

# КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

УДК 591.111:556.113:597.2/5

## СВЯЗЫВАНИЕ КИСЛОРОДА КРОВЬЮ МОРСКИХ РЫБ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

А. А. СОЛДАТОВ<sup>1</sup>, И. А. ПАРФЕНОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь;  
e-mail: alekssoldatov@yandex.ru;

<sup>2</sup>Севастопольский национальный технический университет, Украина;

Исследовано влияние температуры в диапазоне от 1 до 15 °С на способность гемоглобина связывать кислород в крови теплолюбивых — кефаль-сингиль (*Liza aurata*), хамса (*Engraulis encrasicolus*) и холодолюбивых — тюлька (*Clupeonella cultriventris*) видов рыб. При температуре воды ниже 10 °С тепловая зависимость реакции оксигенации крови у теплолюбивых рыб значительно повышается, о чем свидетельствуют высокие значения ДН. Это сопровождается увеличением сродства гемоглобина цельной крови к кислороду и осложняет процесс ее деоксигенации на тканевом уровне. Данная реакция, по-видимому, определяется изменением характера взаимодействия гемоглобина с внутриэритроцитарной средой. В условиях длительного содержания рыб при 5 °С в эритроцитах наблюдается увеличение концентрации нуклеотидтрифосфатов (НТФ), что частично компенсирует негативные изменения сродства гемоглобина крови к кислороду (величина показателя  $P_{50}$  повышается). Однако при более низких температурах (1–2 °С) эта реакция не наблюдается.

**Ключевые слова:** гипотермия, гемоглобин, сродство к кислороду, эритроциты, нуклеотидтрифосфаты, морские рыбы.

Состояние асфиксии, возникающее у водных пойкилотермов в условиях внешней гипотермии при температуре 6–7 °С, описано в работах [1, 2]. Это состояние в определенной степени парадоксально, так как развивается при снижении потребности организма в кислороде и повышении растворимости кислорода в воде, тканевых и циркуляционных средах. Известно, что гипотермия вызывает усиление анаэробных процессов в тканевых структурах. Так, у ряда морских рыб наблюдали повышение содержания лактата при одновременном снижении уровня метаболитов цикла Кребса, на фоне уменьшения суммы адениловых нуклеотидов и энергетического заряда клетки [3, 4].

Особый интерес представляет индукция образования HIF-1 (hypoxia inducible factor) при низких температурах [5]. Сравнительно недавно этот фактор был идентифицирован в плазме крови форели [6]. Установлено, что HIF-1, наряду с другими локусами генома, экспрессируется гипоксией [7, 8]. Это означает, что гипотермия должна изменять кислородный режим тканей.

Исследования, выполненные нами ранее на кефали-сингиле, подтверждают данное предположение [9]. Показано, что при температуре ниже 5 °С напряжение кислорода ( $PO_2$ ) в скелетных мышцах и венозной крови понижается, а содержание анаэробных метаболитов растет. При этом артериальное  $PO_2$  остается в пределах нормы. Это означает, что развитие состояния гипоксии не связано с внешним дефицитом кислорода и функциональной депрессией респираторных систем. Ухудшение кислородного режима тканей, скорее всего, связано с молекулярными системами транспорта и утилизацией кислорода. Этим аспектам проблемы и посвящена настоящая работа.

### Материалы и методы

В работе использовали особей: кефали-сингиль (*Liza aurata*, масса тела — 52–74 г), хамсы (*Engraulis encrasicolus*, масса тела — 8,3–13,1 г) и тюльки (*Clupeonella cultriventris*, масса тела 7,0–9,0 г). Первые два вида толерантны к высокой температуре, последний — к низкой.

Контрольную группу кефали содержали при температуре воды  $15 \pm 1$  °С. В ходе опы-

та температуру снижали со скоростью  $0,2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$  от  $15$  до  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , оставляя в процессе снижения группы особей при  $10 \pm 1^{\circ}$ ,  $5 \pm 1^{\circ}$  и  $1 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . После этого исследовали адаптацию к указанным температурам в течение 40 сут. Регистрацию показателей и отбор проб крови проводили на 1–5-, 14–15- и 41–46-е сутки.

