



УДК 597.554.3.044:597-112.81-148.11

© 2009

А. К. Гулевский, академик НАН Украины В. И. Грищенко,
Л. И. Релина, Е. А. Грищенко, Е. Г. Погожих, И. В. Сысоева,
А. А. Сысоев

Влияние фракции до 5 кДа из мозга холодоадаптированных рыб на жизнеспособность карася серебряного в условиях холодового стресса

Досліджено вплив фракції до 5 кДа з мозку холодадаптованого карася срібного *Carassius auratus* на життєздатність та енергетичні параметри у риб при холодovому стресі влітку. Показано, що експозиція при 5–6 °C влітку призводить до загибелі риб на 3-тю – 5-ту добу і до істотного зниження активності ЛДГ, а також до підвищення вмісту лактату та пірувату. Встановлено, що фракція до 5 кДа забезпечує виживаність риб під час холодової акліматизації влітку протягом 9 діб, сарияє зниженню рівня АТФ, а також нормалізації активності ЛДГ і кількості лактату та пірувату.

Сезонные перепады температуры способствовали возникновению адаптационных механизмов, позволяющих организму переживать неблагоприятные периоды. Одним из таких механизмов является состояние покоя, характерное для многих позвоночных [1–3]. В мозге животных-гибернаторов присутствует ряд низкомолекулярных веществ, отвечающих за переключение организма на другой физиологический и биохимический режим существования [4, 5]. Аналогичные соединения выделены из мозга эстивирующих рыб [6]. Это дает возможность сделать предположение об общебиологическом характере данного явления. Некоторым пресноводным рыбам также свойственно состояние летнего или зимнего покоя [7]. Так, известно, что карась способен переживать длительные периоды гипотермии, часто сопровождающиеся аноксией [8]. В связи с этим имеются основания предположить, что в организме данного вида в периоды покоя накапливаются регуляторные вещества, сходные по своему действию с пептидами из мозга гибернаторов и эстивирующих рыб.

В настоящем сообщении приведены результаты изучения влияния низкомолекулярной фракции из мозга холодадаптированного карася серебряного *Carassius auratus* L. (1758) на метаболизм и выживаемость рыб в условиях холодового стресса. Так как одним из основных показателей состояния организма является уровень энергообмена, мы определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), содержание пирувата, лактата и АТФ в белых и красных мышцах *C. auratus*.

В работе использовали рыб, выловленных зимой (январь) и летом (июль). Часть рыб, выловленных в июле, подвергали холодовой экспозиции при 5–6 °С.

Приготовление экстракта из ткани мозга осуществляли как описано в [6]. Низкомолекулярную фракцию до 5 кДа выделяли методом ультрафильтрации на мембранной модуле “Vivaflow-200” фирмы “Sartorius®” (Германия). В полученном фильтрате остаются соединения с молекулярной массой менее 5 кДа. Фильтрат высушивали в вакуумной термосушке при давлении –1 атм. и температуре 40 °С.

Навеску высушенной фракции растворяли в физиологическом растворе для холодно-кровных животных и вводили внутривенно “летним” карасям из расчета 4,5 мг фракции в 0,2 мл физиологического раствора на особь массой 30 г. После этого рыб переносили в холодильник с температурой 5–6 °С.

Активность ЛДГ в направлении пируват → лактат определяли в белых и красных мышцах как описано в [9], содержание пирувата и лактата — как описано в [10]. Количество АТФ определяли методом [11].

Полученные цифровые данные статистически обработаны с использованием критерия Манна–Уитни по программе StatgraphicWin.

Согласно полученным данным (табл. 1), активность ЛДГ в белых мышцах весьма высока и в летний и в зимний периоды, причем в белых мышцах существенно выше, чем в красных, так как энергообеспечение в белых “быстрых” мышцах осуществляется в основном за счет анаэробного окисления [12]. В красных мышцах рыб в зимний период активность ЛДГ достоверно выше, чем в летний, что свидетельствует об увеличении роли гликолиза зимой и для этого типа ткани. Это согласуется с данными работы [13] о преимущественном переключении организма рыб на анаэробный энергообмен при низкой температуре.

