

УДК 597.08: 591.1(262.5)

Г. Е. Шульман, А. Я. Столбов, А. А. Солдатов, Г. С.
Минюк, Е. В. Ивлева, В. В. Трусевич, И. В. Дробецкая

**МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ЧЕРНОМОРСКИХ
РЫБ НА ДОЛГОВРЕМЕННУЮ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ**

Проблема гипоксии для морских гидробионтов (рыб и беспозвоночных) приобрела в последнее время особое значение. Это объясняется прежде всего усиливающимся антропогенным воздействием на пелагические и шельфовые экосистемы, одним из негативных результатов которого является резкое снижение концентрации кислорода в воде. Наряду с евтрофикацией, существенными факторами гипоксии являются токсиканты, блокирующие доступ кислорода к тканям [15, 21]. Однако в последние годы было установлено, что для некоторых зон многих морских бассейнов значительный дефицит кислорода ($< 1 \text{ мл} \cdot \text{л}^{-1}$) является не аномалией, а нормой, к которой прекрасно приспособились их обитатели [17]. Это — районы восточной Пацифики, примыкающие к Калифорнии [3], Бенгальского течения в Атлантике вблизи Намибии [24], Аравийского моря в Индийском океане [8]. Здесь отмечены высокие значения биомассы зоопланктона, кальмаров и рыб. Но не только в тропиках, а и в Черном море в редокс-зоне, на границе с сероводородной, отмечены повышенные концентрации калянуса — самого массового вида зоопланктона пелагиали [4, 16]. Что касается илистых грунтов, то о жизни гидробионтов в них при высоком дефиците кислорода известно уже давно [2]. Открытие же разнообразной и богатой фауны «черных курильщиков» (гидротермальных разломов на океаническом дне) поставило вопрос о необходимости изучения метаболических особенностей животных, обитающих в экстремальных (в том числе и по дефициту кислорода) условиях [6, 7, 20, 27].

На протяжении ряда лет мы изучали реакции черноморских рыб — ставриды (*Trachurus mediterraneus ponticus*), ласкиря (*Diplodus annularis*) и скорпены (*Scorpena porcus*) [13], а также креветок *Palemon elegans* [14] на низкие концентрации кислорода в условиях экспериментальной «краткосрочной» гипоксии. Было показано, что при снижении концентрации кислорода в воде в течение 2—4 ч от 100 до 20% насыщения на фоне значительного уменьшения потребления кислорода резко увеличивается доля азотистого ката-

© Шульман Г. Е., Столбов А. Я., Солдатов А. А., Минюк Г. С., Ивлева Е. В., Трусевич В. В., Дробецкая И. В., 2003

1. Характеристика материала исследований

Виды рыб	Период проведения исследований	Продолжительность исследований, сутки	Количество рыб		Масса особи, г		Температура воды, °С	Насыщение воды кислородом, %	
			контроль	опыт	контроль	опыт		контроль	опыт
Кефаль-сингиль	1995 г. (октябрь — ноябрь)	26	6	6	60,0±5,3	47,0±5,4	14—15	89—100	54
Скорпена	1996 г. (октябрь — ноябрь)	29	8	8	55,0±12,0	80,0±6,6	10—12	93—100	30

болизма в энергетическом обмене; при этом значительная часть белка начинает использоваться для поддержания этого обмена анаэробно.

В настоящей серии экспериментов задачей исследования было выяснить, каковы метаболические реакции рыб на длительную (26—29 сут) гипоксию. В качестве объектов исследования были выбраны скорпена и кефаль-сингиль (*Liza aurata*).