Контрольные группы рыб тюльки и хамсы содержали при  $15 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а опытные – при  $5 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Длительность экспозиции была 15 сут.

Пробы крови получали пункцией сердца в шприц под слой вазелинового масла. Стенки шприца предварительно ополаскивали раствором  $0,9\%$  NaCl, содержащим  $10\text{ U мл}^{-1}$  гепарина (Richter, Венгрия). В момент отбора проб и регистрации показателей применяли уретановую анестезию [10].

Для получения гемолизатов плазму отделяли от форменных элементов посредством центрифугирования ( $750\text{ g}$ , 30 мин, центрифуга MPW-310, Польша). Эритроциты трижды отмывали от плазмы в изотонических растворах глюкозы. Полученную эритроцитарную массу лизировали двумя объемами охлажденного бидистиллята. Мембраны эритроцитов осаждали при  $9000\text{ g}$  в течение 30 мин. Гемолизат использовали для построения кривых диссоциации и определения концентрации нуклеотидтрифосфатов (НТФ) и  $\text{Cl}^{-}$ .

Кривые кислородного насыщения для цельной крови и гемолизатов строили при помощи спектрофотометрического метода с использованием кювет-десатураторов [11]. Спектрофотометрические кюветы имели толщину  $10\text{ мм}$ , объем сатуратора –  $50\text{ мл}$ , измерения выполняли при  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . При работе с гемолизатами использовали  $20\text{ мМ}$  фосфатный буфер (pH 7,8). Величину pH крови и гемолизатов контролировали при помощи pH-метра (ELWRO N 5123, Польша). Величину  $P_{50}$  рассчитывали по кривым кислородного насыщения. Тепловой эффект реакции оксигенации ( $\Delta H$ ) оценивали по уравнению Вант-Гоффа.

Концентрацию НТФ в эритроцитах определяли при помощи неэнзиматического метода Сейца [12], а уровень  $\text{Cl}^{-}$  измеряли на спектрофотометре с применением набора реактивов (Lacheme, Чехия).

Результаты представлены в виде  $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ . Достоверность полученных результатов оценивали при помощи  $t$ -критерия Стьюдента [13]. Объем выборочных совокупностей ( $n$ ) составлял 5–8 особей.

## Результаты и обсуждение

Показано, что при снижении температуры воды от  $15$  до  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  величина показателя  $P_{50}$  уменьшается на  $4,3\text{ гПа}$  (рис. 1). Одновременно происходит увеличение pH артериальной крови на  $0,13$  единиц и концентрация  $\text{Cl}^{-}$  в эритроцитах снижается на  $30,5\text{ ммоль л}^{-1}$  (рис. 2). Содержание НТФ в красных клетках крови при этом остается на уровне контроля (рис. 1).

В течение первых пяти суток содержания рыб при  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  значительно увеличивается сродство гемоглобина крови к кислороду. Величина показателя  $P_{50}$  снижается на  $14,9\text{ гПа}$  (рис. 1) по сравнению с контролем. Теплота оксигенации, рассчитанная для интервала температур  $5\text{--}10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , равняется  $-5,36\text{ ккал моль}^{-1}\text{ O}_2$ , а для интервала  $10\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$  –  $-1,24\text{ ккал моль}^{-1}\text{ O}_2$ . Параллельно снижается концентрация  $\text{Cl}^{-}$  в эритроцитах, а значение pH артериальной крови остается таким же как и при  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (рис. 2).

