

## THE RATE OF OXYGEN CONSUMPTION IN SOME AMPHIBIOUS INVERTEBRATE

T.A. Alekseeva, I.G. Vladimirova

Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia  
e-mail: taalexseeva@mail.ru

Data of the oxygen consumption rate of some Insect and Arachnida are presented. It is shown the lower level of the standard metabolism in the examined amphibious than in the ground group.

## РОЛЬ ОЛИГОМЕРНЫХ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ В СТАБИЛИЗАЦИИ ВОДНОГО ОБМЕНА КОСТИСТЫХ РЫБ

А.М. Андреева

Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод  
им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок, Ярославская обл., Россия  
e-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru

### Введение

Господствующая позиция рыб среди позвоночных в Мировом океане обеспечена, прежде всего, эффективными механизмами стабилизации внутренней жидкой среды организма. Основная функция этой среды состоит в поддержании оптимальных осмотических отношений внутри организма и с внешней средой. Белки плазмы создают онкотическое давление крови, играющее роль в процессах фильтрации жидкости через стенку капилляра. Особенностью капилляров рыб является их проницаемость ко всем белкам плазмы крови (Андреева и др., 2007, 2008). Распределение белков относительно стенки капилляра *in situ* регулирует фильтрацию через нее внеклеточной жидкости и, как следствие, водный баланс между внутриклеточной и внеклеточной средой. Стабилизация водного обмена, однако, достигается не только регуляцией проницаемости стенки капилляра, но и структурными преобразованиями белков крови. Механизм быстрой «подгонки» осмотического давления за счет обратимой диссоциации олигомеров (белков, состоящих из нескольких связанных нековалентно полипептидных цепей) выявлен для внутриклеточных белков; для белков плазмы крови такой механизм не типичен (Шульц, Ширмер, 1982). Тем не менее, в крови пресноводных костистых рыб белки-олигомеры были обнаружены (Андреева, 1999). Целью данной работы является поиск белков-олигомеров в крови и тканевых жидкостях костистых рыб с разным типом водно-солевого обмена: пресноводных, солоноватоводных и морских; туводных и проходных; и изучение структурных преобразований олигомерных белков у пресноводных костистых рыб при их адаптациях к повышенной солености.

### Материалы и методы

В качестве объектов использовали следующие виды костистых рыб:

1) пресноводные виды (отловлены в Рыбинском водохранилище) – щуку обыкновенную *Esox lucius* L., леща *Abramis brama* L., синца *Abramis ballerus* L., плотву *Rutilus rutilus* L., язя *Leuciscus idus* L., густеру *Blicca bjoerkna* L., уклейку *Alburnus alburnus* L., чехонь *Pelecus cultratus* L., карася серебряного *Carassius auratus* L., карпа обыкновенного *Cyprinus carpio* L., судака обыкновенного *Stizostedion lucioperca* L., берша *St. volgensis* G.; 2) проходные (отловлены в Японском море) – мелкочешуйную красноперку угай *Tribolodon brandtii* D.; 3) солоноватоводные виды (отловлены в Рыбинском водохранилище) – тюлька черноморско-каспийскую *Clupeonella cultriventris* N.; 4) морские виды – керчака *Muchocephalus scorpius* L., камбалу полярную *Liopsetta glacialis* P., треску *Gadus morhua* L. (отловлены в Белом море); бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* P., бычка-мартовика *Mesogobius batrachocephalus* P., ставриду *Trachurus mediterraneus* S., смариду *Spicara flexuosa* R., атерину *Atherina hepsetus* L., кефаль-сингиль *Lisa aurata* R., мерланга *Merlangus merlangus euxinus* N., скорпену *Scorpena porcus* L., морского налима *Gaidropsarus mediterraneus* L., зеленушку *Symphodus tinca* L. (отловлены в Черном море). Для сравнения использовали хрящевых рыб *Chondrichthyes*: катрана *Squalus acanthias* L., морского кота *Dasyatis pastinaca* L. и морскую лисицу *Raja clavata* L.; хрящевых ганоидов *Chondrostei*: стерлядь *Acipenser ruthenus* L., проходных севрюгу *A. stellatus* Pall. и белугу *Huso huso* L. (р.Волга).

