

УДК 576.34:612.22:597.2/5

СОДЕРЖАНИЕ ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ И АТФ В ЭРИТРОЦИТАХ МОРСКИХ РЫБ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

А. А. СОЛДАТОВ¹, И. А. ПАРФЕНОВА², В. Н. НОВИЦКАЯ¹

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

²Севастопольский национальный технический университет, Украина

В условиях эксперимента исследовали влияние гипоксии на сопряжение мембранных и метаболических функций в ядерных эритроцитах рыб (кефали-сингиля, скорпены), обладающих различной толерантностью к дефициту кислорода. Показано, что устойчивая к гипоксии скорпена сохраняет в эритроцитах трансмембранные градиенты K^+ и Na^+ и высокую внутриклеточную концентрацию АТФ при 15%-м насыщении воды кислородом. Это происходит на фоне снижения активности Na^+, K^+ -АТФ-азы и гексокиназы. У чувствительной к гипоксии кефали-сингиля реакция противоположна. При сохранении высокой активности Na^+, K^+ -АТФ-азы и гексокиназы наблюдается снижение ионных градиентов и концентрации АТФ в клетках красной крови. Обсуждаются причины выявленных отличий.

Ключевые слова: гипоксия, Na^+, K^+ -АТФ-аза, гексокиназа, трансмембранные градиенты K^+ и Na^+ , АТФ, ядерные эритроциты, морские рыбы.

Зоны экстремальной гипоксии широко представлены в Мировом океане [1, 2]. Концентрация кислорода в них обычно не превышает $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Гидробионты, населяющие эти акватории, имеют особенности в организации тканевого метаболизма. У них обнаружен нескомпенсированный тип стехиометрии цитохромов дыхательной цепи митохондрий [3, 4]. Энзимные системы цикла Кребса могут быть задействованы в анаэробных процессах генерации энергии и позволяют получать дополнительный ресурс макроэргов (АТФ, GTP) без накопления токсичных метаболитов [5, 6]. В тканях повышается содержание соединений не свойственных аэробному обмену (аланин, сукцинат) [6], усиливается продукция NH_4^+ [7, 8], увеличивается активность аланин-аспаратаминотрансфераз, контролирующих сукцинаттиокиназную и фумаратредуктазную реакции [9], активизируются процессы переаминирования аминокислот (глутамата, аланина) [10].

Однако реакции клеточных систем изучены недостаточно. Удобным объектом для этого являются ядерные эритроциты низших позвоночных. У них обнаружены митохондрии, энзимы цикла Кребса [11, 12], что делает их функционально ближе к клеткам соматических тканей.

В настоящей работе рассматривается влияние *in vivo* гипоксических условий на сопряже-

ние мембранных и метаболических процессов в ядерных эритроцитах морских рыб, обладающих различной толерантностью к дефициту кислорода.

Материалы и методы

В работе использовали особей кефали-сингиля (вес – 52–74 г; длина – 16,2–19,5 см) и скорпены (вес – 30–45 г; длина – 14–17 см). Контрольные группы обоих видов рыб содержали в аквариумах с проточной водой объемом 200 л. Напряжение кислорода (PO_2) в среде изменялось в пределах 158–162 гПа. Экспериментальные группы рыб находились при 40 гПа (сингиля) и 15 гПа (скорпена) в течение 5 суток. Выбор данных режимов содержания обусловлен различной толерантностью указанных видов к дефициту кислорода. Температура воды – 15 ± 1 °С. В течение опыта величина PO_2 в воде поддерживалась автоматически с применением воздушной аэрации. Контроль за содержанием кислорода в воде и температурой осуществлялся при помощи оксиметра АК-04 (НПО «Сигма») и потенциометра КСП-4. Ежедневно осуществлялась полная замена воды в аквариумах для удаления метаболитов.

За 60–70 мин до отбора проб рыб наркотизировали. В качестве анестезирующего препарата применяли уретан. Его растворяли в воде аквариума, где находились особи [13]. Кровь получали пункцией предсердия сердца

(atrium). В качестве антикоагулянта применяли гепарин (Richter, Венгрия).