Материал и методика исследований. Опыты проводили в октябре — ноябре 1995 г. на кефали и в те же месяцы 1996 г. — на скорпене. У подопытных рыб определяли потребление кислорода, экскрецию азота, атомное соотношение потребленного кислорода и выделенного азота (O:N) и частоту дыхания. Также проводили визуальный контроль за поведенческими реакциями подопытных рыб. Наряду с этими показателями у скорпены определяли содержание гемоглобина в крови, количество эритроцитов, гематокрит; рассчитывали среднечеточное содержание гемоглобина (СГЭ) и среднечеточный объем (СЭО). Кроме того, у скорпены определяли содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — диеновых конъюгатов и ТБК-активных продуктов — в тканях и органах. В качестве дополнительного материала у обоих видов рыб исследовали гистологические срезы белых мышц для выяснения степени влияния гипоксии на состояние мышечной ткани.

Характеристика материала исследований представлена в таблице 1.

Рыб отлавливали ставным неводом и содержали в проточных аквариумах. Все особи кефали были ювенильными (неполовозрелыми), скорпены — исключительно самками II стадии зрелости. Для контроля и опытов использовали аквариумы-респирометры объемом 46 л, в которые помещали всю группу исследуемых рыб (по 6 экз. кефали и 8 экз. скорпены). Контрольный респирометр был проточным. В опытном респирометре гипоксические условия создавались за счет естественной убыли кислорода в системе при дыхании рыб (аутогенная гипоксия). Потребление кислорода в контроле и в эксперименте оценивали с помощью хлорсеребряных датчиков с регистрацией содержания кислорода на самописце типа КСП-4

[13]. Необходимый уровень кислорода в воде поддерживали с помощью специального электронного блока в пределах $0,5-0,7 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ в течение всего эксперимента. Концентрацию кислорода в опыте с кефалью поддерживали на уровне $4,82-5,02 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (54% насыщения), а в опыте со скорпеной — на уровне $2,92-3,20 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (30% насыщения). Концентрация кислорода в контроле составляла для кефали $8,0-8,2$, а для скорпены — $8,0-8,4 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (т. е. 100—89 и 100—93% насыщения).

Экскрецию аммонийного азота в контроле и опыте определяли по стандартной методике Сэджи — Солорзано [9].

На протяжении опыта рыб не кормили. Все измерения дыхания и экскреции производили на группе рыб ежедневно в последние 10 сут экспериментов. К концу экспериментов резких отклонений в поведении подопытных рыб не наблюдалось. Можно лишь отметить их несколько повышенную по сравнению с контрольными рыбами двигательную активность.

Кровь получали из хвостовой артерии путем отсечения хвостового стебля. В качестве антикоагулянта применяли гепарин («Рихтер», Венгрия). Концентрацию гемоглобина в крови определяли при помощи гемиглобинцианидного метода, используя стандартный набор реактивов (НПО «Биолар»). Количество эритроцитов подсчитывали в камере Горяева. Гематокрит определяли центрифугированием образцов крови в гепаринизированных капиллярах в специальном гематокритном роторе (750 g, 30 мин). На основании полученных значений рассчитывали СЭО и СГЭ.

Для определения первичных продуктов ПОЛ липиды из тканей экстрагировали по Фолчу [18] и после удаления водорастворимых примесей перерастворяли в смеси *n*-гептан-изопропанол (1:1). Концентрацию диеновых конъюгатов рассчитывали по оптической плотности при 232 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции $27000 \text{ м}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [22]. Определение ТБК-активных продуктов проводили по [25].

Для гистологического анализа отбирали образцы белой мышечной ткани в строго определенном участке среднего отдела тела рыбы. Материал фиксировали в нейтральном 10%-ном формалине, проводили через спирты и заливали в парафин [12]. Структурные изменения мышечной ткани оценивали в соответствии с балльной шкалой, предложенной Ю. В. Алсуфьевым с соавторами [1].