В работе использовали сыворотку и плазму крови (СК, ПК). Интерстициальную жидкость ИЖ (перитонеальная, мозга, белых мышц ИЖБМ, печени, верхней трети желудочно-кишечного тракта ЖКТ) отбирали либо с помощью пипеток-дозаторов, либо напительванием полоски размером 0,5x4,0мм хроматографической бумаги Watmann 3ММ (Андреева и др., 2007, 2008). Концентрацию общего белка в крови и тканевой жидкости определяли микробиуретовым методом (Itzhaki et al., 1964), отдельных белков и фракций – с использованием программного пакета OneDscan.

В экспериментах по адаптациям рыб к солености использовали лещей и плотву (0<sup>+</sup>, 1<sup>+</sup>, 2<sup>+</sup>, 3<sup>+</sup>, 4<sup>+</sup>), полученных в результате внутривидовых групповых скрещиваний; рыб одного возраста размещали в аквариумах и постепенно добавляли поваренную соль до 8, 10 и 11,5‰. В остром опыте рыб без предварительной адаптации помещали в воду с соленостью 20‰. В контрольной группе соль к воде не добавляли.

Для оценки структурной организации белка по типу мономер/олигомер белки дифференцировали в градиенте концентраций ПААГ (5–40%), в ПААГ с 8М мочевиной и в SDS-ПААГ (Андреева, 2001; Андреева и др. 2007, 2008). Гликопротеиды и липопротеиды выявляли методами Шиффа и Суданом черным Б соответственно, углеводы в структуре белка определяли методом PAS (Гааль и др., 1982). Для определения ММ нативных белков в ПААГ использовали маркеры сывороточный альбумин человека С4С, овальбумин ОА; в SDS-ПААГ набор PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas) маркеров с ММ 11, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130, 250 kDa. Результаты обрабатывались статистически с помощью программного пакета OneDscan.

## Результаты и обсуждение

**1. Доказательство существования белков-олигомеров в крови рыб.** Анализ степени дифференциации белков на двухмерных электрофореграммах показал, что при одинаковой степени дифференциации нативных белков СК (20–28 компонентов), количество субъединиц, формирующих их разнообразие в разных таксонах, различается существенно (Табл.).

### Степень дифференциации белков сыворотки крови костистых рыб в нативных и денатурирующих условиях двумерного электрофореза

Таксономическая группа рыб	Количество компонентов в ПААГ (нативные условия)	Количество компонентов в ПААГ (денатурирующие условия)	
		8М мочевиная	SDS
Хрящевые рыбы:			
<i>Акула</i>	28		13
<i>Скаты</i>	20	10	17
Хрящевые ганоиды			
<i>Туводные</i>	24	26	46
<i>Проходные</i>	28	25	41
Костистые рыбы:			
<i>Морские</i>	26	17	43
<i>Пресноводные</i>	26	54	98

Так, разнообразие белков у хрящевых рыб обеспечено небольшим числом субъединиц (13–17). У костных рыб в создании белкового разнообразия задействовано большее число субъединиц: у хрящевых ганоидов их больше в три раза (46), а у пресноводных костистых рыб – в 7,5 раз (98) по сравнению с катраном (13). При разрыве водородных связей с помощью 8М мочевины количество компонентов по сравнению с нативными белками у хрящевых ганоидов практически не меняется, а у пресноводных костистых рыб возрастает в 2 раза – с 26 до 54 компонентов. Рост числа субъединиц, формирующих белковое разнообразие у пресноводных костистых рыб, объясняется наличием в их крови олигомерных белков.

**2. К какой группе сывороточных белков относятся белки-олигомеры?** Какие сывороточные белки объединяются в олигомеры, диссоциирующие под действием 8М мочевины? Прежде всего, это молекулы иммуноглобулина H2L2, объединяющиеся в молекулы (H2L2)<sub>n</sub>, где степень агрегации «n» выше единицы. 8М мочевиная разбивает агрегаты на отдельные молекулы

H2L2, но это не вносит дополнительный вклад в разнообразие субъединиц: если в условиях 8M мочевины на электрофореграмме выявляется один компонент с ММ около 180 kDa, то без мочевины вместо него будет выявляться также один компонент с ММ (180 × n) kDa; в SDS-ПААГ для молекул H2L2 и (H2L2)<sub>n</sub> качественный состав субъединиц будет одинаков (Андреева, 2001).