Дальнейшее ( $36\text{--}41$  сут) содержание кефали при  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  приводит к частичной компенсации отмеченных выше изменений. Сродство гемоглобина крови к кислороду уменьшается, о чем свидетельствует увеличение  $P_{50}$  на  $6,5\text{ гПа}$ . Одновременно растет концентрация НТФ (на  $1,7\text{ мкмоль г}^{-1}\cdot\text{Hb}$ ) в красных клетках крови (рис. 1). Тогда как концентрация  $\text{Cl}^{-}$  в эритроцитах и значение pH артериальной крови остаются на уровне значений, зарегистрированных в первые пять суток адаптации при температуре  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Изменение характера связывания кислорода кровью, отмеченные у кефали при  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $1\text{--}5$ -е сут), еще более усиливаются при адаптации к температуре  $1\text{--}2\text{ }^{\circ}\text{C}$ : величина  $P_{50}$  составляет  $11,3 \pm 0,5\text{ гПа}$ , что на  $19,4\text{ гПа}$  ниже контрольного уровня и на  $4,5\text{ гПа}$  ниже значений, полученных при  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . При температуре  $1\text{--}2\text{ }^{\circ}\text{C}$  также наблюдается снижение концентрации  $\text{Cl}^{-}$  в эритроцитах и увеличение значений pH артериальной крови (рис. 2). Однако отсутствуют компенсационные реакции при адаптации к данной температуре. Значения  $P_{50}$  не изменяются, а внутриклеточная концентрация НТФ остается на уровне контрольных величин (рис. 1).

Для уточнения процессов, определяющих влияние низкой температуры на связывание кислорода гемоглобином крови рыб были выполнены исследования на теплолюбивой хамсе и холодолюбивой тюлке. Показано, что величина  $P_{50}$  у хамсы при снижении температуры воды в диапазоне от  $5$  до  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  уменьшается на

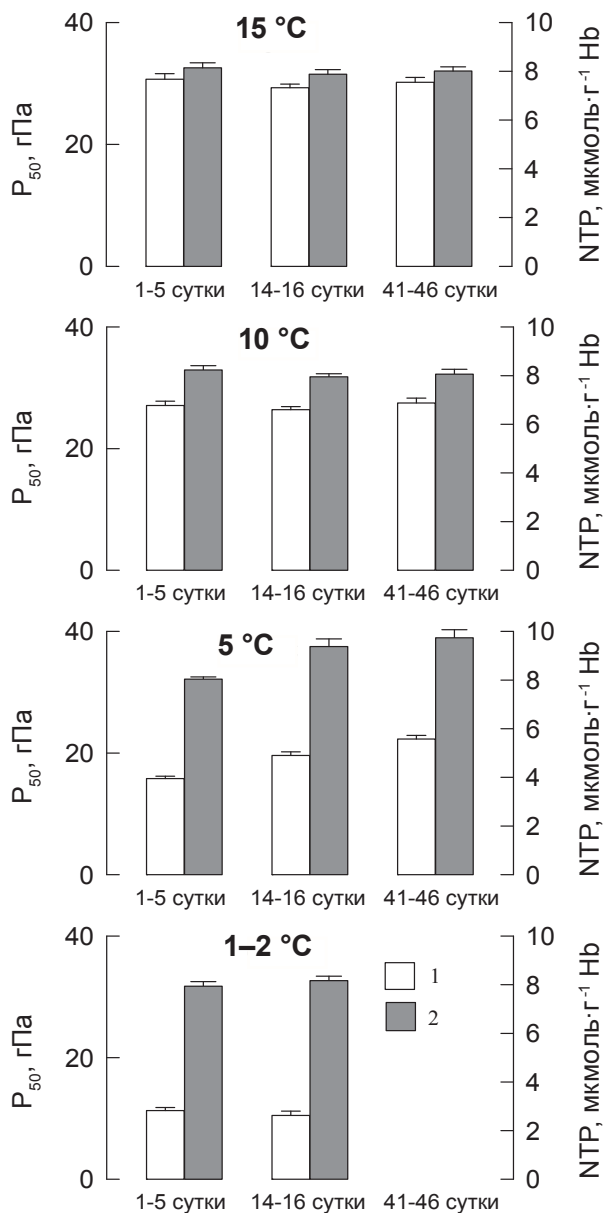


Рис. 1. Сродство гемоглобина цельной крови кефали к кислороду (1) и содержание NTP в эритроцитах (2) при экспериментальной гипотермии ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ,  $n = 6-8$ ,  $P < 0,001$ )

