) были меньше по массе по сравнению с особями из контрольной группы, содержащейся без дополнительного освещения (рисунок 1Б). Несмотря на снижение прироста массы у двухлеток лосося во всех группах в осенний период, рыбы из групп с дополнительным освещением (24С:0Т и 16С:8Т) продолжали расти и достигли той же массы, что и особи из контрольной группы. Можно предположить, что экспериментальное изменение условий фотопериода вызывает у рыб в начальный период своего воздействия стрессовую реакцию, в результате которой у них происходит снижение аппетита и, как следствие, темпов роста (Nordgarden et al., 2003; Oppedal et al., 2003). Вероятно, двухлеткам лосося, в отличие от сеголеток, требуется период акклиматизации к новым световым условиям, в связи с чем для проявления стимулирующего рост эффекта необходим более продолжительный период воздействия дополнительного освещения. Это указывает на возрастные особенности пластичности роста рыб при их адаптации к новым условиям освещения.

Результаты, полученные для двухлеток лосося во втором эксперименте, показали, что при включении круглосуточного освещения в мае, а не в июле, рыбы на всем протяжении исследования имели больший прирост массы тела по сравнению с контрольной группой без дополнительного освещения (рисунок 2). Вероятно, дополнительное освещение, включенное на два месяца раньше, оказало более благоприятное воздействие на рост рыб, поскольку такое удлинение светового дня

имитировало увеличение количества световых часов, которое наблюдается в весенне-летний период в естественной среде обитания лосося. Двухлетки лосося, которые росли при круглосуточном освещении еще и в зимний период, уже с первого месяца исследования (с мая) и вплоть до конца эксперимента превосходили по массе особей из двух других групп, которые ранее, будучи сеголетками в предыдущий год (в первом эксперименте) росли без дополнительного освещения. Это согласуется с данными, полученными в эксперименте на атлантического лосося (Johnston et al., 2003a), где круглосуточное освещение в зимне-весенний период привело к увеличению средней массы рыб спустя 126 дней воздействия по сравнению с рыбами, содержащимися при естественном режиме освещения.

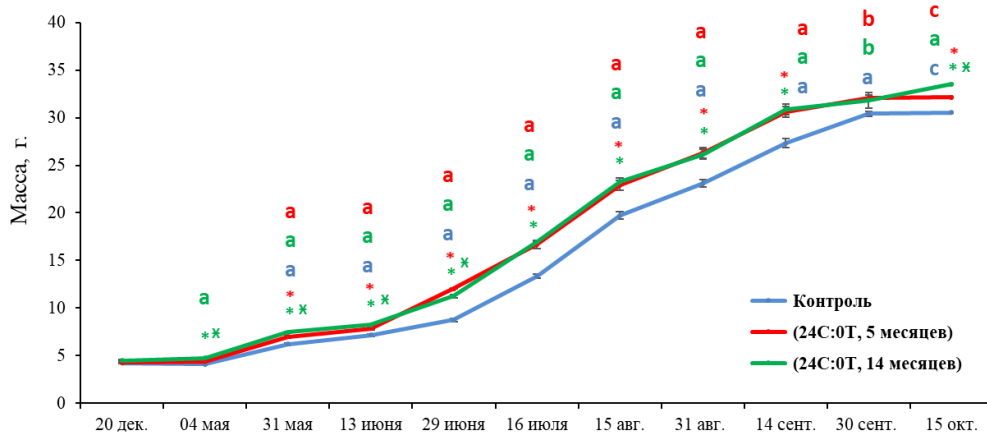


Рисунок 2. Масса двухлеток лосося, содержащихся в группах с круглосуточным освещением на протяжении разного периода времени, и без него (группа 1 - контроль, группа 2 - 24C:0T, май-октябрь (5 месяцев); группа 3 - 24C:0T, август-октябрь (14 месяцев)). Различия достоверны ( $p < 0,05$ ): \* - по сравнению с группой 1, \*\* - по сравнению с группой 2, а - по сравнению с данными, полученными в предыдущий месяц, б - по сравнению с данными, полученными 31 августа, с - по сравнению с данными, полученными 14 сентября

В нашем эксперименте, как сеголетки, так и двухлетки лосося, содержащиеся в условиях режима 16C:8T, имели наименьшую массу в конце эксперимента (рисунок 1А, Б). Возможно, что использование режима фотопериода 16C:8T для усиления роста рыб наиболее эффективно при летних температурах, как это было показано ранее для атлантического лосося и радужной форели (Gaignon, Quemener, 1992; Sonmez et al., 2009). Кроме того, влияние режима 16C:8T на темпы роста может зависеть и от стадии развития рыбы (Alaya et al., 2013).

## 2. Активность ферментов энергетического обмена в белых мышцах особей атлантического лосося, содержащихся при разных режимах освещения

Установлены межгрупповые различия в активности ферментов - ЦО, ЛДГ и альдолазы, в мышцах разновозрастной молоди лосося, содержащейся в разных условиях освещения.

У сеголеток лосося из группы с круглосуточным освещением установлены высокие значения активности ЦО по сравнению с особями из группы с режимом 16C:8T, а также - ЛДГ и альдолазы по сравнению с таковыми у рыб из контрольной группы, в осенний период (рисунок 3). Это свидетельствует о более высоком уровне аэробного и анаэробного обмена в мышцах у рыб, содержащихся при круглосуточном освещении, что может быть связано с обеспечением энергией не только основного обмена и двигательной активности особей, но и интенсивно идущих процессов биосинтеза в их

мышцах, что требует большого количества АТФ (Houlihan et al., 1993; Gauthier et al., 2008; Savoie et al., 2008). Высокий уровень энергетического обмена может быть связан с повышением пищевой активности рыб, а также увеличением эффективности преобразования поступающих питательных веществ при воздействии продолжительного освещения (Boeuf, LeBail, 1999; Biswas et al., 2005).

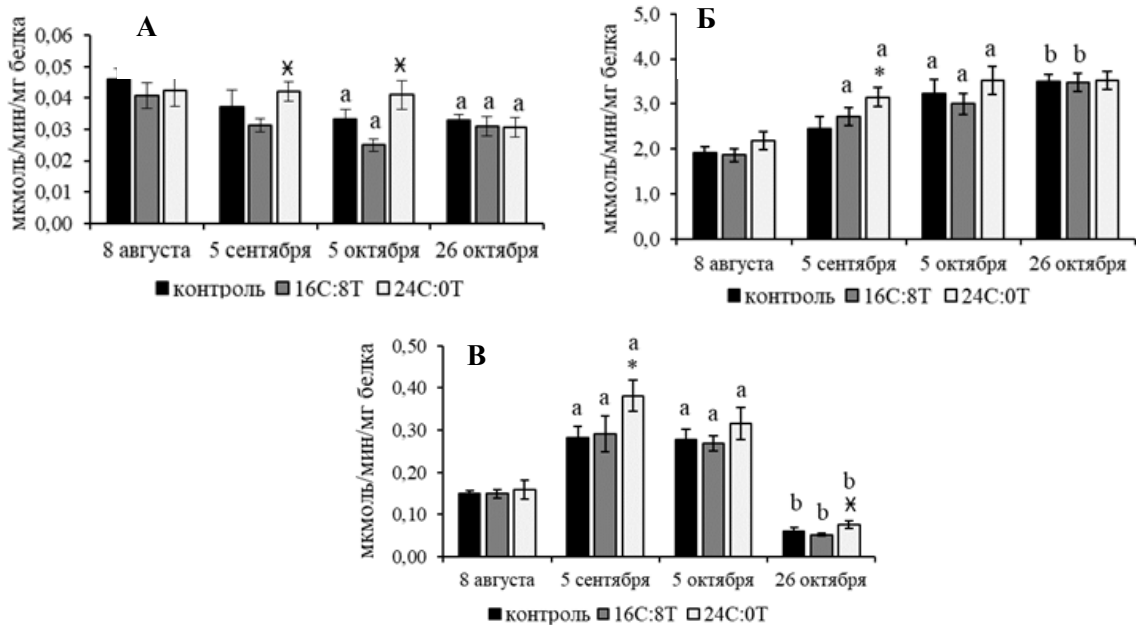


Рисунок 3. Относительная активность ЦО (А), ЛДГ (Б) и альдолазы (В) (мкмоль/мин/мг белка) в белых мышцах сеголеток лосося (0+), содержащихся в группах с разным режимом освещения (группа 1 - контроль, группа 2 - 16С:8Т, группа 3 - 24С:0Т). Различия достоверны ( $p < 0,05$ ): \* - по сравнению с группой 1; \* - по сравнению с группой 2; а - по сравнению с данными, полученными 8 августа; b - по сравнению с данными, полученными 5 сентября

