



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. Грищенкова, 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 холодоадаптованого карася срібного *Carassius auratus* на життєздатність та енергетичні параметри у риб при холодовому стресі влітку. Показано, що експозиція при 5–6 °С 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 аклімації влітку протягом 9 діб, сприяє 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 холодоадаптированного 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 холоднокровных 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-тй 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 внутривбрюшинная 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 акклимироваться 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 акклимации. 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., Leitgo 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. Иванюк 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., Schwarzbaum 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.*