

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ ГЕМОГЛОБИНОВ МОРСКИХ РЫБ К ОКИСЛЕНИЮ

Изучено влияние низких температур на уровень метгемоглобина (MtHb) в крови 4-х видов морских рыб. Температуры, близкие к 5°C, индуцировали рост содержания мет-формы в крови рыб в 3-4 раза ($p < 0,001$). Данный эффект наблюдался в условиях *in vivo* и *in vitro*. Действие низких температур имело экологическую специфику и было связано с естественными температурными границами толерантности вида. Содержание рыб при 5-10°C в течение 15 суток сопровождалось восстановлением функциональной активности пигмента. Это было сопряжено с ростом активности эритроцитарной NADH₂-диафоразы на 87,4 % ($p < 0,05$).

В норме оксигемоглобин диссоциирует на тканевом уровне с сохранением железа гема в ферро-состоянии. Однако в некоторых случаях это сопровождается образованием супероксид аниона и переходом железа в трехвалентное состояние (ферри-форма). MtHb кислород не связывает, что является причиной развития анемии. В эритроците постоянно присутствует значительное количество восстановительных агентов (GSH, аскорбиновая кислота, токоферол), способных восстанавливать MtHb. Однако скорость реакции окисленного пигмента с этими соединениями незначительна [14]. Существует специфический ферментативный механизм восстановления MtHb. Ключевым звеном его является NADH₂-диафораза эритроцитов, которая переносит электрон с NADH₂ на цитохром b₅, а затем на MtHb [18]. Это приводит практически к 100% восстановлению окисленного пигмента. В норме концентрация его в крови человека не превышает 1% [1].

Ядерные эритроциты рыб имеют тот же, что и эритроциты человека, антиоксидантный комплекс [10, 16, 21]. В них выявлена NADH₂-диафораза [4, 13, 15, 17, 19]. Активность некоторых ферментов (пероксидазы, супероксиддисмутазы) и концентрация восстановителей (GSH) превышает таковую у человека [12, 20]. Вместе с тем, как показывают наблюдения, устойчивость респираторных пигментов рыб к окислению существенно ниже. Значительное влияние на состояние гемоглобина оказывают факторы среды и в частности температура. Уровень мет-формы в крови рыб в зимний период может превышать 10% [6, 9, 11, 13]. Максимальные значения были зарегистрированы для сеголетков карпа - 31% [8]. Природа данного явления до конца не ясна. Это обусловило постановку серии экспериментов, в ходе которых в условиях *in vitro* и *in vivo* было изучено влияние температурного фактора на уровень MtHb в крови и активность NADH₂-диафоразы в циркулирующих эритроцитах рыб.

Материал и методика. Работа выполнена на 4-х видах морских рыб: скорпене (*Scorpaena porcus* L.), бычке-кругляке (*Neogobius melanostomus* P.), кефали-сингили (*Liza aurata* R.) и камбале-глоссе (*Platichthys flesus luscus* P.). В работе использовали взрослых особей в состоянии относительного физиологического покоя. После отлова рыбу выдерживали в аквариумах в течение 24-48 ч, для снятия стресса, вызванного отловом и транспортировкой.

Эксперимент 1. У особей скорпены, содержащихся при 15°C, получали образцы гепаринизированной крови и в последующем инкубировали их при температурах 5, 10 и 15°C в течение 3-х часов. Спустя указанный промежуток времени отбирали пробы и подвергали их анализу. В работе использовали ультратермостат UTU-4 (Польша).

Эксперимент 2. Провели сравнительную оценку влияния низких температур на особей теплолюбивой кефали-сингили и холодолюбивой камбалы-глоссы. Контрольная группа рыб содержалась при 10°C, а экспериментальная - при 5°C. Период экспозиции составил 5 и 15 суток. Спустя указанный период получали пробы крови и подвергали их лабораторному анализу. В работе использовали специальный экспериментальный стенд, позволяющий контролировать содержание кислорода и температуру в рабочей камере. Объем рабочей камеры - 50 л.

Эксперимент 3. Аналогичную работу выполнили на особях бычка-кругляка. Отличие состояло лишь в том, что был охвачен более широкий температурный диапазон, и

процесс адаптации к новым температурным условиям среды был изучен более подробно. Контрольная группа особей содержалась при температуре воды 20°C. В экспериментальной камере температуру снижали со скоростью 0,05°C ч⁻¹ до 10°C и выдерживали рыб в этих условиях в течение 15 суток. Кровь получали на 1, 5, 10 и 15 сутки адаптационного процесса.