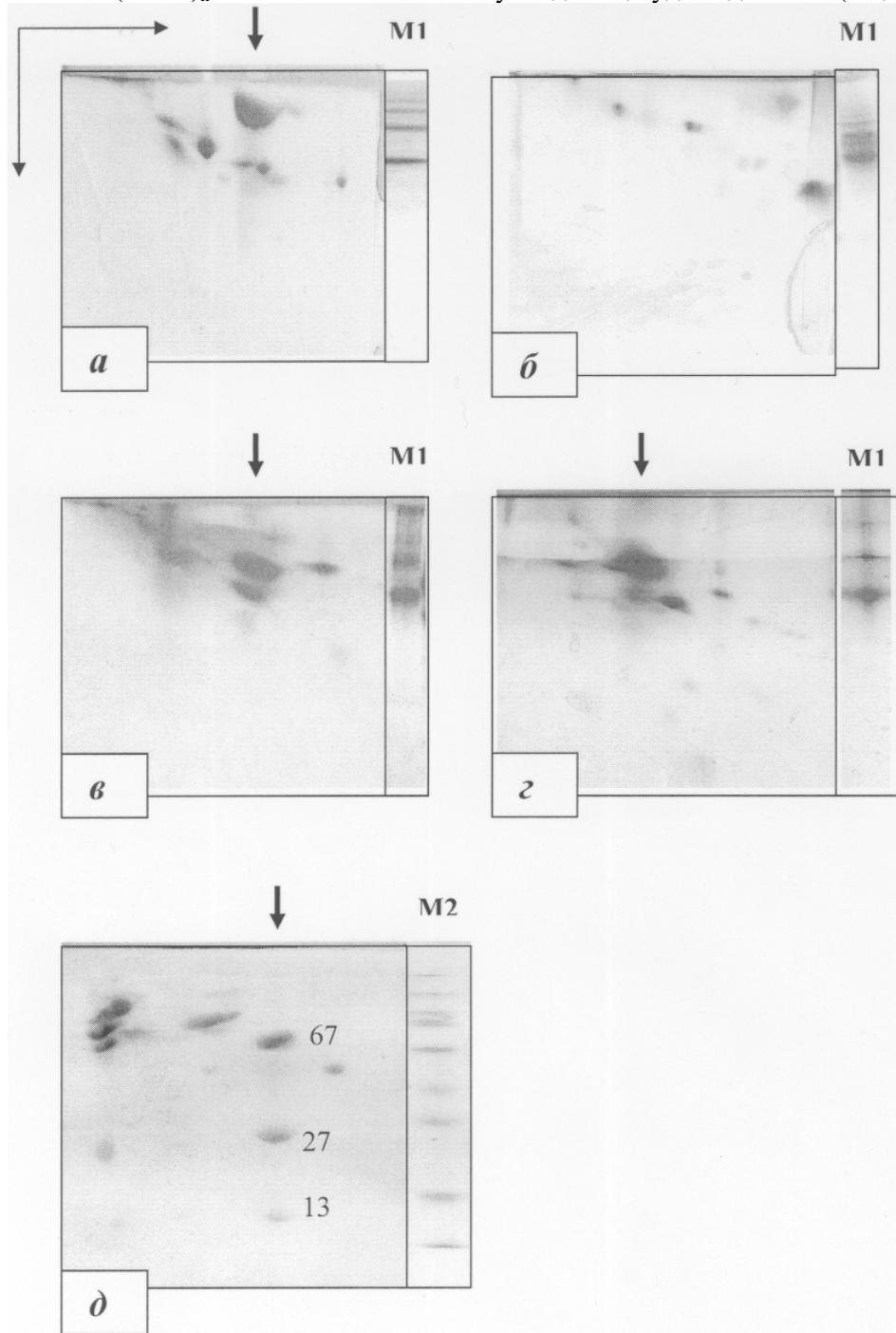


Рис. 1. Диск-электрофорез сывороточных белков: леща (1, 2), судака (3, 4), синца (5, 6), уклей (7), чехони (8), густеры (9, 10), щуки (11); керчака (12), камбалы (13), трески (14); красноперки (15, 16). Вертикальная стрелка указывает направление диск-электрофореза, светлые стрелки указывают зону подвижности белков-олигомеров

Рост числа субъединиц, формирующих белковое разнообразие у пресноводных костистых рыб, обеспечен белком-олигомером, представленным в диск-электрофорезе в виде пятна