49,2% ( $P < 0,001$ ), тогда как у тюльки – только на 27,1% ( $P < 0,001$ ) (табл. 1). Теплота оксигенации по уравнению Вант-Гоффа у хамсы в 2,1 раза выше, что отражает высокую чувствительность гемоглобина крови данного вида рыб к низким температурам.

В табл. 2 представлены результаты экспериментов *in vitro* по определению сродства гемоглобина цельной крови и гемолизата к кислороду у хамсы. Как видно, снижение

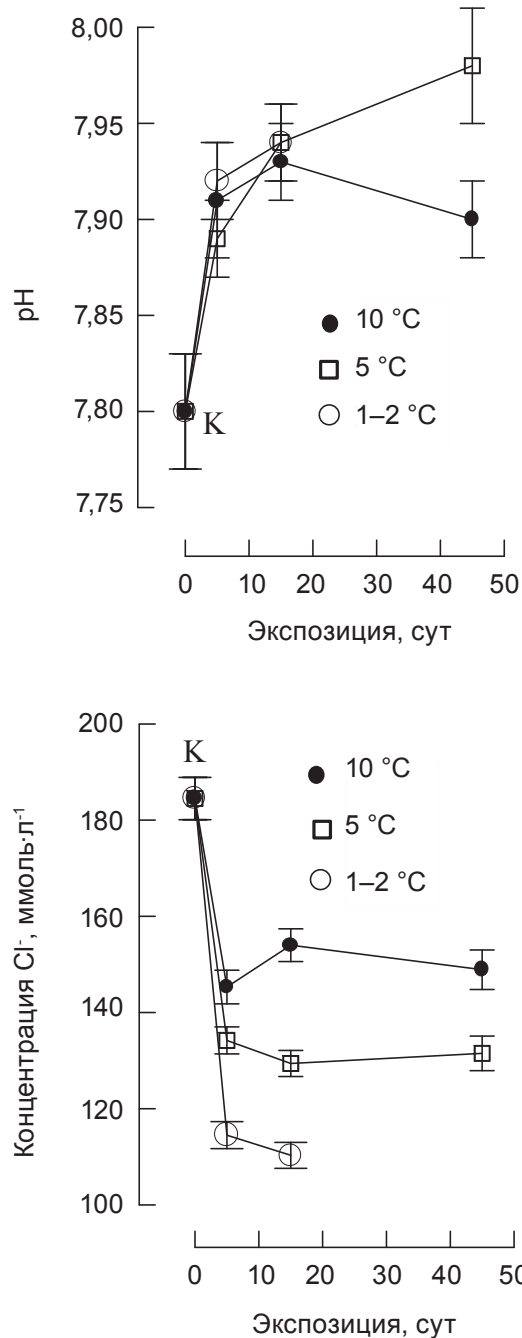


Рис. 2. Величина pH артериальной крови и концентрация Ct в эритроцитах кефали при экспериментальной гипотермии (К – контроль при 15 °C;  $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ,  $n = 6-8$ ,  $P < 0,001$ )

температуры в большей степени отражается на значениях  $P_{50}$  цельной крови, чем гемолизата. Разница по  $P_{50}$  в первом случае составляет 40,5% ( $P < 0,001$ ), а во втором – только 27,1% ( $P < 0,05$ ). Это означает, что высокая чувствительность гемоглобина крови хамсы к

Таблиця 1. Сродство гемоглобина крови к кислороду у хамсы и тюльки при температуре воды 5 и 15 °С