У двухлеток лосося в первом эксперименте через месяц после включения круглосуточного освещения выявлены более высокие значения активности ЦО по сравнению с таковыми у рыб из двух других групп (контрольной и с режимом освещения 16С:8Т) (рисунок 4А). Учитывая, что в этот период масса рыб достоверно различалась в пользу контрольной, можно предположить, что усиление аэробного обмена в мышцах рыб связано с возобновлением их пищевой активности и компенсаторным ростом после акклиматизации к введению дополнительного круглосуточного освещения (Blier et al., 1997; Lamarre et al., 2007). В отличие от режима освещения 16С:8Т круглосуточное освещение (24С:0Т), вероятно, оказывает более значимый эффект на процессы регуляции роста и связанный с ними уровень аэробного обмена у рыб в летний период, когда естественная длина светового дня превышает 16 часов. Как было показано ранее, увеличение продолжительности светового дня вызывает повышение уровня гормона роста у атлантического лосося, действие которого влияет на изменение метаболизма, что способствует повышению аппетита у рыб (Björnsson et al., 1989; Boeuf, LeBail, 1999).

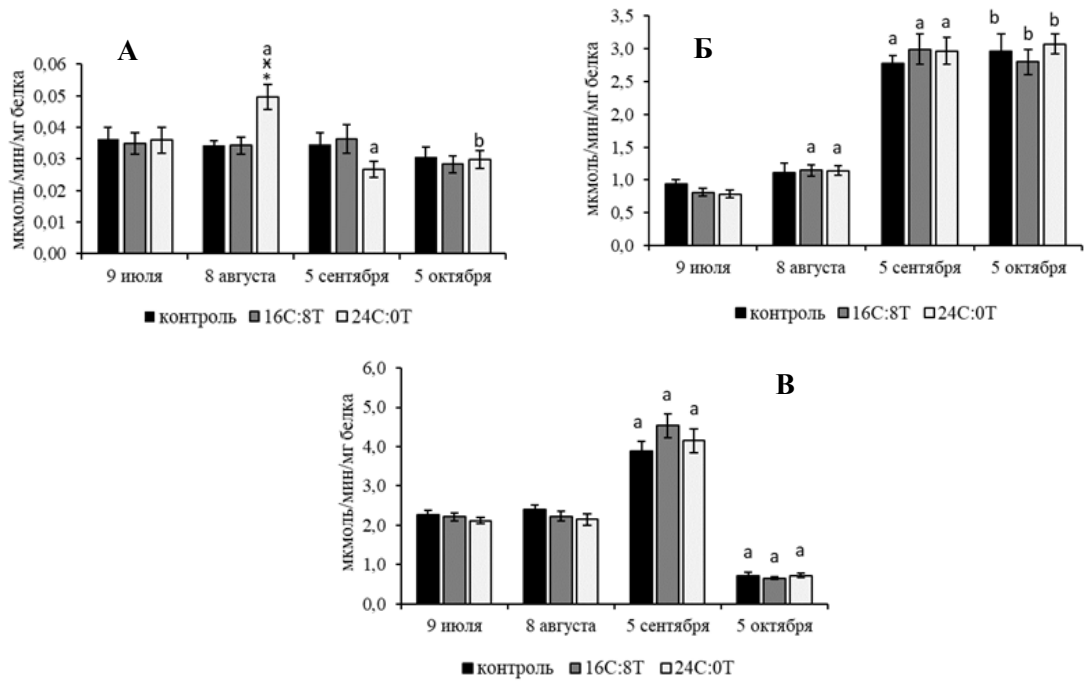
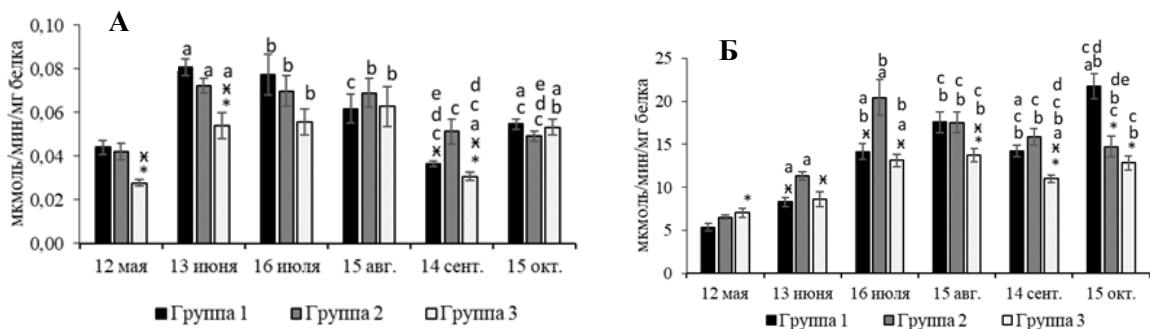


Рисунок 4. Относительная активность ЦО (А), ЛДГ (Б) и альдолазы (В) (мкмоль/мин/мг белка) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения (группа 1 - контроль, группа 2 - 16С:8Т, группа 3 - 24С:0Т). Различия достоверны ( $p < 0,05$ ): \* - по сравнению с группой 1; x - по сравнению с группой 2; a - по сравнению с данными, полученными в предыдущий месяц; b - по сравнению с данными, полученными 8 августа

У двухлеток лосося во втором эксперименте выявленные межгрупповые отличия по активности исследуемых ферментов отличались от установленных для сеголеток и двухлеток в первом эксперименте. Так, у рыб, которые непрерывно находились при круглосуточном освещении (группа 3), включая зимний период, на протяжении всего эксперимента наблюдались более низкие значения активности ЦО, ЛДГ и альдолазы по сравнению с таковыми у двухлеток из контрольной группы, а также у рыб из группы с круглосуточным освещением, которые в предыдущий год росли без дополнительного освещения (рисунок 5). Можно предположить, что сравнительно более низкая активность исследуемых ферментов у рыб в группе 3 с наибольшим приростом массы тела, связана с тем, что продолжительное воздействие круглосуточного освещения привело к адаптивным перестройкам метаболических путей, и, как следствие, к перераспределению доступных ресурсов и энергии, поступающих за счет энергетического и углеводного обмена в мышцах и необходимых в период активного роста рыб.