Результаты исследований и их обсуждение

У рыб обоих исследованных видов при длительной гипоксии потребление кислорода достоверно уменьшалось (одновременно с возрастанием частоты дыхания), в то время как экскреция азота более чем в 2 раза увеличивалась (табл. 2). Сходные данные были получены нами ранее при изучении краткосрочной гипоксии (2—4 ч) у ставриды, ласкиря и скорпены [13]. При анализе этих данных обращает на себя внимание не столько снижение интенсивности потребления кислорода (что вполне естественно), сколько значительное увеличение экскреции азота. Это, очевидно, указывает на интен-

2. Потребление кислорода, экскреция азота и соотношение O:N у кефали-сингиля и скорпены при длительной гипоксии

Виды рыб	Условия проведения опыта	Потребление O_2 , мкг·г ⁻¹ ·ч ⁻¹	Экскреция азота, мкг·г ⁻¹ ·ч ⁻¹	O:N	Частота дыхания, мин ⁻¹
Кефаль-сингиль	Контроль	175,0±8,8	14,7±4,6	13,5	43,0±3,5
	Опыт	145,0±5,5	34,0±7,0	4,9	53,0±5,0
	M_{diff}	$p < 0,02$	$p < 0,01$		$p < 0,1$
Скорпена	Контроль	151,0±13,9	4,4±0,9	39,2	17,04,0
	Опыт	128,0±2,0	9,2±1,0	15,8	26,02,0
	M_{diff}	$p < 0,1$	$p < 0,01$		$p < 0,1$

сификацию белкового катаболизма, компенсаторно поддерживающего энергетический обмен в условиях дефицита кислорода. На это указывает аммонийный коэффициент O:N, уменьшившийся более чем в 2 раза. Низкие значения этого коэффициента свидетельствуют о полном доминировании белков как энергетических субстратов при гипоксии. При этом у кефали, судя по величине коэффициента (4,9), около 50% белков катаболизируется анаэробно. Напомним, что у скорпены при краткосрочной гипоксии коэффициент O:N также снижался до 5—7, что указывает на анаэробное использование 20—40% белков. Но в тех опытах содержание кислорода составляло 20% его насыщения, в то время как при долговременной гипоксии концентрация кислорода не снижалась ниже 30% его насыщения. Это, очевидно, позволило скорпене в настоящем эксперименте не переходить на анаэробное использование белка.

Концентрация гемоглобина и количество эритроцитов в крови рыб в течение опыта не изменялись (табл. 3). Среднеклеточное содержание гемоглобина также оставалось на уровне контрольных величин. В то же время отмечено достоверное увеличение значений гематокрита. Это было обусловлено изменением объема циркулирующих клеток красной крови: среднеритроцитарный объем повышался на 22,6%.

Увеличение объема эритроцитов у рыб в условиях гипоксии было отмечено ранее в работах ряда авторов [19, 23 и др.]. Показано, что этот процесс связан с трансмембранным обменом Na^+/H^+ и индуцируется повышением содержания адреналина в крови [11, 26]. Выход H^+ из клеток предотвращает значительное изменение pH и способствует нормальному функционированию молекулярных систем эритроцитов, прежде всего гемоглобина. По-

3. Гематологические показатели скорпены при длительной гипоксии

Условия проведения опыта	Концентрация гемоглобина, г·д ⁻¹	Количество эритроцитов, 10 ¹² ·д ⁻¹	Гематокрит, %	СГЭ, пг	СЭО, мкм ³
Контроль	33,8±1,6	0,58±0,03	14,3±0,8	58,9±2,3	250,7±12,6
Опыт	36,1±2,2	0,63±0,03	19,2±1,6	57,5±1,7	307,4±17,5
M_{diff}	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

ступление Na^+ в клетки повышает осмотическое давление и сопровождается обводнением эритроцитов. Объем клеток при этом увеличивается. По-видимому, именно эти процессы и определяют увеличение объема клеток красной крови у скорпены в условиях экспериментальной гипоксии и являлись механизмом направленной коррекции сродства гемоглобина к кислороду.