Виды рыб	$P_{50}$ , гПа		$\Delta H$ , ккал моль <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>
	15 °С	5 °С	
Хамса	31,9 ± 1,0 (6)	16,2 ± 1,7 (5)	-10,1
Тюлька	28,4 ± 1,1 (5)	20,7 ± 1,2 (5)	-4,7

Примечание: в скобках указано число особей

Таблиця 2. Сродство гемоглобина цельной крови и гемолизата к кислороду у хамсы в условиях *in vitro* при температуре 5 и 15 °С

Температура инкубационной среды	$P_{50}$ , гПа	
	Кровь	Гемолизат
15 °С	30,4 ± 1,1 (5)	21,0 ± 1,5 (5)
5 °С	18,1 ± 1,8 (5)	15,3 ± 0,8 (5)

Примечание: в скобках указано число проб

температуре в большей степени определяется внутриэритроцитарным микроокружением, чем свойствами самого гемоглобина.

Взаимодействие гемоглобина с кислородом представляет собой экзотермический процесс. Поэтому снижение температуры должно способствовать образованию оксигемоглобинового комплекса. Однако, как следует из результатов экспериментов, эта зависимость проявляется непропорционально. Сродство гемоглобина крови к кислороду у теплолюбивых рыб при температуре воды в диапазонах 1–5° и 5–10 °С, изменяется в большей степени, чем при 10–15 °С, а тепловой эффект реакции оксигенации в 4,3 раза выше. У холодолюбивых рыб подобная закономерность не наблюдается.

Известно, что кровь, обладающая высоким сродством к кислороду, затрудняет «разрядку» оксигемоглобина на тканевом уровне. Как следствие, это приводит к уменьшению  $P_{O_2}$  в тканях, венозной крови, увеличивает артериовенозный градиент по  $P_{O_2}$  и сопровождается развитием тканевой гипоксии, что показано нами ранее [9].

Как уже отмечалось, в организме кефали при 5 °С в течение 46 сут развиваются компенсационные процессы. Сродство крови к кислороду частично восстанавливается (снижается). При более низких температурах эти процессы не выражены. Коррекция кислородосвязывающих свойств крови происходит на фоне увеличения концентрации НТР в красных клетках крови. Концентрация Cl<sup>-</sup> в эритроцитах и рН крови не претерпевают существенных измене-

ний. Известно, что изменение концентрации НТР в эритроцитах рыб является основным фактором, регулирующим связывание кислорода гемоглобином [14, 15]. Увеличение концентрации НТР в эритроцитах снижает сродство гемоглобина крови к кислороду. Ранее было установлено, что кровь кефали-сингиля, обладающая низким сродством к кислороду, облегчает его отдачу на тканевом уровне и способствует нормализации кислородного режима тканей [9].

Эксперименты, выполненные *in vitro* на гемолизатах и цельной крови хамсы, показали, что высокая чувствительность гемоглобина теплолюбивых рыб к низким температурам скорее связана с изменением характера взаимодействия между гемоглобином и внутриэритроцитарным микроокружением, чем со свойствами самого гемоглобина.

Известно, что при снижении температуры значение рН в жидких средах повышается, что отражает зависимость диссоциации водных растворов от температуры [16]. Однако в течение 5–15 сут эксперимента эта закономерность не проявлялась. Величина рН при 5° и 1–2 °С совпадает со значениями, отмеченными при 10 °С. Это свидетельствует о поступлении в плазму крови кислых компонентов. Такая ситуация возможна, если принять во внимание развитие состояния тканевой гипоксии, отмеченное у теплолюбивых рыб при низких температурах [9]. В результате в тканях повышается содержание лактата, который может поступать в циркуляционные среды, вызывая понижение

величины рН [3, 4, 9]. Одновременно происходит усиление трансмембранного обмена  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  у эритроцитов, которое индуцируется катехоламинами в условиях гипоксии [17,18]. Выход  $\text{H}^+$ , за пределы эритроцитов способствует не только развитию ацидоза плазмы, но и росту сродства гемоглобина крови к кислороду в соответствии с прямым эффектом Бора.