Таблица 1. Показатели энергетического метаболизма в тканях *C. auratus*

Показатель	Зима	Лето	Экспозиция при 5–6 °С летом	Экспозиция при 5–6 °С летом после введения фракции до 5 кДа
Белые мышцы				
Активность ЛДГ, нмоль НАДН ₂ /(мин · мг белка)	0,53 ± 0,05	0,6 ± 0,07	0,07 ± 0,01***	0,77 ± 0,07***
Содержание лактата, мкмоль/г ткани	6,80 ± 0,53	3,50 ± 0,40**	6,08 ± 0,25*	4,05 ± 0,21***
Содержание пирувата, мкмоль/г ткани	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,40 ± 0,03***	0,24 ± 0,02***
Содержание АТФ, мкг/г ткани	108,0 ± 10,2*	140,0 ± 6,6	133,0 ± 2,3**	89,0 ± 4,3***
Красные мышцы				
Активность ЛДГ, нмоль НАДН ₂ /(мин · мг белка)	0,46 ± 0,03*	0,35 ± 0,05	0,07 ± 0,01***	0,41 ± 0,03***
Содержание лактата, мкмоль/г ткани	8,60 ± 0,36	2,80 ± 0,30**	4,97 ± 0,29***	4,88 ± 0,52***
Содержание пирувата, мкмоль/г ткани	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,20 ± 0,01***
Содержание АТФ, мкг/г ткани	101,3 ± 4,3	103,3 ± 1,2	100,3 ± 4,2	69,7 ± 4,2***

* Достоверные отличия по сравнению с летом. ** Достоверные отличия по сравнению с зимой. *** Достоверные отличия по сравнению с 3-суточной холодовой экспозицией летом; $p < 0,05$, $n = 10$.

Следует отметить, что при попытке помещения рыб в холодовую камеру летом при температуре 5–6 °С все караси гибли в течение 3–5 сут. Активность ЛДГ, измеренная на 3-ьи сутки холодовой экспозиции “летних” рыб, оказалась чрезвычайно низкой в обоих типах мышц: в белых мышцах — всего лишь 11,7 и 13,2%, в красных — 20,0 и 15,2% по отношению к “летним” и “зимним” значениям соответственно. Чрезвычайно резкое падение активности ЛДГ в мышцах в этих условиях нам представляется особенно важным. Данное обстоятельство свидетельствует о серьезных нарушениях регуляции производства энергии в метаболических путях, что может быть одной из причин гибели рыб в условиях холодового стресса.

Введение низкомолекулярной фракции из мозга “зимних” карасей кардинально изменяет наблюдаемую картину. Все “летние” рыбы, которым была произведена внутривентральной инъекция фракции, остались живы на 9-е сутки холодовой акклимации. Это позволяет предположить, что в полученной фракции присутствуют вещества, способные включать механизмы адаптации к зиме у рыб в середине лета.

Активность ЛДГ на 9-е сутки холодовой акклимации рыб, которым была введена низкомолекулярная фракция, в белых мышцах резко возрастает (см. табл. 1). Она достоверно выше не только по сравнению с величиной активности у “летних” рыб после 3-суточной акклимации, но и по сравнению с таковой у “зимних” рыб. Однако в красных мышцах при введении данной фракции активность ЛДГ просто выходит на уровень, свойственный карасям в зимний период.

Нам не удалось обнаружить сезонных колебаний содержания пирувата ни в белых, ни в красных мышцах (см. табл. 1). Однако резкое снижение активности ЛДГ в белых мышцах после 3-суточной холодовой экспозиции карасей летом сопровождается значительным накоплением пирувата. Это согласуется с резким падением активности ЛДГ, для которой пируват является субстратом, в этих условиях. В красных мышцах через 3 сут холодовой акклимации содержание пирувата не изменяется. При введении низкомолекулярной фракции содержание пирувата в белых мышцах снижается по сравнению с таковым у “летних” рыб после 3-суточной холодовой экспозиции, хотя и не достигает уровня нормы, свойственного “летним” и “зимним” карасям (см. табл. 1). В красных мышцах содержание пирувата превышает его уровень, характерный для этой ткани летом и зимой.

Содержание лактата летом существенно снижается в обоих типах мышц по сравнению с зимним периодом (см. табл. 1). После 3-суточной холодовой экспозиции уровень лактата в мышцах резко возрастает, несмотря на падение активности ЛДГ, которая его нарабатывает, и относительно высокую активность ЛДГ в направлении лактат → пируват ($(6,19 \pm 0,17)$ и $(7,40 \pm 0,19)$ нмоль пирувата/(мин · мг белка) для белых и красных мышц соответственно) [14]. Введение фракции до 5 кДа из мозга “зимних” рыб перед холодовой экспозицией летом обуславливает снижение уровня лактата в белых мышцах, но не в красных по сравнению с 3-суточной холодовой экспозицией.

Количество АТФ в белых мышцах зимой ниже по сравнению с летним периодом (см. табл. 1). В то же время в красных мышцах в зимний и летний периоды количество АТФ не отличается. 3-суточная холодовая экспозиция не оказывает влияния на содержание АТФ ни в белых, ни в красных мышцах, а введение фракции до 5 кДа из мозга “зимних” рыб перед холодовой экспозицией летом приводит к резкому падению количества АТФ в белых мышцах и к менее резкому, но все же достоверному снижению уровня АТФ в красных мышцах (см. табл. 1). Известно, что гибель рыб при резком перепаде температуры летом сопровождается серьезными нарушениями ионного баланса [13]. Можно предполо-

жить, что пониженное количество АТФ в мышцах рыб при 5–6 °С после введения фракции обусловлено ее расходом ионными насосами для поддержания осмотического равновесия.