с нечеткими контурами (Рис.1). Его положение в геле динамично – в разные сезоны и стадии зрелости гонад его можно отнести то к  $\beta$ - и  $\alpha_1$ - глобулинам, то к альбуминам. В его состав входит до 13 субъединиц с ММ от 13 до 73 kDa, стабилизированных в олигомере слабыми нековалентными взаимодействиями (Рис.2). Это доказывается одинаковым числом субъединиц олигомера в электрофорезе с 8М мочевиной и в SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях (рис. 2, а, д). Величина ММ нативного белка достигает 120 kDa, снижаясь перед нерестом до 90 kDa. Высокие показатели ММ объясняются, вероятно, его участием в транспорте углеводов и липидов (белок окрашивается реактивом Шиффа и Суданом черным Б). В SDS-ПААГ среди субъединиц олигомера выделяется макрокомпонент с ММ около 67 kDa – сывороточный альбумин (Рис.2, д). У леща, плотвы, судака, щуки, кроме этого макрокомпонента, выявлены белки с ММ около 27 и 13 kDa (Рис.2, д). В структуре альбумина методом PAS выявлены углеводы. Их наличие может способствовать межмолекулярным взаимодействиям альбумина с другими белками и, в конечном счете, образованию олигомера. Таким образом, «ядром» олигомера является альбумин, с которым с помощью слабых взаимодействий связаны другие белки.

**3. Поиск белков-олигомеров в крови морских видов.** В крови морских рыб белки-олигомеры не обнаружены. В сыворотке керчака обнаружен компонент с нечеткими контурами (Рис.1), однако, уже в градиенте ПААГ он «разваливался» на три белка. Вероятно, белки керчака проявляют некоторую склонность к комплексообразованию, но участвующие в этом слабые межмолекулярные силы недостаточны для поддержания стабильного белкового комплекса.

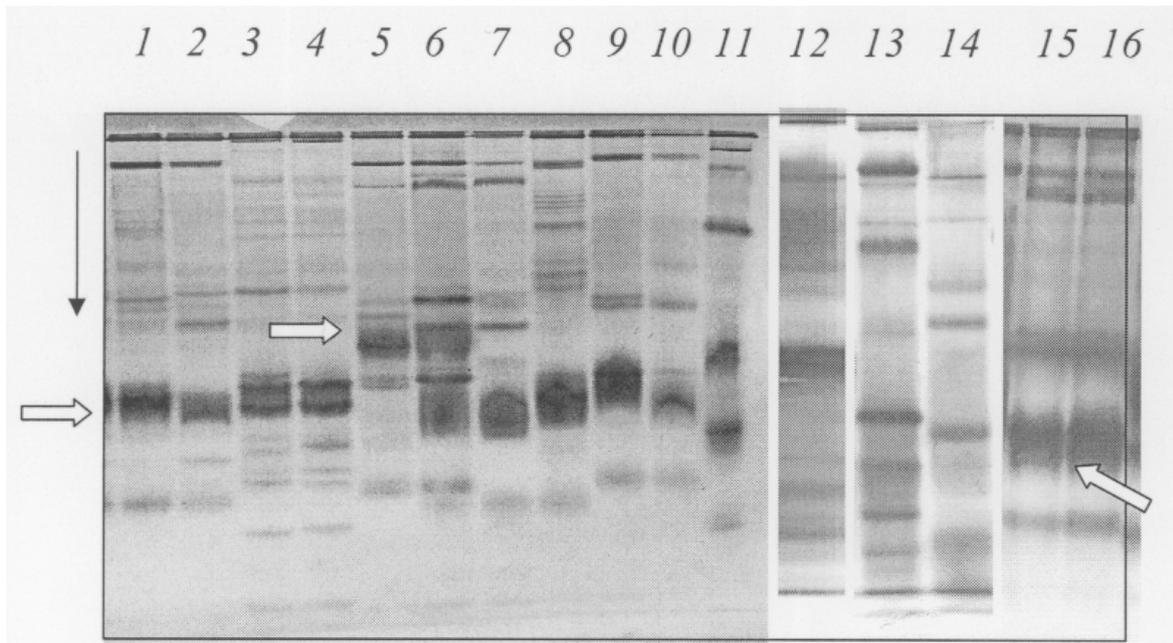
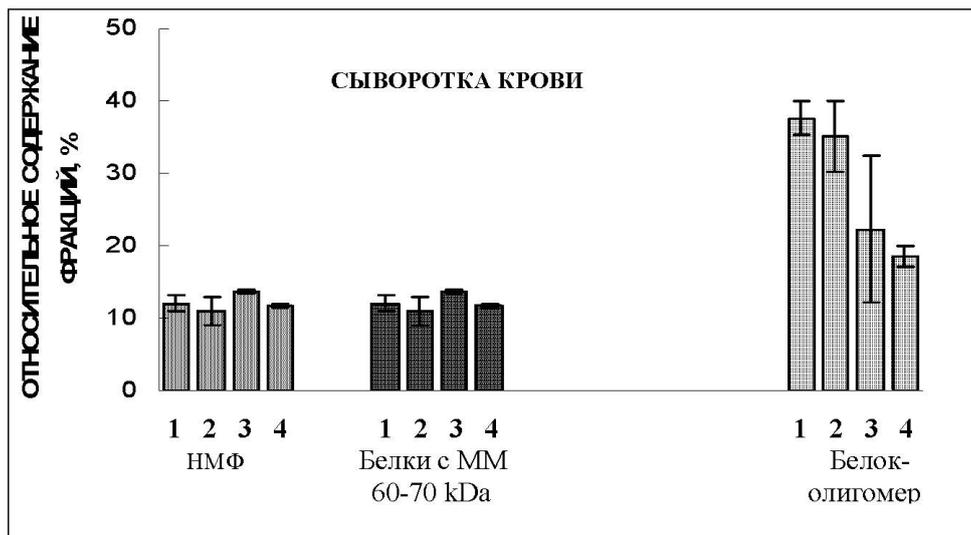