По содержанию продуктов перекисного окисления липидов в тканях и органах скорпены достоверные различия между контролем и опытом получены лишь по диеновым конъюгатам для жабр и по ТБК-активным продуктам — для плазмы крови (табл. 4). В обоих случаях показатели значительно возросли. Стабильный уровень показателей ПОЛ в мышцах и печени может указывать на более высокую антиоксидантную емкость этих тканей по сравнению с жабрами и плазмой. Четко выраженная ответная реакция крови на условия гипоксии, возможно, связана с тем, что в плазме, помимо собственных вторичных продуктов свободнорадикального окисления, накапливаются продукты ПОЛ, поступающие сюда из других тканей. Кроме того, в крови, в отличие от других тканей, присутствует дополнительный «фактор риска» — ионы железа (II) (Fe^{2+}) в составе гемоглобина. Обводнение эритроцитов может сопровождаться гемолизом части из них и выходом гемоглобина в плазму с последующей диссоциацией комплекса гем-белок. Гем, лишенный белковой составляющей, легко расщепляется с высвобождением ионов Fe^{2+} , инициирующих развитие свободнорадикального окисления [5, 10, 28].

Гистологическая характеристика белых мышц исследованных рыб представлена на рисунках 1 и 2. Нормальное состояние мышечной ткани выражается в параллельном расположении мышечных волокон, хорошо замет-

4. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в тканях и органах скорпены

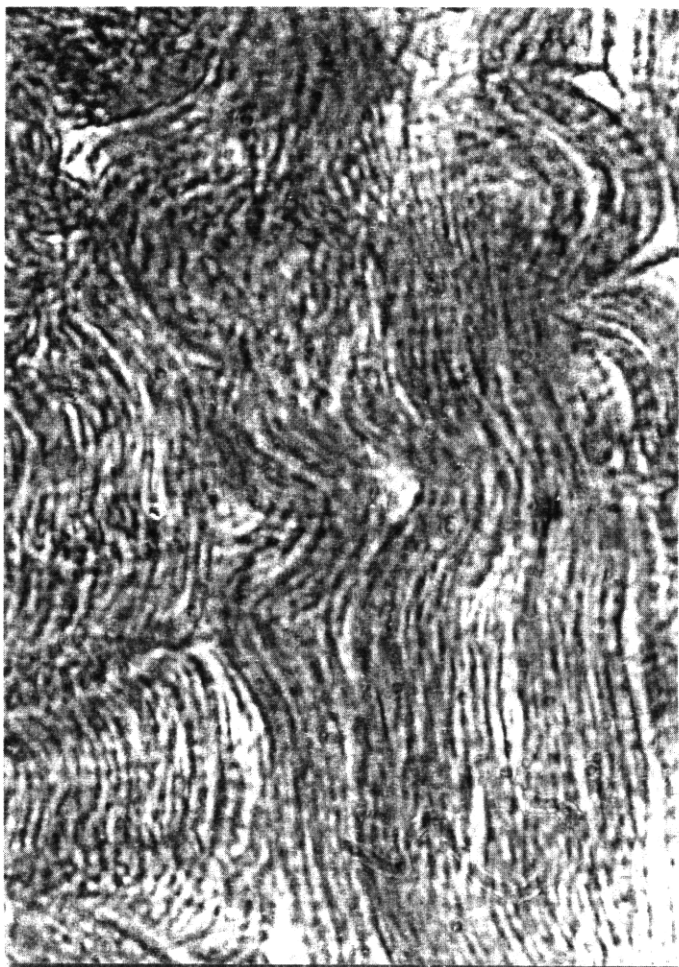
Исследованные ткани и органы	Условия проведения опыта	Содержание диеновых конъюгатов, нмоль·г ⁻¹ сырой ткани	Содержание ТБК-активных продуктов, нмоль·г ⁻¹ сырой ткани
Белые мышцы	Контроль	875,8±86,4	103,4±17,3
	Опыт	687,3±47,4	144,3±13,6
	M_{diff}	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Печень	Контроль	11565±2083	1696±700
	Опыт	12255±2053	1803±611
	M_{diff}	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Жабры	Контроль	1959±106	179,9±34,8
	Опыт	3340±275	162,2±37,9
	M_{diff}	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Плазма крови	Контроль	405,8±64,6	5,64±0,92
	Опыт	451,9±62,4	18,6±4,1
	M_{diff}	$p > 0,05$	$p > 0,05$



1. Нормальное морфофункциональное строение мышечной ткани скорпены. Увеличение 40×10 .