Плазму отделяли от форменных элементов посредством центрифугирования (750 г, 30 мин; центрифуга MPW-310, Польша) и определяли концентрации Na^+ и K^+ . Эритроциты трижды отмывали от плазмы в изотонических растворах MgCl_2 . Полученную эритроцитарную массу лизировали двумя объемами охлажденного бидистиллята. Мембраны эритроцитов осаждали при 9000 г в течение 30 минут. Гемолизат использовали для определения внутриэритроцитарных концентраций Na^+ , K^+ , АТФ и активности гексокиназы (ГК). Фрагменты эритроцитарных мембран трижды отмывали от гемоглобина в среде следующего состава (в мМ): 100 – NaCl , 20 – KCl , 3 – MgCl_2 , 10 – гистидина (рН 7,4) и использовали для определения активности Na^+ , K^+ -АТФ-азы. Все операции проводили при 4 °С.

Концентрации Na^+ и K^+ в плазме крови и гемолизатах определяли на пламенном фотометре ПАЖ-3 в смеси пропан-воздух [14].

Концентрацию АТФ оценивали методом Лампрехта, Тротшольда [15], основанного на сочетании двух энзимных реакций с участием гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. В работе использовали стандартные препараты этих энзимов с активностью 500 и 1000 U (Sigma, США) соответственно.

Активность Na^+ , K^+ -АТФ-азы определяли в инкубационной среде следующего состава (в мМ): 3 – Na_2ATP , 100 – NaCl , 20 – KCl , 3 – MgCl_2 , 10 – гистидина (рН 7,4) и 5 мкг протеина клеточных мембран. Общий объем – 2 мл. Реакцию начинали, добавляя Na_2ATP , и прекращали через 15 мин, добавляя трихлоруксусную кислоту в конечной концентрации 5%. В качестве ингибитора Na^+ , K^+ -АТФ-азы

применяли убаин. Освобожденный неорганический фосфат (P_i) в пробе определяли по методу Фиске, Суббароу [16]. Активность выражали в микромолях P_i $\text{ч}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ протеина, количество которого в пробе контролировали по методу Бредфорд [17].

При определении активности гексокиназы (ГК) в эритроцитах использовали инкубационную среду следующего состава (в мМ): 100 – трис- HCl буфера (рН 7,4), 2 – MgCl_2 , 0,2 – NADP , 2 – Na_2ATP , 20 – глюкозы; 0,2 U глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 0,1 мл гемолизата. Общий объем – 3 мл. Реакцию запускали, добавляя глюкозу. Сканирование изменения экстинкции при 340 нм проводили на СФ-26. Результаты выражали в мкмольях $\text{NADPH}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{г}^{-1}$ Нб.

Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов проведены с применением стандартного пакета Grapher (версия 1.25). Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$. Достоверность различий оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента [18]. О нормальности распределения судили по сопоставлению абсолютных величин средней арифметической и моды.

Результаты и обсуждение

Общая АТФ-азная активность препаратов эритроцитарных мембран и активность ее отдельных компонентов (убаинзависимая и убаиннезависимая) у кефали в ходе опыта не изменяется (рис. 1). Различия статистически незначимы. Одновременно происходит увеличение концентрации Na^+ и уменьшение концентрации K^+ в клетках красной крови соответственно на 24,1% ($P < 0,001$) и 9,8% ($P < 0,01$) (таблица). Отношение $\text{Na}_b^+/\text{Na}_c^+$ снижается в