В течение опытов особей бычка-кругляка, кефали-сингиля и камбалы-гlossы кормили фаршем из малоценных видов рыб. Суточный пищевой рацион составлял 6-7% от массы тела.

Эксперимент 1 был выполнен летом 2000 г. на базе ИнБЮМ НАН Украины. Эксперименты 2 и 3 были проведены в 1980-1983 гг. в ЮгНИРО (Керчь).

Кровь получали из хвостовой артерии путем отсечения хвостового стебля. В качестве антикоагулянта применяли гепарин ("Richter", Венгрия). Концентрацию гемоглобина в крови измеряли при помощи гемиглобинцианидного метода, используя стандартный набор реактивов (НПО "Биолар"). Уровень метгемоглобина в крови оценивали спектрофотометрически с использованием ацетон-циангидрина [2].

Активность НАДН₂-диафоразы в циркулирующих эритроцитах оценивали по скорости восстановления метгемоглобина [2]. Состав инкубационной среды: 0,05 мл 1М трис-НСl буфера (рН 7,55); 0,1 мл 0,01М ЭДТА; 0,05 мл 1,2 мМ 2,6-дихлорфенолиндифенола; 3,25 мг метгемоглобина и 0,02 мл 8,8 мМ НАДН₂. Общий объем инкубационной среды 3 мл. Реакцию начинали добавлением НАДН₂. Регистрацию экстинкции проводили в течение 21 мин каждые 3 мин при 600 нм. Метгемоглобин готовили, используя кровь соответствующего вида рыбы. Эритроциты отделяли от плазмы и трижды отмывали в изотоничном растворе NaCl, центрифугируя образцы при 3000 об мин⁻¹ в течение 15 мин. Затем эритроцитаную массу взвешивали в 1% растворе NaNO₂ с целью перевода гемоглобина в мет-форму и повторно отмывали. Уровень окисленного пигмента контролировали по методике, рассмотренной выше. Полученные образцы метгемоглобина вводили в инкубационную среду.

Результаты экспериментов обработаны статистически с использованием t-критерия Стьюдента. Цифровые данные представлены в виде $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$.

Результаты и обсуждение. *Эксперименты in vitro.* В данной экспериментальной серии исследовали прямое действие температуры на циркулирующие клетки красной крови скорпены. Такая ситуация вполне реальна и может иметь место в момент оксигенации крови на уровне жабр, когда контакт со средой наиболее выражен.

Результаты инкубации гепаринизированных образцов крови скорпены при 5, 10 и 15°C представлены в таблице 1. Температура 15°C рассматривалась как контрольная, так как особи скорпены предварительно были адаптированы именно к этим температурным условиям. Снижение температуры инкубационной среды в диапазоне 15→10°C не оказывало значимого влияния на состояние гемоглобина. Концентрация окисленного пигмента в крови оставалась на уровне контрольных значений. Имеющиеся различия не были статистически выражены.

Таблица 1 Влияние низкой температуры на концентрацию метгемоглобина в образцах гепаринизированной крови скорпены (опыт *in vitro*)

Table 1 Low temperature effect on methemoglobin concentration in heparin blood samples of *Scorpaena porcus* L. (*in vitro* experiments)

Температура °C	n	Hb г л ⁻¹	MtHb г л ⁻¹	MtHb %
15	3	50,3±3,6	1,17±0,16	2,34±0,34
10	3	46,0±3,5	1,00±0,24	2,18±0,53
5	3	66,9±0,8	4,63±0,71	6,96±1,13

Примечание: n - число особей; Hb - концентрация гемоглобина; MtHb - концентрация метгемоглобина

Дальнейшее снижение температуры в диапазоне 10→5°C, напротив, сопровождалось значительным повышением концентрации метгемоглобина в крови. В сравнении с 10°C рост превысил 400% (p<0,01). Концентрация ферри-формы достигла 4,63±0,71 г л⁻¹. Фактически в окисленном состоянии находилось почти 7% пигмента.

Эксперименты *in vitro* не учитывают системных механизмов регуляции функций, которые могут быть, реализованы

исключительно в рамках целого организма. Этому вопросу и посвящена следующая серия экспериментов *in vivo*.

Сравнительная оценка влияния температуры. Эксперименты были выполнены на двух видах морских рыб, отличающихся толерантностью к температурному фактору: кефали-сингили и камбале-глоссе. Первый относится к группе теплолюбивых рыб. Нерест его происходит в августе-сентябре при температуре воды 18-22°C. Второй, напротив, ведет активный образ жизни в феврале и нерестится при температуре 4-5°C [3].