ной поперечной исчерченности и отсутствии липидных включений. Именно такая картина наблюдалась у контрольных рыб (рис. 1). В образцах, полученных из опытных экземпляров кефали, отмечены патологические изменения разного характера (рис. 2): исчезновение поперечной исчерченности, перегибы мышечных волокон, слабо и сильно выраженные, разрывы волокон, а также некоторое их разобщение. Эти изменения квалифицируются как слабо выраженная патология — 2 балла [1]. Вероятно, при более продолжительной гипоксии эти изменения были бы более тяжелыми.

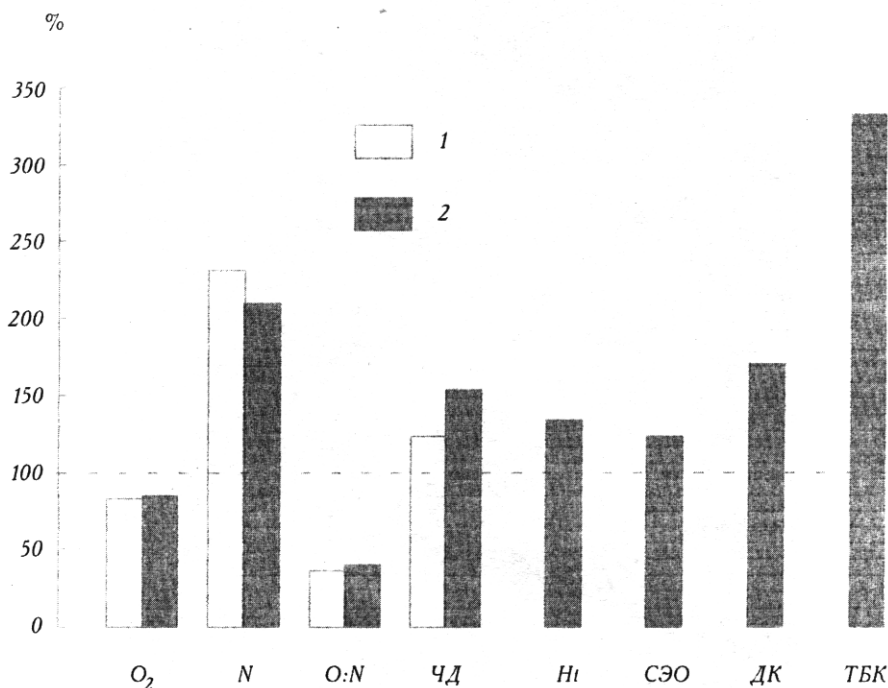
У скорпены морфофункциональные характеристики мышечной ткани в контроле и эксперименте заметно не отличались (см. рис. 1). Небольшие локальные структурные повреждения в виде незначительного перегиба мышечных волокон встречались и у контрольных, и у опытных экземпляров. Отсутствие однозначной реакции мышечной ткани скорпены на негативное воздействие гипоксии в эксперименте, по всей видимости, объясняется осо-



2. Патологические изменения в мышечной ткани кефали под влиянием гипоксии. Увеличение 40×10 .

бой устойчивостью этого вида, ведущего придонный, крайне малоподвижный образ жизни, к пониженному содержанию кислорода. Для получения заметного и стойкого эффекта продолжительность подобного эксперимента для скорпены должна быть значительно большей.