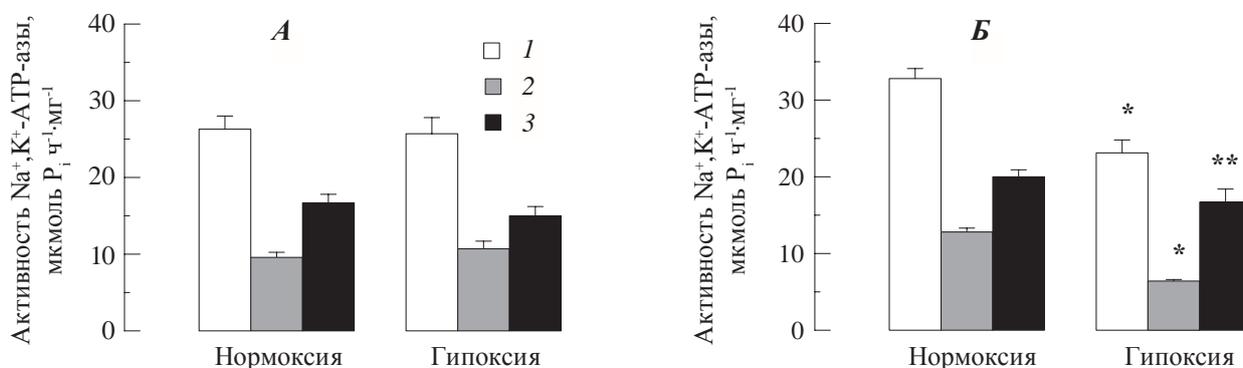


Рис. 1. АТФ-азная активность препаратов эритроцитарных мембран кефали (А) и скорпены (Б) в условиях экспериментальной гипоксии: 1 – общая активность, 2 – убайнзависимая составляющая, 3 – убайннезависимая составляющая. *Различия достоверны при $P < 0,001$; ** при $P < 0,01$

Баланс одновалентных катионов на мембранах ядерных эритроцитов морских рыб в условиях нормоксии и гипоксии

Показатели	Кефаль-сингиль				Скорпена			
	Нормоксия		Гипоксия		Нормоксия		Гипоксия	
	<i>n</i>	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
Na _b ⁺ , ммоль·л ⁻¹	10	188,3 ± 2,3	7	167,3 ± 2,4	7	161,5 ± 3,4	7	162,6 ± 3,0
K _b ⁺ , ммоль·л ⁻¹	10	6,40 ± 0,36	7	8,19 ± 0,38	7	3,3 ± 0,5	7	3,4 ± 0,3
Na _c ⁺ , ммоль·л ⁻¹	10	10,0 ± 0,5	7	24,1 ± 1,9	7	20,6 ± 1,0	7	23,1 ± 1,4
K _c ⁺ , ммоль·л ⁻¹	10	86,7 ± 1,2	7	78,2 ± 2,4	7	99,8 ± 3,1	7	103,9 ± 3,5
Na _b ⁺ /Na _c ⁺	10	21,3 ± 2,0	7	7,2 ± 0,6	7	7,95 ± 0,45	7	7,24 ± 0,56
K _b ⁺ /K _c ⁺	10	0,074 ± 0,004	7	0,105 ± 0,005	7	0,034 ± 0,005	7	0,033 ± 0,003

Примечание: *n* – число особей; Na_b⁺, K_b⁺ – концентрация натрия и калия в крови; K_c⁺, Na_c⁺ – концентрация натрия и калия в эритроцитах

3,0 раза ($P < 0,001$), а K_b⁺/K_c⁺ повышается на 41,9% ($P < 0,001$), то есть градиент концентрации Na⁺ и K⁺ между плазмой крови и внутриэритроцитарной средой становится ниже, чем у контрольных животных.

В отличие от кефалей общая АТР-азная активность препаратов эритроцитарных мембран скорпены в условиях гипоксии снижается (рис. 1). При 15%-м насыщении воды кислородом различия достигают 29,6% ($P < 0,001$). На долю Na⁺, K⁺-АТР-азы (уабаинзависимая компонента) приходится 66,0% ($P < 0,001$) снижения активности, а 34,0% на падение активности АТР-аз, нечувствительных к уабаину. Изменение энзимной активности эритроцитарных мембран не оказывает значимого влияния на баланс одновалентных катионов в клетках красной крови (таблица). Концентрации Na⁺ и

K⁺ во вне- и внутриклеточной среде оставались без изменений. Отношения Na_b⁺/Na_c⁺ и K_b⁺/K_c⁺ совпадали у контрольной и опытной групп рыб. Такое соотношение процессов указывает на снижение проницаемости эритроцитарных мембран.

Активность ГК в эритроцитах кефали-сингиля в условиях гипоксии не изменяется (рис. 2). При этом концентрация АТР в клетке снижается на 18,3% ($P < 0,001$). Реакция клеток красной крови скорпены была противоположной. Активность энзима подавляется и составляет 73,5% ($P < 0,01$) от исходных значений. При этом концентрация АТР в клетке остается на уровне контрольных величин.