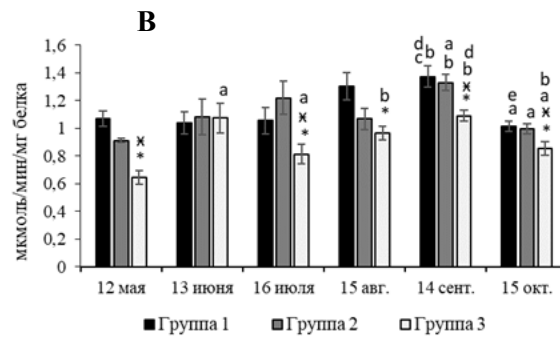


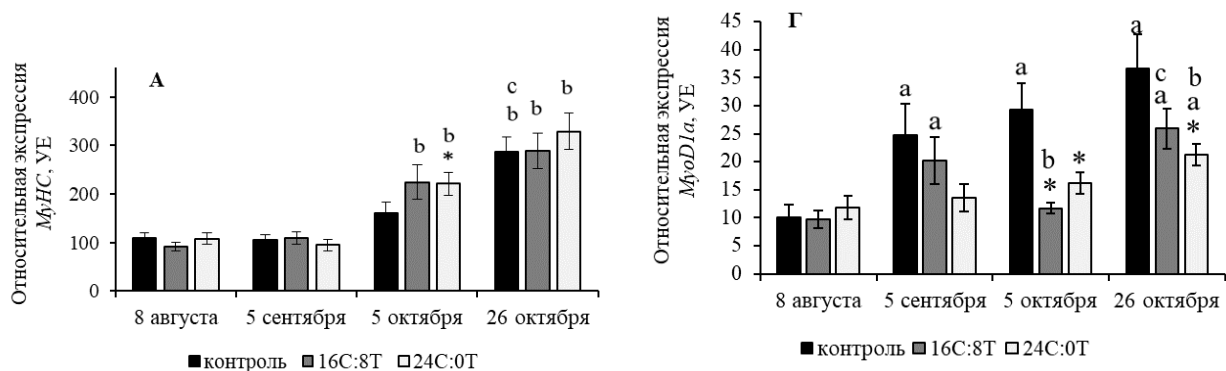
Рисунок 5. Относительная активность ЦО (А), ЛДГ (Б) и альдолазы (В), (мкмоль/мин/мг белка) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с круглосуточным освещением на протяжении разного периода времени, и без него (группа 1 – контроль; группа 2 - 24С:0Т, май-октябрь (5 месяцев); группа 3 - 24С:0Т, август-октябрь (14 месяцев)). Различия достоверны ( $p < 0,05$ ): \* - по сравнению с группой 1; ✕ - по сравнению с группой 2; а - по сравнению с данными, полученными в предыдущий месяц; b - по сравнению с данными, полученными 12 мая; с - по сравнению с данными, полученными 13 июня; d - по сравнению с данными, полученными 16 июля; e - по сравнению с данными, полученными 15 августа

Изменения активности исследуемых ферментов на протяжении экспериментального периода у разновозрастной молоди лосося во всех группах зависели от сезонного фактора – температуры воды. Так в осенний период у сеголеток и двухлеток (эксперимент 2) во всех группах, а также двухлеток (эксперимент 1) в группе с круглосуточным освещением, наблюдались более низкие значения ЦО по сравнению с данными, полученными в летние месяцы (рисунки 3А, 4А, 5А). Вероятно, эти изменения отражают повышенный синтез АТФ в аэробных условиях, связанный с активным питанием и ростом рыб в летний период, и снижение уровня аэробного обмена и, как следствие, замедление процессов роста рыб в осенний период (Gauthier et al., 2008; Savoie et al., 2008). У рыб во всех группах вне зависимости от режима освещения установлено повышение активности ЛДГ на протяжении экспериментального периода (рисунки 3Б, 4Б, 5Б), а альдолазы к сентябрю (рисунки 3В, 4В, 5В), что согласовывалось с увеличением массы рыб. Это может указывать на повышение уровня анаэробного обмена в мышцах особей лосося, вероятно связанное с возрастающей потребностью в энергетическом обеспечении процессов роста рыб по мере увеличения их массы и двигательной активности (Imstrand et al., 2006; Somero, Childress, 1990). Показано снижение активности альдолазы к концу эксперимента на фоне высоких значений активности ЦО и ЛДГ в осенний период у рыб из всех групп в обоих экспериментах. Подобный характер изменения активности исследуемых ферментов может быть связан с их ролью в перераспределении энергетических субстратов (главным образом липидов и углеводов), участвующих в поддержании метаболической активности и роста мышц у рыб при сезонном снижении температуры воды, когда у них происходит ухудшение аппетита и снижение пищевой активности. Это согласуется с данными анализа количественных и качественных изменений липидов и их жирных кислот, полученными нашими коллегами в аналогичном исследовании (Nemova et al., 2020), где было установлено сезонное снижение содержания общих липидов в мышечной ткани у сеголеток и двухлеток лосося во всех группах, а также преобладание процессов структурного роста (мышечной ткани) над жиронакоплением у двухлеток лосося в группах с дополнительным освещением.

### 3. Анализ уровней экспрессии генов *MyHC*, МРФ (*Myf5*, *MyoG*, *MyoD1a*, *MyoD1b*, *MyoD1c*) и миостатина (*MSTN1a* и *MSTN1b*) в белых мышцах особей атлантического лосося, содержащихся при разных режимах освещения

Установлены различия в уровнях экспрессии генов, участвующих в процессах регуляции мышечного роста, у разновозрастной молодежи лосося между группами рыб с разными режимами освещения.

Межгрупповые различия в одновременной экспрессии исследуемых генов у сеголеток лосося были выявлены в октябре. Уровни экспрессии генов *MyHC*, *MyoG* и *MyoD1c* были выше у особей из групп с дополнительным освещением (16С:8Т и 24С:0Т) (рисунок 6А, Б, Е), тогда как у рыб в контрольной группе установлены сравнительно более высокие значения экспрессии генов *Myf5*, *MyoD1a* и *MyoD1b* (рисунок 6В, Г, Д). Как было показано ранее (Watabe, 2001; Johansen, Overturf, 2005; Ganassi et al., 2018) увеличение уровней экспрессии *MyoD* и *Myf5* связано с интенсивной пролиферацией миогенных клеток (МПК) и последующей клеточной гиперплазией (образованием миотуб и их дифференцировкой в новые мышечные волокна), тогда как повышенная экспрессия гена *MyoG* индуцирует выход МКП из клеточного цикла и слияние миобластов с существующими миофибриллами в процессе гипертрофии мышечных волокон. Согласно предыдущим исследованиям у лососевых ген *MyoD1* представлен тремя паралогами (*MyoD1a*, *MyoD1b*, *MyoD1c*), которые имеют разный характер экспрессии в пролиферирующих и дифференцирующихся МКП в период формирования мышечных волокон и было высказано предположение, что гены *MyoD1b* и *MyoD1c* регулируют клеточный цикл миобластов, а *MyoD1a* участвует в их терминальной дифференцировке (Macqueen, Johnston, 2008; Bower, Johnston, 2010). Таким образом, дифференциальная экспрессия генов МРФ регулирует интенсивность и соотношение процессов гиперплазии и гипертрофии мышц. Вероятно, характер изменений экспрессии вышеуказанных генов, установленный у сеголеток из разных групп, указывает на различия путей регуляции процесса миогенеза (гиперплазии и гипертрофии), связанные с воздействием дополнительного (искусственного) освещения.