Наглядное представление о характере изменений исследованных показателей дает рисунок 3. Из него видно, что наибольшие сдвиги в исследованных параметрах происходят в системе перекисного окисления липидов (содержание диеновых конъюгатов в жабрах и ТБК-активных продуктов в плазме крови увеличивается соответственно в 1,7 и 3,3 раза) и в азотистом катаболизме (экскреция азота возрастает более чем в 2 раза). Показатели крови и дыхания изменяются в меньшей степени. Это свидетельствует, с одной стороны, о наибольшей чувствительности свободнорадикального окис-



3. Опытные показатели (% от контроля). Представлены лишь показатели, имеющие достоверные отличия от контрольных (ЧД — частота дыхания; *Ht* — гематокрит; СЭО — средний эритроцитарный объем; ДК — диеновые конъюгаты; ТБК — ТБК-активные продукты); 1 — кефаль; 2 — скорпена.

ления и азотистого (белкового) катаболизма к гипоксии, а с другой — об известных резервах системы транспорта кислорода к тканям.

Заклучение

Проведенные опыты показали, что исследованные виды рыб — кефаль-сингиль и скорпена — обладают достаточными физиологическими возможностями для длительного существования в условиях гипоксии. Этому способствует адаптация их респираторных систем к газообмену на тканевом уровне и компенсаторное увеличение роли белковых (азотистых) субстратов в энергетическом метаболизме. По-видимому, указанные функциональные особенности исследованных видов могут обеспечить им длительное существование в неблагоприятных условиях среды, повсеместно встречающихся в шельфовой зоне Черного моря в связи с усилившимся антропогенным загрязнением. Одновременно эти особенности свидетельствуют о значительных видовых потенциальных возможностях сингиля и скорпены, реализуемых в экстремальных ситуациях.

Дослідження тривалої гіпоксії у кефалі-сінгіля та скорпени Чорного моря до-
вело, що ці види мають компенсаторні механізми — систему постачання кисню
до тканин і використання білкових (азотистих) субстратів в енергетичному
метаболизмі. Це дозволяє їм тривалий час витримувати екстремальні умови.

*The study of long-term hypoxia in Black Sea golden mullet and scorpion fish sho-
wed that these species have compensatory mechanisms: system of oxygen transport to
tissue and utilization of protein (nitrogen) substrates in energy metabolism. These
mechanisms permit the fishes to exist for a long time in extremal conditions.*

1. Алтуфьев Ю.В., Романов А.А., Шевелева Н.Н. Гистопатология поперечно-
полосатой мышечной ткани и печени каспийских осетровых // Вопр. их-
тиологии. — 1992. — 32, № 2. — С. 157—171.
2. Бранг Т. Анаэробизм у беспозвоночных. — М.: Изд-во иностр. лит., 1951.
— 335 с.
3. Виноградов М.Е. Вертикальное распределение океанического зоопланк-
тона. — М.: Наука, 1968. — 319 с.
4. Виноградов М.Е. Особенности формирования нижнего максимума кон-
центрации мезопланктона в Черном море // Докл. АН СССР. — 1990. —
310, № 4. — С. 977—980.
5. Владимирова Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биоло-
гических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 252 с.
6. Галкин С.В., Москалев Л.И. Фауна гидротермалы Срединно-Атлантическо-
го хребта // Океанология. — 1990. — 30, № 5. — С. 842—847.
7. Кузнецов А.П. Еще раз о древности и путях формирования глубоководной
фауны океана // Изв. АН СССР. — 1991. — № 2. — С. 275—283.
8. Кухарев Н.Н., Ребик С.Т., Трушин Ю.К. К вопросу о трофической актив-
ности стайных пелагических и демерсальных рыб, обитающих в зоне ги-
поксии в западной части Аравийского моря // Питание морских рыб и
использование кормовой базы как элементов промыслового прогнози-
рования. — Мурманск, 1988. — С. 124—125.
9. Методы гидрохимических исследований основных биогенных элемен-
тов. — М.: ВНИРО, 1988. — 119 с.
10. Мусил Я., Новак О., Кунц К. Современная биохимия в схемах. — М.:
Мир, 1981. — 216 с.
11. Орлов С.Н., Скрябин Г.А., Котелевцев С.В., Козлов Ю.П. Рецептор- и объ-
емзависимая регуляция Na^+/K^+ насоса и ионных переносчиков в эрит-
роцитах рыбы // Биол. науки. — 1990. — № 6. — С. 27—38.
12. Ромейс Б. Микроскопическая техника. — М.: Изд-во иностр. лит., 1953.
— 718 с.
13. Столбов А.Я., Ставицкая Е.Н., Шульман Г.Е. Потребление кислорода и
экскреция азота у черноморских рыб различной экологической специа-
лизации при гипоксических режимах // Гидробиол. журн. — 1995. — 31,
№ 1. — С. 73—78.