Одним из эффектов, показанным в работе, является относительно равномерный рост содержания в эритроцитах  $\text{Cl}^-$ . Данный анион вовлечен в сеть электростатических взаимодействий Val $\alpha$ 1(NA1) с Arg $\alpha$ 141(HC3), которые определяют около 20% эффекта Бора [19, 20]. В окислительном состоянии связь нарушается,  $\text{Cl}^-$  диссоциирует, рК снижается на 0,5 единиц. Отсюда следует, что снижение содержания  $\text{Cl}^-$  в красных клетках крови способствует увеличению сродства гемоглобина к кислороду.

Полученные результаты показали, что изменение внутриэритроцитарного окружения теплолюбивых рыб приводит к увеличению сродства гемоглобина к кислороду. Это, в свою очередь, должно было бы усиливать тепловой эффект реакции оксигенации, однако при работе с гемолизатами это не было обнаружено. Следовательно повышенная чувствительность крови теплолюбивых рыб к гипотермии как уже отмечалось не определяется свойствами самого гемоглобина. Компенсационный рост содержания НТР в эритроцитах при 5 °С снимает негативный эффект, что еще раз доказывает роль внутриэритроцитарной среды в адаптации теплолюбивых рыб к низким температурам.

Таким образом, при температуре воды ниже 10 °С тепловая зависимость реакции оксигенации крови у теплолюбивых рыб повышается. Это сопровождается значительным увеличением сродства гемоглобина цельной крови к кислороду и осложняет процесс ее деоксигенации на тканевом уровне. В условиях длительного содержания рыб при 5 °С в их

эритроцитах происходит увеличение концентрации НТР, что компенсирует негативные изменения сродства гемоглобина крови к кислороду. Однако при более низких температурах (1–2 °С) эта реакция полностью подавляется.

### ЗВ'ЯЗУВАННЯ КИСНЮ КРОВ'Ю МОРСЬКИХ РИБ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІПОТЕРМІЇ

О. О. Солдатов<sup>1</sup>, І. О. Парфьонова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут біології південних морів ім.  
О. О. Ковалевського НАН України, Севастополь;  
e-mail: alekssoldatov@yandex.ru;

<sup>2</sup>Севастопольський національний  
технічний університет, Україна

Досліджено вплив температури в діапазоні від 1 до 15 °С на властивості гемоглобіну зв'язувати кисень у крові теплолюбних – кефаль-сингиль (*Liza aurata*), хамса (*Engraulis encrasicolus*), і холодолюбивих – тюлька (*Clupeonella cultriventris*) видів риб. У разі температури води нижче 10 °С теплова залежність реакції оксигенації крові теплолюбних риб надмірно підвищується, про що свідчать високі значення  $\Delta\text{H}$ . Це супроводжується значним збільшенням спорідненості цільної крові до кисню й ускладнює процес її деоксигенації на тканинному рівні. Ця реакція, очевидно, визначається зміною характеру взаємодії гемоглобіну з еритроцитарним середовищем. В умовах тривалого утримання особин при 5 °С в еритроцитах спостерігається збільшення концентрації НТР, що частково компенсує негативні зміни спорідненості крові до кисню (величина показника  $P_{50}$  підвищується). Однак за нижчих температур (1–2 °С) ця реакція відсутня.