Снижение температуры воды в условиях эксперимента в диапазоне 10→5°C приводило к увеличению концентрации метгемоглобина в крови особей кефали-сингиля в 4,7 раза ($p<0,01$) (табл. 2). В окисленное состояние переходило почти 6% пигмента. Однако содержание особей в данных условиях в течение 15 суток сопровождалось развитием компенсационных изменений. Уровень метгемоглобина в циркулирующей крови снижался до $1,64\pm0,17$ г л⁻¹, что фактически совпадало с контрольными величинами.

Таблица 2 Сравнительная оценка устойчивости гемоглобина к окислению у рыб различной температурной толерантности в условиях экспериментальной гипотермии
Table 2 Comparative investigation of hemoglobin resistance to oxidation in fish of different temperature tolerance in experimental hypothermia

Условия опыта	Кефаль-сингиль				Камбала-глосса			
	n	Hb г л ⁻¹	MtHb г л ⁻¹	MtHb %	n	Hb г л ⁻¹	MtHb г л ⁻¹	MtHb %
9-10°C								
5 суток	5	91,5±3,8	1,14±0,30	1,24±0,32	5	58,6±3,8	0,55±0,13	0,99±0,32
15 суток	5	93,3±3,7	0,77±0,04	0,83±0,04	-	-	-	-
4-5°C								
5 суток	5	92,3±8,6	5,38±0,93	5,66±0,74	4	64,2±6,2	0,99±0,44	1,49±0,54
15 суток	5	83,5±3,2	1,64±0,17	1,98±0,23	-	-	-	-

Примечание: те же, что и таблице 1

В сравнении с кефалью-сингилем, низкие температуры фактически не оказывали выраженного влияния на гемоглобин холодолюбивой камбалы-глоссы. Имеющиеся различия не были статистически выражены и совпадали с контрольными величинами.

Таким образом, действие низких температур на респираторные пигменты рыб имеет экологическую специфику. Низкие температуры практически не индуцировали окисление гемоглобина у холодолюбивых рыб, тогда как на дыхательные пигменты теплолюбивых особей сказывали явно выраженный повреждающий эффект. Представляют интерес компенсационные процессы, развивающиеся в организме теплолюбивой кефали. Механизмам, которые стоят за ними, и посвящена следующая серия экспериментов.

Роль НАДН₂ диафоразы при температурной адаптации. В настоящей экспериментальной серии, наряду с определением концентрации метгемоглобина в крови, изучали активность НАДН₂-зависимой диафоразы в циркулирующих эритроцитах теплолюбивого бычка-кругляка. При температуре воды 20°C активность фермента составила $69,7\pm3,2$ Е⁶⁰⁰ мин⁻¹ (10⁴), а концентрация метгемоглобина в крови была равна $1,09\pm0,10$ г л⁻¹ (табл. 3). В окисленном состоянии находилось $2,29\pm0,19\%$ пигмента. Понижение температуры воды до 10°C сопровождалось равномерным снижением активности диафоразы на 24,4% ($p<0,001$). При этом уровень окисленного гемоглобина в крови возрастал в 4,9 раза ($p<0,001$). Коэффициент корреляции между значениями данных показателей составил -0,978.

Содержание особей бычка-кругляка при температуре воды 10°C в течение 15 суток приводило к восстановлению активности фермента на 87,4 % ($p<0,05$). Это совпадало со снижением концентрации метгемоглобина в крови на 60,0% ($p<0,001$) в сравнении с данными, полученными на 1-е сутки эксперимента, и повышением уровня функционально активного пигмента до 97,9% ($p<0,001$).

Как уже отмечалось, НАДН₂-зависимая диафораза эритроцитов выполняет роль специфического переносчика электронов от НАДН₂ к метгемоглобину [19]. При этом железо в геме переходит из трехвалентного состояния в двухвалентное. Поэтому изме

нение активности данного фермента следует рассматривать как основной фактор, контролирующий уровень окисленного и восстановленного гемоглобина в крови рыб. Это не исключает влияния других эритроцитарных факторов: восстановленного глутатиона, активности каталазы [13]. Однако эти соединения менее специфичны по отношению к гемоглобину, чем НАДН₂-зависимая диафораза, и поэтому менее значимы в поддержании его в восстановленной форме.