Из представленных данных видно, что в эритроцитах скорпены происходит сбалансированное угнетение метаболических и мемб-

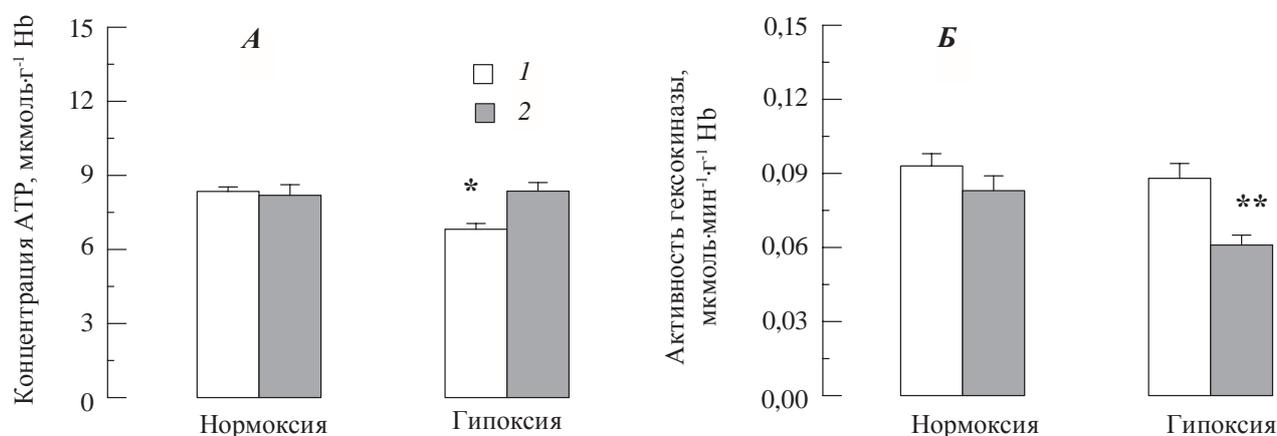


Рис. 2. Содержание АТР (А) и активность гексокиназы (Б) в ядерных эритроцитах рыб при адаптации к условиям внешней гипоксии: 1 – кефаль-сингиль, 2 – скорпена. * Различия достоверны при $P < 0,001$, ** при $P < 0,01$

ранных функций. При этом основные показатели жизнеспособности клеток (градиенты Na^+ и K^+ на мембране, концентрация АТФ) сохраняются на уровне контрольных значений. Реакция эритроцитов кефали прямо противоположна. При сохранении высокой активности Na^+, K^+ -АТФ-азы и ГК наблюдается падение уровня АТФ в клетке и значительное снижение концентрационных градиентов Na^+ и K^+ между внутриэритроцитарной средой и плазмой крови.

Развитие компенсаторных реакций в организме кефали-сингиля, направленных на удержание исходных скоростей окислительного метаболизма, по-видимому, связано с высокой чувствительностью клеток тканей данного вида к гипоксии. Известно, что клетки чувствительные к данному фактору не способны к сбалансированному угнетению метаболизма [19]. Они сохраняют высокую ионную проницаемость мембран при высокой активности Na^+, K^+ -АТФ-азы. Скорость синтеза АТФ в клетках не скоординирована с энергетическими требованиями ионных насосов. Это приводит к нарушению мембранных функций, диссипации ионных градиентов и неконтролируемому входу Ca^{2+} в клетку, что инициирует Ca^{2+} -каскад аутодеструкции клетки. Исследования, проведенные нами на ядерных эритроцитах кефали, подтвердили данное положение. При гипоксии средней степени (40% насыщения воды кислородом) происходило достоверное снижение градиентов концентраций Na^+ и K^+ между плазмой крови и внутриэритроцитарной средой, а также уменьшение концентрации АТФ в клетке. Активность ГК и Na^+, K^+ -АТФ-азы при этом сохраняется на достаточно высоком уровне. Это означает, что поддержание жизнеспособности клеток пелагических рыб возможно только при сохранении нормального кислородного режима тканей.