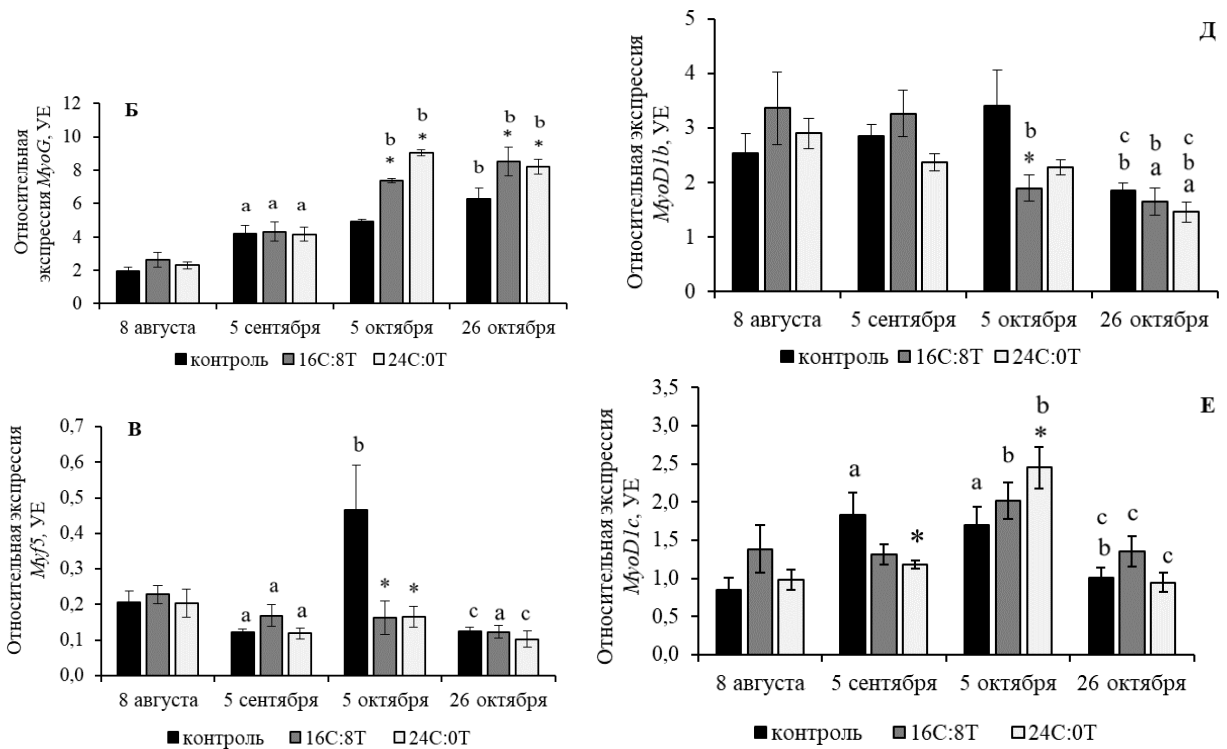
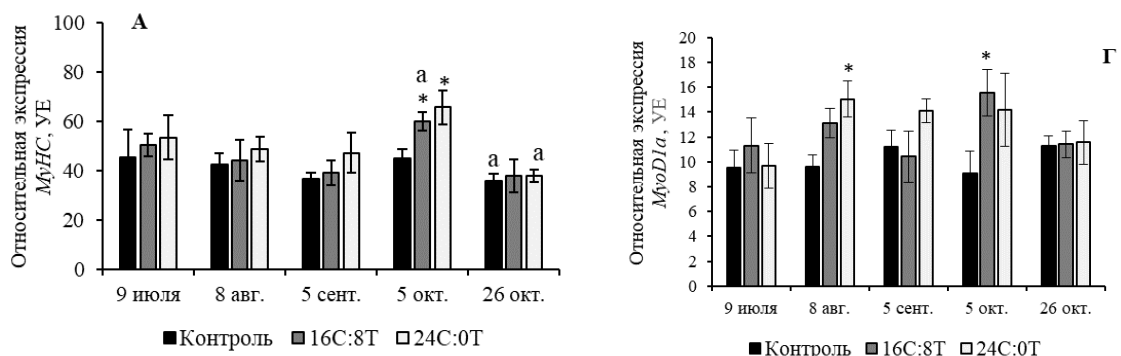


Рисунок 6. Относительный уровень экспрессии генов (УЕ) *MyHC* (А), *MyoG* (Б), *Myf5* (В), *MyoD1a* (Г), *MyoD1b* (Д), *MyoD1c* (Е), (для МРФ - УЕ\*100) в белых мышцах сегментов лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения (группа 1 - контроль, группа 2 - 16С:8Т, группа 3 - 24С:0Т). Различия достоверны ( $p < 0,05$ ): \* - по сравнению с группой 1; а - по сравнению с данными, полученными 8 августа; б - по сравнению с данными, полученными 5 сентября; с - по сравнению с данными, полученными 5 октября

У двухлеток лосося в первом эксперименте в группе с круглосуточным освещением по сравнению с рыбами из контрольной группы выявлены более высокие значения экспрессии генов *MyoG* и *MyoD1b* на протяжении эксперимента, уровни *MyoD1a* в августе, а также *MyHC* в начале октября (рисунок 7А, Б, Г, Д). У особей лосося в группе с режимом 16С:8Т уровни мРНК *MyHC*, а также всех паралогов *MyoD1* были выше, чем у рыб в контрольной группе, в начале октября (рисунок 7А, Г, Д, Е). Вероятно, относительно более высокие уровни экспрессии исследуемых генов (*MyoG* и паралогов *MyoD1*) у двухлеток лосося из групп с дополнительным освещением свидетельствуют об интенсификации процессов пролиферации и дифференцировки мышечных клеток, что способствует росту мышц как посредством гиперпластического, так и гипертрофического механизмов (Johansen, Overturf, 2005).





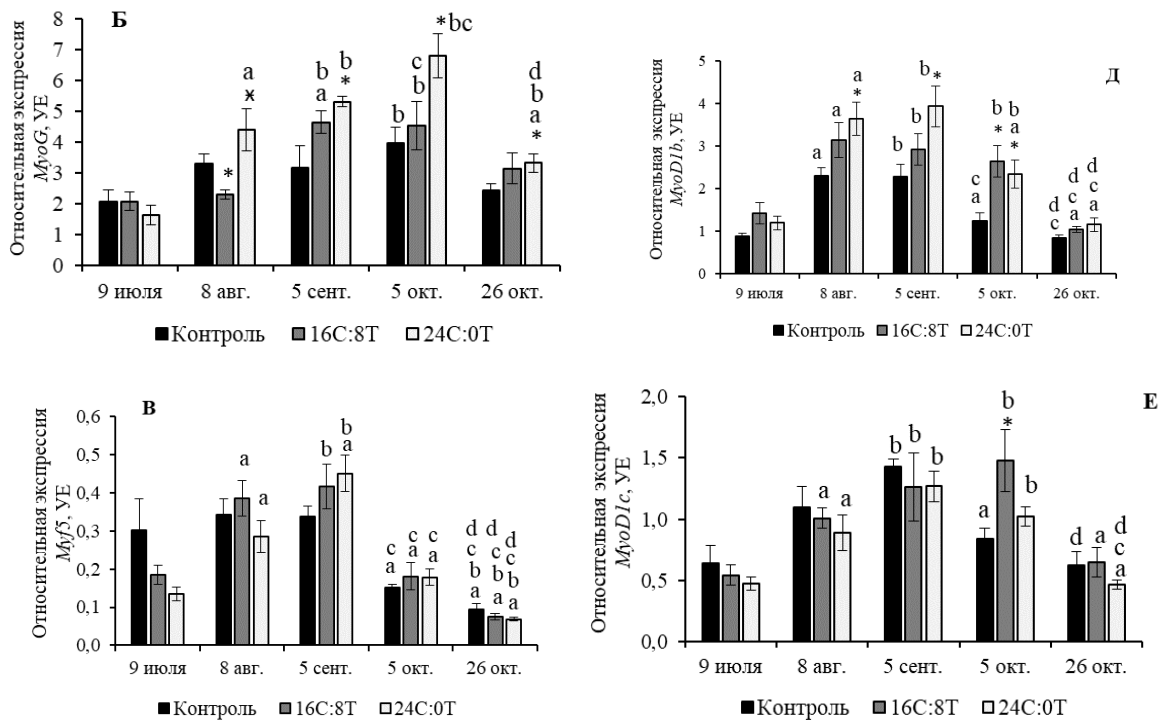


Рисунок 7. Относительный уровень экспрессии генов (YE) *MyHC* (А), *MyoG* (Б), *Myf5* (В), *MyoD1a* (Г), *MyoD1b* (Д), *MyoD1c* (Е), (для МРФ - YE\*100) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения (группа 1 - контроль, группа 2 - 16С:8Т, группа 3 - 24С:0Т). Различия достоверны ( $p < 0,05$ ): \* - по сравнению с группой 1; † - по сравнению с группой 2; а - по сравнению с данными, полученными в предыдущий месяц; б - по сравнению с данными, полученными 9 июля; с - по сравнению с данными, полученными 8 августа; д - по сравнению с данными, полученными 5 сентября