Таблица 3 Влияние гипотермии на концентрацию метгемоглобина в крови и активность НАДН₂-диафоразы эритроцитов бычка-кругляка

Table 3 Low temperature effect on methemoglobin concentration in blood and NADH₂-diaphorase activity in erythrocyte of *Neogobius melanostomus*.

Условия эксперимента	n	Hb г л ⁻¹	MtHb г л ⁻¹	MtHb %	NADH ₂ - diaphorase Е ⁶⁰⁰ мин ⁻¹ (10 ⁴)
20°C (1-е сут.)	10	49,5 $\pm$ 0,47	1,09 $\pm$ 0,10	2,29 $\pm$ 0,19	69,7 $\pm$ 3,2
15°C (1-е сут.)	10	65,0 $\pm$ 0,52	2,88 $\pm$ 0,32	4,40 $\pm$ 0,27	59,9 $\pm$ 2,0
10°C					
1-е сутки	10	80,9 $\pm$ 0,43	5,37 $\pm$ 0,43	6,70 $\pm$ 0,50	52,7 $\pm$ 2,7
5-е сутки	9	76,4 $\pm$ 0,40	5,25 $\pm$ 0,53	6,82 $\pm$ 0,55	50,7 $\pm$ 3,1
10-е сутки	10	68,6 $\pm$ 0,43	3,64 $\pm$ 0,42	5,39 $\pm$ 0,53	52,5 $\pm$ 2,4
15-е сутки	10	65,2 $\pm$ 0,43	2,15 $\pm$ 0,23	3,31 $\pm$ 0,22	60,9 $\pm$ 3,3

Примечание: те же, что и таблице 1

Восстановление активности НАДН₂-зависимой диафоразы в эритроцитах бычка-кругляка при адаптации к 10°C могло определяться как минимум тремя процессами: увеличением числа молекул фермента в клетке, перестройкой изоферментного спектра, модуляцией активности по принципу аллостерической регуляции [7].

Сравнительная оценка активности НАДН₂-зависимой диафоразы при температуре инкубационной среды 20°C у контрольной и опытной групп рыб (10°C, 15-е сутки адаптации) показала, что у последней она была на 24,4% ($p < 0,001$) выше. Это позволяет говорить о том, что в основе восстановления активности фермента при 10°C, по-видимому, лежит количественная стратегия адаптации.

Необходимо отметить, что рост концентрации метгемоглобина в крови бычка-кругляка во всех случаях был сопряжен с увеличением общей концентрации гемоглобина в крови. Снижение доли окисленного пигмента вызывало противоположные изменения (табл. 3). Это также можно рассматривать как компенсационную реакцию, но реализуемую исключительно на системном уровне: активизация эритропоэза, задействование резервов кровяных депо, изменение степени оводненности периферического русла крови. Подобные реакции, направленные на коррекцию кислородной емкости крови, довольно часто встречаются при адаптации морских рыб к условиям среды [5].

Выводы. Температуры ниже 5°C индуцируют процесс окисления гемоглобина и рост содержания мет-формы в крови рыб. Данный эффект наблюдается как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*. Действие низких температур на респираторные пигменты рыб имеет экологическую специфику. Низкие температуры практически не индуцируют окисление гемоглобина у холодолюбивых рыб, в то время как на дыхательные пигменты теплолюбивых особей оказывают явно выраженный повреждающий эффект. Длительное содержание рыб в условиях низких температур сопровождается развитием компенсационных изменений на уровне циркулирующих эритроцитов, направленных на восстановление функциональной активности пигмента. В этом принимает активное участие НАДН₂-зависимая диафораза. Увеличение активности фермента сопряжено с повышением содержания его в клетках красной крови.

1. Бойтлер Э. Нарушение метаболизма эритроцитов и гемолитическая анемия. -М.: Медицина, 1981. - 256 с.
2. Кушаковский М.С. Метгемоглобинемии // Справочник по функциональной диагностике. -М.: Медицина, 1970. -С. 423 - 427.
3. Световидов А.Н. Рыбы Черного моря. -М.: Наука, 1964. -550 с.