Снижение тканевого напряжения кислорода не оказывало заметного влияния на эритроциты скорпены. Об этом свидетельствует сохранение градиентов концентраций Na^+ и K^+ на мембране, а также стабильный уровень АТФ в клетке. Активность Na^+, K^+ -АТФ-азы и гексокиназы при этом снижается. Известно, что гексокиназа ограничивает скорость утилизации глюкозы в ядерных эритроцитах [20]. По сравнению с другими ферментами гликолиза, активность ее минимальна. Согласно данным В. Л. Тафтс, Р. Дж. Бойтлер [21], более 20% энергии ядерного эритроцита расходуется

на поддержание трансмембранного градиента концентраций Na^+ и K^+ . Снижение проницаемости клеточных мембран, отмеченное в наших исследованиях, предполагает уменьшение энергоемкости процессов катионного обмена. В этом, по-видимому, следует усматривать основную причину подавления внутриклеточного метаболизма ядерных эритроцитов донных рыб при низких концентрациях кислорода.

Сходные изменения отмечены в условиях аноксии в нейронах головного мозга рептилий [19]. Предполагается, что переход к суббазальным скоростям метаболизма при действии экстремальных факторов: гипоксия, гипотермия и голод, достигается за счет сокращения числа функционирующих ионных каналов [19]. Принципиальное значение имеет выявление механизма направленной коррекции плотности функционирующих ионных каналов. Установлено, что при гипоксии снижается реабсорбция воды в почках и жабрах гидробионтов [22, 23]. Допускается, что это связано с низкой продукцией альдостерона и вазопрессина. Показано, что альдостерон индуцирует синтез протеина в клетках, который участвует в активном транспорте Na^+ через эпителиальную мембрану [24]. В связи с этим можно предположить, что гипоксия, ограничивая продукцию альдостерона снижает и проницаемость клеточных мембран. Недавно установлено, что пусковым сигналом для перехода клеток к суббазальным скоростям метаболизма на основе уменьшения числа функционирующих ионных каналов является высвобождение аденозина [25].

Таким образом, организм малоподвижной скорпены отличается повышенной устойчивостью к дефициту кислорода. Это определяется устойчивостью клеток ее тканей, сохраняющих в условиях гипоксии основные параметры жизнеспособности (внутриклеточная концентрация АТФ, трансмембранные градиенты Na^+ и K^+) на основе сопряженного угнетения мембранных и метаболических функций. У высокоподвижной кефали-сингиля, чувствительной к дефициту кислорода в условиях внешней гипоксии, наблюдается развитие комплекса компенсаторных реакций, направленных на поддержание исходной скорости окислительного метаболизма в клетках тканей. При этом отмечается рассогласование метаболических и мембранных функций, выражающееся в снижении ионных градиентов и концентрации АТФ в клетке.

**ВМІСТ ОДНОВАЛЕНТНИХ
КАТІОНІВ І АТР В ЕРИТРОЦИТАХ
МОРСЬКИХ РИБ В УМОВАХ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ**

*О. О. Солдатов¹, І. О. Парфьонова²,
В. М. Новицька¹*

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

²Севастопольський національний
технічний університет, Україна

В умовах експерименту досліджували вплив гіпоксії на сполучення мембранних і метаболічних функцій в ядерних еритроцитах риб (кефалі-сингіля, скорпени), які виявляють різну толерантність до дефіциту кисню. Показано, що стійка до гіпоксії скорпена зберігає в еритроцитах трансмембранні градієнти K^+ і Na^+ та високу внутрішньоклітинну концентрацію АТР за 15%-го насичення води киснем. Це відбувається на фоні зниження активності Na^+, K^+ -АТР-ази і гексокінази. У чутливої до гіпоксії кефалі-сингіля реакція є протилежною. У разі збереження високої активності Na^+, K^+ -АТР-ази і гексокінази спостерігається зниження іонних градієнтів і концентрації АТР у клітинах червоної крові. Обговорюються причини виявлених відмінностей.

Ключові слова: гіпоксія, Na^+, K^+ -АТР-аза, гексокіназа, трансмембранні градієнти K^+ і Na^+ , АТР, ядерні еритроцити, морські риби.