14. Столбов А.Я., Ставицкая Е.Н., Шульман Г.Е. Особенности метаболизма черноморских креветок *Palaemon elegans* при срочной гипоксии // Докл. РАН. — 1997. — **356**, № 1. — С. 141—142.
15. Шульман Г.Е., Аболмасова Г.И., Столбов А.Я. Использование белка в энергетическом обмене гидробионтов // Успехи совр. биологии. — 1993. — **113**, № 5. — С. 576—586.
16. Юнева Т.В., Светличный Л.С., Щепкина А.М. Сравнительная характеристика липидного состава и двигательной активности диапаузирующей экогруппы *Calanus luxinus* (Copepoda) // Гидробиол. журн. — 1998. — **34**, № 1. — С. 74—85.
17. Douglas E.L., Fried W.A., Pickwell G.V. Fishes in oxygen-minimum zones: blood oxygenation characteristics // Science. — 1976. — **191**, N 4230. — P. 957—959.
18. Folch L., Ascoli J., Lees M. et al. Preparation of lipid extracts from brain tissues // J. Biol. Chem. — 1951. — **191**, N 2. — P. 833—836.
19. Fuchs A.A., Albers C. Effect of adrenaline and blood gas conditions on red blood cell volume and intra-erythrocytic electrolytes in the carp // J. Exp. Biol. — 1988. — **137**. — P. 457—477.
20. Gamenick J., Abbiati M., Giere O. Field distribution and sulphide tolerance of *Capitella capitata* (Polychaeta) around shallow water hydrothermal vents of Milos (Aegean Sea). A new sibling species? // Mar. Biol. — 1998. — **130**, N 4. — P. 447—453.
21. Jobling M. Bioenergetics. — London: Chapman and Hall, 1994. — 309 p.
22. Kim R.S., LaBella F.S. Comparison of analytical methods for monitoring auto-oxidation profiles of authentic lipids // J. Lipid Res. — 1987. — **28**. — P. 1110—1117.
23. Lane H.C., Tianang A. Effect of hypoxia and hyperoxia on rainbow trout red cells // Amer. Zool. — 1992. — **32**, N 5. — P. 170A.
24. McEnroe M., Woodhead P., Crocker C, et al. Life in the extreme environment of an upwelling system physiological attributes of fishes living in extreme hypoxia in the nutrient-rich Benguela system // 33 Europ. Mar. Biol. Symp.: Abstracts, Wilhelmshaven. — Germany, 1998. — P. 51.
25. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction // Anal. Biochem. — 1979. — **95**, N 2. — P. 351—358.
26. Tetens V., Christensen N.J. Beta-adrenergic control of blood oxygen affinity in acutely hypoxia exposed rainbow trout // J. Comp. Physiol. — 1987. — **B157**, N 5. — P. 667—675.
27. Thiermann F., Akoumianaki J., Hughes J.A., Giere O. Benthic fauna of a shallow-water gasohydrothermal vent area in the Aegean Sea // Mar. Biol. — 1997. — **128**, N 1. — P. 149—159.
28. Winston G.W., Di Giulio R.T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms // Aquat. Toxicol. — 1991. — **19**. — P. 137—161.