Установленные в нашей работе различия в одновременной экспрессии генов, регулирующих мышечный рост, у сеголеток и двухлеток лосося из экспериментальных (режимы 16С:8Т и 24С:0Т) и контрольных групп, вероятно, указывают на разное состояние мышечных клеток, формирующих новые волокна, и могут отражать различия в механизмах регуляции процесса миогенеза у рыб в зависимости от режима освещения. На основании выявленных межгрупповых различий по уровню экспрессии гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*), показателя, отражающего темпы роста рыб (Nevtøy et al., 2006), можно предположить, что дополнительное освещение оказывает положительный эффект на прирост мышечной массы у сеголеток и двухлеток лосося и способствует более продолжительному периоду роста осенью при снижении температуры воды, что согласовывалось с данными по массе рыб в этот период. Поскольку уровни экспрессии генов *MyHC* и миогенных регуляторных факторов различались у сеголеток и двухлеток лосося в группах с аналогичными условиями освещения (контроль, 16С:8Т и 24С:0Т), можно предположить, что регуляция мышечного роста рыб изменяется в зависимости от возраста, как было показано ранее в наших исследованиях на атлантическом лососе и кумже (Churova et al., 2017a, b).

У двухлеток лосося во втором эксперименте в группах с разными условиями освещения были выявлены особенности в экспрессии исследуемых генов, которые отличались от установленных для сеголеток и двухлеток в первом эксперименте. У рыб, которые находились при круглосуточном освещении непрерывно (группа 3), включая зимний период, уже в первый месяц исследования (май) наблюдались достоверно более высокие значения экспрессии гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*) по сравнению с

особями из двух других групп (рисунок 9А), что согласовывалось с различиями по массе рыб и, вероятно, связано с усилением процессов мышечного роста. Наряду с этим у рыб из группы 3 в мае были установлены аналогичные различия с контрольной группой по уровню экспрессии гена *Myf5*, в июне – по уровню экспрессии генов *MyoD1a* и *MyoD1c*, а в июле различия были зафиксированы с группой 2 по уровню экспрессии генов *MyoD1a* и *MyoD1b* (рисунок 9В, Г, Д, Е). У двухлеток лосося в группе 2, которым впервые включили круглосуточное освещение в мае, достоверно более высокая экспрессия вышеуказанных генов, а именно *Myf5*, *MyoD1a*, *MyoD1b* и *MyoD1c*, наблюдалась в августе. У рыб в контрольной группе установлены относительно более высокие уровни экспрессии генов *MyoG* и *MyoD1b* в июле (рисунок 9Б, Д), *MyoG* и *MyoD1a* в сентябре (рисунок 9Б, Г). Вероятно, наблюдаемые межгрупповые различия в уровнях мРНК исследуемых генов указывают на различия в регуляции процессов гиперпластического и гипертрофического роста мышц рыб, связанные с воздействием дополнительного освещения.

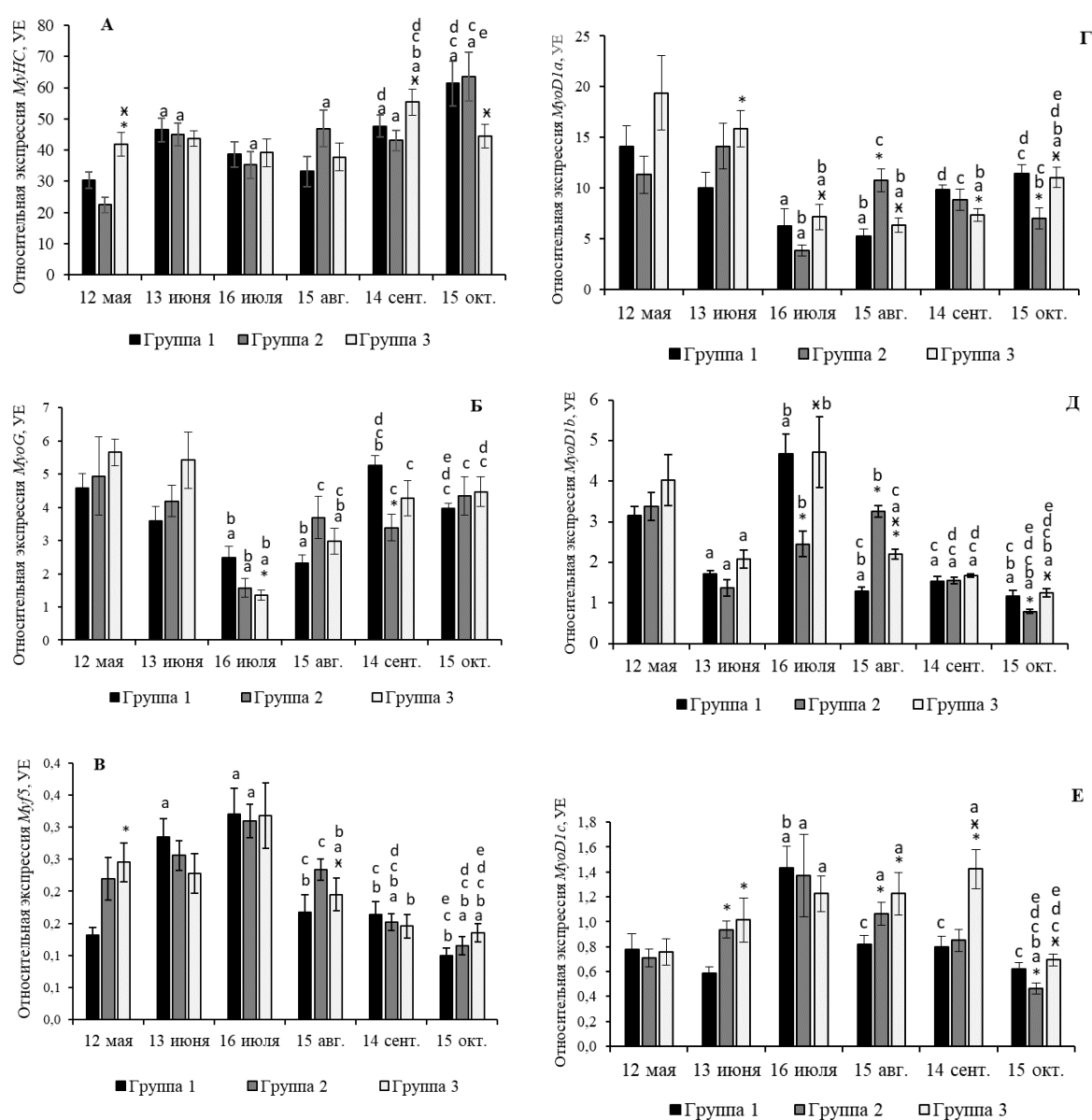


Рисунок 8. Относительный уровень экспрессии генов (YE) *MyHC* (А), *MyoG* (Б), *Myf5* (В), *MyoD1a* (Г), *MyoD1b* (Д), *MyoD1c* (Е), (для МРФ - YE\*100) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с круглосуточным освещением на протяжении разного периода времени, и