**Ключові слова:** гіпотермія, гемоглобін, спорідненість до кисню, еритроцити, нуклеотидтрифосфати, морські риби.



## OXYGEN BINDING BY MARINE FISH BLOOD UNDER HYPOTHERMIC EXPERIMENTAL CONDITIONS

A. A. Soldatov<sup>1</sup>, I. A. Parfyonova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology of Southern Seas, National Academy of Science of Ukraine, Sevastopol;  
e-mail: alekssoldatov@yandex.ru;

<sup>2</sup>Sevastopol National Technical University, Ukraine

### Summary

Influence of temperature in the range of 1-15 °C on oxygen binding properties of blood of thermophilic – golden mullet (*Liza aurata*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*), and cold-tolerant – sardelle (*Clupeonella cultriventris*) fishes has been investigated under experimental conditions. Heat dependence of oxygenation reaction in thermophilic fish blood at temperature below 10 °C considerably increases, which is evidenced by high  $\Delta H$  values. That is accompanied by a substantial increase of blood oxygen affinity and complicates blood deoxygenation at the tissue level. This reaction is apparently determined by the change of hemoglobin interaction with intraerythrocyte medium. The concentration of NTP in erythrocytes increases, that partially compensates negative changes of blood oxygen affinity (parameter  $P_{50}$  is raised) under long-term maintenance of fishes at 5 °C. However this reaction is not observed at low temperatures (1-2 °C).

**Key words:** hypothermia, hemoglobin, oxygen affinity, erythrocyte, nucleotide triphosphate, marine fishes.

- Куликова Н. И., Шекк П. В., Руденко В. И. // *Вопр. ихтиологии.* – 1986. – **26**, Вып. 1. – С. 119–128.
- Шекк П. В., Куликова Н. И., Руденко В. И. // *Там же.* – 1990. – **30**, Вып. 1. – С. 94–106.
- Арсан О. М. // *Гидробиол. журн.* – 1986. – **22**, № 3. – С. 57–62.
- Гулевский А. К., Релина Л. И., Жегунова Е. Г. и др. // *Пробл. криобиологии.* – 2007. – **17**, № 1. – С. 64–70.
- Heise K., Puntarulo S., Nikinmaa M. et al. // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* – 2006. – **143**, N 4. – P. 494–503.
- Soitamo A. J., Raabergh C. M. I., Gassmann M. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, N 23. – P. 19699–19705.
- Bosworth C. A., Chou C. W., Cole R. B., Rees B. B. // *Proteomics.* – 2005. – **5**, N 5. – P. 1362–1371.
- Ju Z., Wells M. C., Heater S. J., Walter R. B. // *Comp. Biochem. Physiol. C.* – 2007. – **145**, N 1. – P. 134–144.
- Солдатов А. А., Парфенова И. А. // *Пробл. криобиологии.* – 2009. – **19**, № 3. – С. 290–300.
- Солдатов А. А. // *Гидробиол. журн.* – 2003. – **39**, № 1. – С. 51–63.
- Крикливый И. А., Рекун Г. М., Артюх В. П., Стародуб Н. Ф. / *Методы молекулярной биологии.* – К.: *Наук. думка*, 1979. – С. 191–201.
- Терехов Н. Т., Петров М. М. *Применение консервированных эритроцитов.* – Киев: *Здоровье*, 1983. – 141 с.
- Ребров О. Ю. *Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTIKA.* – М.: *Медиа Сфера*, 2002. – 305 с.
- Kono M., Hashimoto K. // *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* – 1977. – **43**, N 11. – P. 1307–1312.
- Val A. L. // *Special adapt. trop. fish* Nelson (MacKinley D., ed.). – 1999. – P. 17–27.
- Шмидт-Ниельсен К. *Физиология животных (приспособление и среда).* – **1**. – М.: *Мир*, 1982. – 416 с.
- Perry S. F., Thomas S. // *J. Comp. Physiol.* – 1991. – **161B**. – P. 489–497.
- Baldisserotto V., Chippari-Games A. R., Lopes N. P. et al. // *Brazil. J. Biol.* – 2008. – **68**, N 3. – P. 336–345.
- Fago A., Bendixen E., Malte H., Weber R. E. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**, N 25. – P. 15628–15635.
- Mylvaganam S. E., Bonaventura C., Bonaventura J., Getzoff E. D. // *Nat. Struct. Biol.* – 1996. – **3**, N 3. – P. 275–283.

Получено 27.01.2011