Полученные данные дают возможность сделать следующие выводы. Особи *C. auratus* не способны быстро акклиматизироваться к низкой температуре в летний период. При этом у них резко изменяются отдельные показатели энергообмена: снижается активность ЛДГ и возрастает количество лактата в обоих типах мышц, повышается содержание пирувата в белых мышцах. Низкомолекулярная фракция, полученная из мозга зимних особей *C. auratus*, способна обеспечить выживаемость летних рыб при холодовой акклиматизации. Введение фракции приводит к снижению уровня АТФ, а также способствует нормализации активности ЛДГ и содержания пирувата и лактата. Приведенные в работе результаты дают несколько направлений для дальнейших исследований: необходимо более комплексно изучить состояние энергообмена у *C. auratus* при указанных воздействиях и оценить специфичность, в том числе и видоспецифичность, действия полученной фракции.

1. Boyer B. B., Barnes B. M. Molecular and metabolic aspects of mammalian hibernation // Biol. Science. – 1999. – 49. – P. 713–724.
2. Storey K. B. Functional metabolism: regulation and adaptation. – Hoboken: Wiley-Liss, 2004. – 616 p.
3. Mesquita-Saad L. S., Leitzo M. A., Paula-Silva M. N. et al. Specialized metabolism and biochemical suppression during aestivation of the extant South American lungfish – *Lepidosiren paradoxa* // Braz. J. Biol. – 2002. – 62, No 3. – P. 495–501.
4. Иваницкий Д. А., Колаева С. Г., Пастухов Ю. Ф. и др. Эффект выраженного снижения метаболизма у теплокровных эндогенными веществами из тканей зимоспящих в состоянии спячки // Докл. АН СССР. – 1982. – 267, № 2. – С. 978–990.
5. Swan H., Schatte C. Anti-metabolic extract from the brain of hibernating ground squirrel *Citellus tridecemlineatus* // Science. – 1977. – 195. – P. 84–85.
6. Swan H., Jenkins D., Knox K. Anti-metabolic extract from the brain of *Protopterus aethiopicus* // Nature. – 1968. – 217. – P. 671–673.
7. Никольский Г. В. Экология рыб. – Москва: Высш. шк., 1974. – 327 с.
8. Krumschnabel G., Schwarzbach P. J., Lisch J. et al. Oxygen-dependent energetics of anoxia-tolerant and anoxia-intolerant hepatocytes // J. Exp. Biol. – 2000. – 5, No 203. – P. 951–959.
9. Асатиани В. С. Ферментативные методы анализа. – Москва: Наука, 1969. – 739 с.
10. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): Учеб. пособие / Под ред. М. И. Прохоровой. – Ленинград, 1982. – 272 с.
11. Jaworek D., Gruber W., Bergmeyer H. U. Adenosine-5-diphosphate and Adenosine-5-monophosphate // Methods of Enzymatic Analysis / Ed. H. U. Bergmeyer. – New York etc.: Weinheim and Academic Press, 1974. – Vol. 4. – P. 2127.
12. Лав М. Р. Химическая биология рыб. – Москва: Пищ. пром-сть, 1976. – 349 с.
13. Романенко В. Д., Арсан О. М., Соломатина В. Д. Механизмы температурной акклимации рыб. – Киев: Наук. думка, 1991. – 192 с.
14. Гулевский А. К., Релина Л. И., Жегунова Е. Г. и др. Роль гликолиза при холодовой адаптации карася серебряного *Carassius auratus gibelio* // Пробл. криобиологии. – 2007. – 17, № 1. – С. 64–70.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, Харьков
Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского НАН Украины,
Севастополь

Поступило в редакцию 13.04.2009

A. K. Gulevsky, Academician of the NAS of Ukraine V. I. Grischenko, L. I. Relina,
Ye. A. Grischenkova, Ye. G. Pogozhikh, I. V. Sysoyeva, A. A. Sysoyev

Influence of fraction less than 5 kD from brain of cold-adapted fish on viability of the goldfish under cold stress conditions

*The data on the influence of the fraction less than 5 kD from brain of the cold-adapted goldfish *Carassius auratus* upon viability and energetic indices in the fish during cold stress in summer are presented. Exposure at 5–6 °C in summer resulted in death of the fish on the 3rd–5th day and in a significant drop in the LDH activity, as well as in an increase in lactate and pyruvate contents. It has been shown that the fraction less than 5 kD provided the survival of the fish during the cold acclimation in summer up to 9 days and promoted a reduction in the ATP level, as well as changes in the LDH activity and lactate and pyruvate quantities towards the normalization of these parameters.*