без него (группа 1 - контроль, группа 2 - 24С:0Т, май-октябрь (5 месяцев); группа 3 - 24С:0Т, август-октябрь (14 месяцев)). Различия достоверны ( $p < 0,05$ ): \* - по сравнению с группой 1; Ж - по сравнению с группой 2; а - по сравнению с данными, полученными 12 мая; b - по сравнению с данными, полученными 13 июня; с - по сравнению с данными, полученными 16 июля; d - по сравнению с данными, полученными 15 августа; e - по сравнению с данными, полученными 14 сентября

Принимая во внимание, что характер экспрессии генов *MyoD1a*, *MyoD1b* и *MyoD1c* различался между исследуемыми группами сеголеток и двухлеток лосося в обоих экспериментах, можно предположить, что функциональная активность паралога *MyoD1* в регуляции миогенеза изменяется под влиянием условий освещения.

Динамика изменений уровней экспрессии исследуемых генов имела схожие закономерности у разновозрастной молодежи лосося, содержащейся в группах с разным режимом освещения, и носила сезонный характер. Так, уровни экспрессии гена *MyoG* возрастали осенью по сравнению с летним периодом у рыб во всех экспериментах. У сеголеток, а также двухлеток во втором эксперименте подобное увеличение экспрессии было характерно для гена *MyoD1a*. У двухлеток лосося в первом эксперименте значения экспрессии гена *MyoD1a* достоверно не изменялись и сохранялись на высоком уровне на протяжении всего эксперимента. Наряду с этим у всех исследуемых рыб установлено одновременное снижение уровней экспрессии генов *MyoD1b*, *MyoD1c* и *Myf5* к концу экспериментального периода, что согласовывалось со снижением темпов роста рыб в осенний период. Причем у двухлеток лосося во втором эксперименте показанное разнонаправленное изменение уровней экспрессии указанных генов (повышение экспрессии генов *MyoD1a* и *MyoG* и снижение - *MyoD1b*, *MyoD1c* и *Myf5*) было зафиксировано после воздействия повышенной температуры воды. Вероятно, различия в одновременной экспрессии генов МРФ на протяжении экспериментального периода отражают их дифференциальную роль в регуляции мышечного роста у рыб при их адаптации к сезонному изменению температуры воды. Выявленные изменения могут указывать на снижение процессов пролиферации миобластов и усиление регуляции терминальной дифференцировки мышечных клеток и последующих процессов формирования и гипертрофии миофибрилл, что может отражать упомянутую в предыдущих исследованиях закономерность изменения соотношения между гипертрофическим и гиперпластическим процессами роста мышц у рыб в ответ на изменения температуры воды (Ayala et al., 2001; Johnston et al., 2003b). Необходимо отметить, что у рыб из всех групп уровни экспрессии гена *MyoD1a* преимущественно коррелировали с уровнями экспрессии гена *MyoG*, а *MyoD1b* и *MyoD1c* - с уровнями экспрессии гена *Myf5*, что, вероятно, указывает на особенности регуляции миогенеза у лососевых, связанные с установленной ранее субфункционализацией паралога гена *MyoD1* (Bower, Johnston, 2010).

У сеголеток и двухлеток во всех группах установлены высокие уровни экспрессии гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*) в осенний период, что может быть связано с транскрипцией генов *MyHC*, продукты которых обладают большей АТФазой активностью, в ответ на снижение температуры воды, как было показано ранее на других видах рыб (Johnston, 2001; Weber, Bosworth, 2005).

Установлена положительная взаимосвязь уровней экспрессии паралога гена миостатина (*MSTN1a* и *MSTN1b*) с экспрессией генов миогенных регуляторных факторов (МРФ) и *MyHC*, в мышцах сеголеток и двухлеток лосося во всех исследуемых группах (таблицы 1-3). Известно, что миостатин ингибирует пролиферацию и дифференцировку миобластов, а также останавливает деление МКП (Garikipati, Rodgers,

2012; Seiliez et al., 2012). Одно из возможных объяснений состоит в том, что *MSTN* экспрессируется в ответ на высокие уровни экспрессии *MyHC* и МРФ, что является механизмом, обеспечивающим контроль роста мышц посредством регуляции интенсивности процессов гиперплазии и гипертрофии мышечных волокон (Johansen, Overturf, 2006).

Таблица 1. Корреляции между уровнями экспрессии генов *MyHC*, МРФ и паралогов *MSTN* в мышцах сеголеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения в период с августа по 26 октября

Показатель	Значение коэффициента корреляции					
	экспрессия гена <i>MSTN1b</i>			экспрессия гена <i>MSTN1a</i>		
	1 группа (контроль)	2 группа (16С:8Т)	3 группа (24С:0Т)	1 группа (контроль)	2 группа (16С:8Т)	3 группа (24С:0Т)
<i>MyHC</i>	0,41* (p=0,03)	0,78* (p=0,00)	0,85* (p=0,00)	0,60* (p=0,00)	0,72* (p=0,00)	0,48* (p=0,01)
<i>MyoG</i>	0,20 (p=0,30)	0,35 (p=0,08)	0,51* (p=0,01)	0,27 (p=0,16)	0,47* (p=0,01)	0,57* (p=0,00)
<i>MyoD1b</i>	0,58* (p=0,00)	-0,14 (p=0,46)	-0,43* (p=0,02)	0,43* (p=0,01)	-0,23 (p=0,22)	-0,23 (p=0,22)
<i>Myf5</i>	0,83* (p=0,00)	0,30 (p=0,11)	0,17 (p=0,38)	0,61* (p=0,00)	0,31 (p=0,09)	0,06 (p=0,78)
<i>MyoD1a</i>	0,62* (p=0,00)	0,50* (p=0,01)	0,72* (p=0,00)	0,74* (p=0,00)	0,50* (p=0,01)	0,42* (p=0,02)
<i>MyoD1c</i>	0,52* (p=0,00)	0,64* (p=0,00)	0,29 (p=0,12)	0,31 (p=0,10)	0,56* (p=0,00)	0,76* (p=0,00)
<i>MSTN1a</i>	0,70* (p=0,00)	0,85* (p=0,00)	0,64* (p=0,00)			

\* - достоверная корреляция,  $p < 0,05$

Таблица 2. Корреляции между уровнями экспрессии генов *MyHC*, МРФ и паралогов *MSTN* в мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения в период с июля по 26 октября

Показатель	Значение коэффициента корреляции					
	экспрессия гена <i>MSTN1b</i>			экспрессия гена <i>MSTN1a</i>		
	1 группа (контроль)	2 группа (16С:8Т)	3 группа (24С:0Т)	1 группа (контроль)	2 группа (16С:8Т)	3 группа (24С:0Т)
<i>MyHC</i>	-0,08 (p=0,71)	-0,05 (p=0,80)	0,15 (p=0,45)	0,12 (p=0,56)	0,01 (p=0,96)	0,09 (p=0,63)
<i>MyoG</i>	0,33 (p=0,11)	0,49* (p=0,01)	0,68* (p=0,00)	0,14 (p=0,52)	0,41* (p=0,02)	0,68* (p=0,00)
<i>Myf5</i>	0,48* (p=0,02)	0,35 (p=0,08)	0,58* (p=0,00)	-0,11 (p=0,63)	0,65* (p=0,00)	0,50* (p=0,01)
<i>MyoD1b</i>	0,23 (p=0,29)	0,19 (p=0,31)	0,64* (p=0,00)	-0,18 (p=0,36)	0,38* (p=0,04)	0,46* (p=0,01)
<i>MyoD1a</i>	0,23 (p=0,28)	-0,01 (p=0,98)	0,34 (p=0,12)	0,14 (p=0,50)	-0,35 (p=0,11)	0,14 (p=0,54)
<i>MyoD1c</i>	0,40* (p=0,04)	0,35* (p=0,06)	0,61* (p=0,00)	0,17 (p=0,38)	0,25 (p=0,18)	0,67* (p=0,00)
<i>MSTN1a</i>	0,20 (p=0,34)	0,66* (p=0,00)	0,57* (p=0,00)			