**CONTENTS OF MONOVALENT
CATIONS AND ATP IN ERYTHROCYTES
OF MARINE FISHES UNDER
EXPERIMENTAL HYPOXIA**

*A. A. Soldatov¹, I. A. Parfyonova²,
V. N. Novitskaya¹*

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

²Sevastopol National Technical University, Ukraine

S u m m a r y

Coupling of membrane and metabolic functions in nuclear erythrocytes was investigated under experimental hypoxia conditions in fishes (*Liza aurata*, *Scorpaena porcus*) with different tolerance to oxygen deficiency. It was shown, that resistant to hypoxia *Scorpaena porcus* keeps in erythrocytes transmembrane gradients of K^+ and Na^+ and cellular concentration ATP under 15% of oxygen

saturation of sea water. It was connected with the decrease in Na^+, K^+ -ATPase and hexokinase activity. The reaction to oxygen deficiency was opposite in sensitive to hypoxia *Liza aurata* erythrocytes. A decrease in ionic gradients and concentration of ATP in red blood cells was observed while the activity of Na^+, K^+ -ATPase and hexokinase was high. The reasons of the differences obtained are discussed.

Key words: hypoxia, Na^+, K^+ -ATPase, hexokinase, transmembrane gradients of K^+ and Na^+ , ATP, nuclear erythrocyte, marine fishes.

1. Duncombe-Rae C. M., Bailey G. W., Neumann T. et al. // 10th SAMSS, 2000: Wilderness (South Africa), 22-26 Nov 1999. – Abstracts, 2000. – P. 1.
2. Joyce S. // Environ. Health Perspect. – 2000. – **108**, N 3. – P. A12–A125.
3. Савина М. В. Механизмы адаптации тканевого дыхания в эволюции позвоночных. – С.-Петербург: Наука, 1992. – 200 с.
4. Солдатов А. А. // Журн. эволюц. биохим. физиол. – 1996. – **32**, № 2. – С. 142–146.
5. Panepucci L., Fernandes M. N., Sanches J. R., Rantin F. T. // Rev. Bras. Biol. – 2000. – **60**, N 2. – P. 353–360.
6. Waarde A., Thillart G., Kesbeke F. // J. Comp. Physiol. – 1983. – **149B**, N 4. – P. 469–475.
7. Шульман Г. Е., Аболмасова Г. И., Столбов А. Я. // Усп. совр. биол. – 1993. – **113**, № 5. – С. 576–586.
8. Chew S. F., Gan J., Ip Y. K. // Physiol. Biochem. Zool. – 2005. – **78**, N 4. – P. 620–629.
9. Thillart G., Waarde A. // Mol. Physiol. – 1985. – **8**, N 3. – P. 393–409.
10. Waarde A. // Comp. Biochem. Physiol. – 1988. – **91B**, N 2. – P. 207–228.
11. Boutilier R. G., Ferguson R. A. // Can. J. Zool. – 1989. – **67**, N 12. – P. 2986–2993.
12. Phillips M. C. L., Moyes C. D., Tufts B. L. // J. Exp. Biol. – 2000. – **203**, N 6. – P. 1039–1045.
13. Солдатов А. А. // Гидробиол. журн. – 2003. – **39**, № 1. – С. 51–63.
14. Комаров Ф. И., Коровкин Б. Ф., Меньшиков В. В. Биохимические исследования в клинике. – Л.: Медицина, 1976. – 384 с.
15. Ещенко Н. Д. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). – Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. – С. 222–226.
16. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: Высш. школа, 1980. – 272 с.
17. Sedmak F. F., Grossberg S. E. // Anat. Biochem. – 1977. – **79**, N 4. – P. 544–552.

18. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. — М.: Высшая школа, 1980. — 291 с.
19. *Bickler P. E., Buck L. T.* // *Annu. Rev. Physiol.* — 2007. — **69**, N 2. — P. 145–170.
20. *Bachand L., Leray C.* // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1975. — **50B**, N 6. — P. 567–570.
21. *Tufts B. L., Boutilier R. G.* // *J. Exp. Biol.* — 1991. — **231**, N 1. — P. 139–151.
22. *Soulier P., Peyraud-Waitzenegger M., Peyraud C.* // *Arch. Int. Physiol., Biochem. Biophys.* — 1991. — **99**, N 5. — P. 124–132.
23. *Swift D. I., Lloyd R.* // *J. Fish Biol.* — 1974. — **6**, N4. — P. 379–387.
24. *Edelman I. S., Fanestil D. D.* // *Biochem. Action of Pormones.* — **1**. — New York: Academic Press, 1972. — P. 321–364.
25. *Buck L. T.* // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* — 2004. — **139**, N 3. — P. 401–414.

Получено 09.02.2010