4. Солдатов А.А. Активность NADH₂-зависимой метгемоглобинредуктазы в эритроцитах бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* P. при адаптации к низким температурам // Ж. эволюц. биохим. и физиол. -1989. -25, N6. - С. 772 - 774.
5. Солдатов А.А. Регуляция состава красной крови бычка-мартовика (*Gobius batrachocephalus* P.) при адаптации к высоким температурам // Гидробиол. ж. -1998. -34, N1. - С. 62 - 67.
6. Солдатов А.А., Маслова М.Н. Концентрация метгемоглобина в крови рыб в течение годового цикла // Ж. эволюц. биохим. и физиол. -1989. -25, N4. -С. 454 - 459.
7. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. -М.: Мир, 1988. -568 с.
8. Черникова В.В. Гематологическая характеристика зимующего сеголетка карпа // Изв. ГосНИОРХ. -1974. -88. -С.109-135.
9. Штерман Л.Я. Влияние зимовки и условий выращивания на уровень метгемоглобина у рыб // Изв. ГосНИОРХ. -1972. -81. -С. 64-68.
10. Braddon S.A., McIlvaine C.M., Balthrop J.E. Distribution of GSH and GSH cycle enzymes in black sea bass // Comp. Biochem. Physiol. -1985. -80B, N2. - P. 213 - 216.
11. Cameron J.N. Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout // Comp. Biochem. Physiol. -1971. -40A, N3. -P. 743 - 749.
12. Dafre A.L., Reischl E. Asymmetric hemoglobins, their thiol content, and blood glutathione of the scalloped hammerhead shark // Comp. Biochem. Physiol. -1997. -116B, N3. - P. 323 - 331.
13. Hardig J., Hoglund L.B. Seasonal and ontogenetic effects on methaemoglobin and reduced glutathione contents in the blood of reared baltic salmon // Comp. Biochem. Physiol. -1983. -76A, N1. - P. 27 - 34.
14. Hsieh H.S., Jaffe E.R. The metabolism of methemoglobin in human erythrocytes // The red blood cell. -2. -N-Y: Acad. Press, 1975. - P. 799 - 824.
15. Kawatsu Y., Nakanishi Y., Takeda H. Methemoglobin determination in eel blood // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. -1987. -53, N1. - P. 9 - 14.
16. Mather-Mihaich E., Di-Giulio R.T. Oxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a bleached kraft mill effluent // Arch. Environ. Contam. Toxicol. -1991. -20, N3. -P. 391-397.
17. Schoore E.J., Simco B.A., Davis K.B. Responses of blue catfish and channel catfish to environmental nitrite // J. Aquat. Anim. Health. -1995. -7, N4. - P. 304 - 311.
18. Scott E.M. Congenital methemoglobinemia due to DPNH-diaphorase deficiency // Hereditary disorders of erythrocyte metabolism. -New York: City of Hope Symp. Series, 1968. -P. 102 - 113.
19. Tucker C.S., MacMillan J.R. Effect of short-term starvation on methemoglobin levels in nitrite-exposed channel catfish // J. Appl. Aquacult. -1992. -1, N4. - P. 21 - 28.
20. Wdzieczak J., Zalesna G., Bartkowiak A., et al. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase level in erythrocytes and livers of different fresh water and marine fish species // Comp. Biochem. Physiol. -1982. -73B, N2. - P. 361 - 365.
21. Zikic R.V., Stajn A., Petrovic V.M. Effect of dexamethasone on the activity of superoxide dismutase and catalase in the tissue and erythrocytes of goldfish // Acta Biol. Jugosl. C. -1991. -27, N1. - P. 45 - 51.

Институт биологии южных морей НАНУ, г. Севастополь
Таврический национальный университет, г. Симферополь

Получено 15.09. 2000

A. A. SOLDATOV, I. A. PARFJONOVA

TEMPERATURE EFFECT ON RESISTANCE OF MARINE FISH HEMOGLOBINS TO OXIDATION

Summary

Low temperature effect (range 5-20°C) on methemoglobin level in blood of four marine fish species, namely *Scorpaena porcus* L., *Neogobius melanostomus* P., *Liza aurata* R., *Platichthys flesus* luscus P., was investigated in experimental conditions. Temperatures near 5°C induced oxidation process of hemoglobin and rise of met-form condition in fish blood in 3-4 times ($p < 0,001$). This phenomenon was observed *in vivo* and *in vitro* conditions. Low temperature effect on respiration pigments of fish had ecological specification being connected with natural boundaries of temperature tolerance of species. Fish keeping at 5-10°C during 15 days was accompanied by development of compensation reactions in erythrocytes. These reactions were directed on restore of functional properties of hemoglobin. Erythrocyte NADH₂-diaphorase took part participation in it. Enzyme activity increased by 87,4% ($p < 0,05$). It was connected with rise of enzyme level in red blood cells.