\* - достоверная корреляция,  $p < 0,05$

Таблица 3. Корреляции между уровнями экспрессии генов *MyHC*, МРФ и паралога *MSTN* в мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения в период с мая по 15 октября

Показатель	Значение коэффициента корреляции					
	экспрессия гена <i>MSTN1b</i>			экспрессия гена <i>MSTN1a</i>		
	1 группа (контроль)	2 группа (24С:0Т, 5 месяцев)	3 группа (24С:0Т, 14 месяцев)	1 группа (контроль)	2 группа (24С:0Т, 5 месяцев)	3 группа (24С:0Т, 14 месяцев)
<i>MyHC</i>	0,51* (p=0,00)	0,35* (p=0,04)	0,63* (p=0,00)	0,27 (p=0,10)	0,35* (p=0,03)	0,45* (p=0,00)
<i>MyoG</i>	0,27 (p=0,10)	0,29 (p=0,08)	0,53* (p=0,00)	-0,35* (p=0,03)	-0,07 (p=0,68)	-0,08 (p=0,61)
<i>Myf5</i>	-0,13 (p=0,43)	-0,16 (p=0,35)	0,40* (p=0,02)	0,26 (p=0,10)	-0,03 (p=0,84)	0,06 (p=0,71)
<i>MyoD1a</i>	0,25 (p=0,18)	0,10 (p=0,56)	0,62* (p=0,00)	-0,39* (p=0,03)	-0,15 (p=0,39)	-0,17 (p=0,36)
<i>MyoD1b</i>	-0,19 (p=0,28)	0,40* (p=0,02)	0,58* (p=0,00)	0,01 (p=0,95)	0,23 (p=0,19)	0,17 (p=0,32)
<i>MyoD1c</i>	-0,04 (p=0,80)	0,38* (p=0,02)	0,08 (p=0,67)	0,41* (p=0,01)	0,30* (p=0,047)	0,29 (p=0,08)
<i>MSTN1a</i>	0,46* (p=0,01)	0,56* (p=0,00)	0,21 (p=0,23)			

\* - достоверная корреляция,  $p < 0,05$

### Заключение

В настоящей работе впервые проанализировано влияние экспериментальных условий освещения (режимы 16С:8Т и 24С:0Т) на характер экспрессии генов, регулирующих миогенез, а также активность ферментов энергетического обмена у молоди атлантического лосося двух возрастов (сеголеток и двухлеток). Согласно результатам исследования, введение круглосуточного освещения в технологический цикл выращивания молоди лосося способствует ускорению темпов роста рыб и их более продолжительному периоду роста осенью при снижении температуры воды. Выявленные различия в активности исследуемых ферментов связаны как с воздействием на рыб искусственно увеличенной длины светового дня, так и сезонных изменений температуры окружающей среды. Полученные данные свидетельствуют о важной роли миогенных регуляторных факторов в формировании и росте мышц у молоди атлантического лосося в процессе раннего развития при влиянии факторов окружающей среды. Межгрупповые различия в уровнях экспрессии генов МРФ, тяжелой цепи миозина могут отражать различия в механизмах регуляции процесса миогенеза у рыб в зависимости от условий освещения. Показано, что существуют определенные сезонные закономерности в одновременной экспрессии исследуемых генов, схожие для рыб, содержащихся как в условиях дополнительного освещения, так и без него. Было высказано предположение, что это может отражать изменения в интенсивности и соотношении процессов гиперплазии и гипертрофии мышечных волокон, связанные с сезонными вариациями температуры окружающей среды. Таким образом, получена новая информация, дополняющая имеющиеся к настоящему времени сведения, о приспособительных реакциях к изменению светового режима у молоди лосося, следствием которых является поддержание физиолого-биохимического гомеостаза организма в условиях воздействующего фактора среды.

## Выводы

1. Эффект от воздействия круглосуточного освещения на рост молоди лосося зависит как от продолжительности его использования, так и от возраста рыб. У сеголеток лосося наблюдается положительное влияние на прирост массы тела уже спустя месяц после включения круглосуточного освещения. Двухлетки лосося растут лучше при включении круглосуточного освещения в весенний период, а также при более длительном воздействии искусственного освещения, включая зимний период. Круглосуточное освещение способствует более продолжительному периоду роста рыб осенью при снижении температуры воды.

2. Изменения в активности ферментов - цитохром *c* оксидазы, лактатдегидрогеназы и альдолазы, в мышцах сеголеток и двухлеток лосося в обоих экспериментах отражают особенности регуляции энергетического обмена в мышцах рыб, связанные с возрастом особей, продолжительностью воздействия дополнительного освещения и носят сезонный характер.

3. Экспрессия исследуемых генов (*MyHC*, транскрипционных факторов регуляции миогенеза - *Myf5*, *MyoG*, *MyoD1a*, *MyoD1b*, *MyoD1c*) в мышцах разновозрастной молоди лосося имеет разный характер у рыб из экспериментальных (режимы 16С:8Т и 24С:0Т) и контрольных групп, что может отражать различия в регуляции интенсивности процессов миогенеза, связанные с условиями освещения. Изменения одновременной экспрессии генов *MyHC* и миогенных регуляторных факторов в зависимости от освещения различаются у разновозрастных рыб.

4. Уровни экспрессии паралога гена миостатина (*MSTN1a* и *MSTN1b*) положительно коррелируют с экспрессией генов *MyHC* и миогенных регуляторных факторов (МРФ), что, вероятно, свидетельствует о механизме регуляции интенсивности процессов миогенеза, обеспечивающим контроль роста мышц.

5. Межгрупповые различия в уровнях экспрессии генов *MyoD1a*, *MyoD1b* и *MyoD1c*, у рыб в обоих экспериментах, отражают различия в функциональной роли паралога *MyoD1* в регуляции миогенеза, и могут быть связаны изменением их активности под влиянием разной продолжительности светового дня. Паралоги гена *MyoD1* у разновозрастной молоди атлантического лосося из всех групп различаются по характеру экспрессии на протяжении эксперимента: уровни экспрессии генов *MyoD1b* и *MyoD1c* изменяются взаимосвязано с уровнями экспрессии гена *Myf5*, а - *MyoD1a* преимущественно коррелируют с уровнями экспрессии гена *MyoG*, что указывает на субфункционализацию паралога и связанные с ней особенности регуляции миогенеза у лососевых.

6. Динамика изменений уровней экспрессии исследуемых генов имеет схожие закономерности у разновозрастной молоди лосося во всех группах независимо от условий освещения, и носит сезонный характер. Уровни экспрессии гена *MyoG* (а также *MyHC* и *MyoD1a* у сеголеток и двухлеток во втором эксперименте) возрастают, а - генов *Myf5*, *MyoD1b* и *MyoD1c* снижаются, в осенний период по сравнению с летним, что, вероятно, отражает их дифференциальную роль в регуляции мышечного роста у рыб при их адаптации к сезонному изменению температуры воды.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ЦО – цитохром *c* оксидаза

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

*MyHC* – ген тяжелой цепи миозина

*MyoD1a* – ген белкового фактора миогенной дифференцировки 1a

*MyoD1b* – ген белкового фактора детерминации миобластов 1b

*MyoD1c* – ген белкового фактора детерминации миобластов 1c

*Myf5* – ген белкового фактора миогенной детерминации 5

*MyoG* – ген миогенина

*MSTN1a* – ген миостатина 1a

*MSTN1b* – ген белкового фактора роста и дифференцировки 8

*Efla* – ген белкового фактора элонгации трансляции 1 - альфа

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

### Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Churova M.V., **Shulgina N.**, Kuritsyn A., Krupnova M.Y., Nemova N.N. Muscle-specific gene expression and metabolic enzyme activities in Atlantic salmon *Salmo salar* L. fry reared under different photoperiod regimes // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2020. V. 239. P. 110330. DOI: 10.1016/j.cbpb.2019.110330.
2. **Shulgina N.S.**, Churova M.V., Murzina S.A., Krupnova M.Y., Nemova N.N. The Effect of Continuous Light on Growth and Muscle-Specific Gene Expression in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Yearlings // Life. 2021. V. 11. N. 4. P. 328. DOI: 10.3390/life11040328.
3. **Шульгина Н.С.**, Чурова М.В., Немова Н.Н. Влияние фотопериода на рост и развитие лососевых Salmonidae северных широт // Журнал общей биологии. 2021. Т. 82. №. 1. С. 68-80. DOI: 10.31857/S0044459621010073.
4. **Shulgina N.S.**, Kuznetsova M.V., Nemova N.N. The effect of different lighting regimes on some molecular-genetic parameters of juvenile Atlantic salmon's (*Salmo salar*) muscle growth under artificial reproduction conditions // Russian Journal of Developmental Biology. 2022. V. 53. N. 6. P. 472-489. DOI:10.1134/S106236042206008X.
5. Кузнецова М.В., Родин М.А., **Шульгина Н.С.**, Крупнова М.Ю., Курицын А. Е., Мурзина С.А., Немова Н.Н. Влияние разных режимов освещения и кормления на активность ферментов энергетического обмена у сеголетков атлантического лосося в условиях аквакультуры // Онтогенез. 2023. Т. 54. № 2. С. 1-10. DOI: 10.31857/S0475145023020039

### По теме диссертации опубликовано 13 тезисов и материалов докладов:

1. Чурова М.В., **Шульгина Н.С.**, Немова Н.Н. Влияние разных режимов освещения на рост и уровень энергетического обмена сеголетков (0+) атлантического лосося *Salmo salar* Linnaeus, 1758 / Материалы III научной школы молодых учёных и специалистов по рыбному хозяйству и экологии, посвященной 140-летию со дня рождения К.М. Дерюгина. Перспективы рыболовства и аквакультуры в современном мире / Под ред. А.М. Орлова, И.И. Гордеева, А.А. Сергеева. 2018. С. 148.
2. Churova M.V., **Shulgina N.S.**, Nemova N.N. Muscle-specific gene expression and metabolic enzymes activities in Atlantic salmon *Salmo salar* L. reared under different photoperiod regimes // Book of abstracts 31st ESCPB Congress. 2018. P. 31.
3. **Shulgina N.**, Nemova N., Churova M. Muscle-specific gene expression in Atlantic salmon *Salmo salar* L. reared under different photoperiod regimes // Annual meeting Florence 2018. Animal biology abstracts. P. 194.

4. **Shulgina N.**, Churova M., Kuritsyn A., Nemova N. Expression of myogenic regulatory factors in muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry reared under different photoperiod regimes // FEBS OPEN BIO. 2018. V. 8. P. 492-492.
5. Churova M., **Shulgina N.**, Murzina S.A., Pekkoeva S., Voronin V., Krupnova M., Nemova N. Metabolic enzymes activity and lipid profile in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared under different photoperiod regimes // Acta Physiologica 2019. V. 227. Issue S718. P. 112.
6. **Shulgina N.**, Churova M., Krupnova M., Nemova N. Effect of different lighting regimes on the growth and expression level of muscle-specific genes in yearlings (1+) Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // Acta Physiologica 2019. V. 227. Issue S718. P. 114.
7. **Шульгина Н. С.**, Чурова М. В., Крупнова М. Ю., Немова Н. Н. Влияние разных режимов освещения на некоторые биохимические и молекулярно-генетические показатели мышечного роста молоди атлантического лосося (*Salmo salar* L.) в условиях его искусственного воспроизводства // XII Съезд Гидробиологического общества при РАН: тезисы докладов, г. Петрозаводск, 16 сентября – 20 сентября 2019 г. / отв. ред. Н. В. Ильмаст. – Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2019. С. 530-531.
8. **Шульгина Н.С.**, Чурова М.В., Крупнова М.Ю., Немова Н.Н. Сравнительный анализ уровней экспрессии мРНК миогенных регуляторных факторов у молоди атлантического лосося *Salmo salar* L., выращенного при воздействии разных режимов освещения в условиях искусственного воспроизводства // Биология – наука XXI века: 24-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых. Пушино, 2020. Сборник тезисов. 2020. С. 272.
9. **Шульгина Н.С.**, Чурова М.В., Крупнова М.Ю., Немова Н.Н. Активность ферментов энергетического обмена и уровень экспрессии мРНК генов мышечных белков у молоди атлантического лосося при искусственном увеличении светового дня // Физиолого-биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов: тезисы докладов Второй Всероссийской конференции с международным участием [Борок, 24-28 октября 2020 г.] / Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН. – Ярославль: Филигрань, 2020. С. 63.
10. **Шульгина Н.С.** Биохимические и молекулярно-генетические показатели роста молоди атлантического лосося в оценке влияния разных режимов освещения, направленных на повышение эффективности его заводского выращивания // Сборник тезисов докладов участников пятого Всероссийского молодежного научного форума «Наука будущего - наука молодых» - Москва, 2020. С. 95.
11. **Шульгина Н. С.**, Чурова М. В., Крупнова М. Ю., Немова Н. Н. Влияние разных режимов освещения на рост и уровень экспрессии генов миогенных регуляторных факторов (МРФ) у молоди атлантического лосося (*Salmo salar* L.) в условиях его искусственного воспроизводства // Изучение водных и наземных экосистем: история и современность: тезисы докладов Международной научной конференции, посвященной 150-летию Севастопольской биологической станции – Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского и 45-летию НИС «Профессор Водяницкий», 13-18 сентября 2021 г., Севастополь, Российская Федерация. – Севастополь: ФИЦ ИнБЮМ, 2021. С. 452-453.
12. **Шульгина Н. С.**, Кузнецова М. В., Крупнова М. Ю., Немова Н. Н. Сезонные вариации уровней экспрессии мРНК генов мышечных белков у молоди атлантического лосося *Salmo salar* L., выращенного при воздействии дополнительного освещения в условиях искусственного воспроизводства // Изучение водных и наземных экосистем: история и современность: тезисы докладов II Международной научно-практической конференции, 5-9 сентября 2022 г., Севастополь, Российская Федерация. – Севастополь: ФИЦ ИнБЮМ, 2022. С. 198-199.
13. **Шульгина Н. С.**, Кузнецова М. В., Крупнова М. Ю., Немова Н. Н. Экспрессия генов транскрипционных факторов регуляции миогенеза у молоди атлантического лосося *Salmo salar* L., выращенного в условиях искусственного воспроизводства, при влиянии разных режимов освещения и сезонных изменений температуры // Материалы Юбилейной научной конференции «Николай Константинович Кольцов и биология XXI века», 3-8 октября 2022 г, Москва, ИБР РАН. – М. Издательство Перо, 2022. С. 92-93.