Рис. 2. Двухмерный электрофорез в ПААГ с 8М мочевиной белков сыворотки крови леща (а), бычка-кругляка (б), тюльки (в) и красноперки (г); в SDS-ПААГ – сыворотки плотвы (д). Горизонтальная стрелка указывает направление диск-электрофореза, вертикальная – электрофореза с мочевиной или SDS, маленькие вертикальные стрелки – дорожку олигомерного белка, светлые стрелки – белки с ММ около 67 и 25 kDa. М1 – маркер ЧСА, М2 – маркер Fermentas

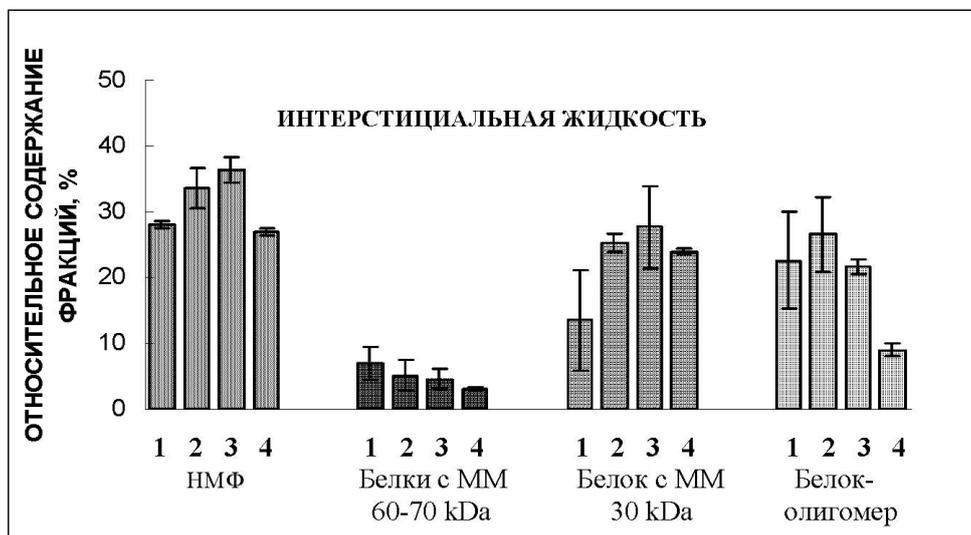
**4. Поиск белков-олигомеров в крови солоноватоводных и проходных видов.** У тюльки и проходной красноперки белки-олигомеры обнаружены (Рис.1), в условиях мочевины они диссоциировали на 6 (тюлька) и 13 (красноперка) субъединиц (Рис.2).

**5. Диссоциация белков-олигомеров на субъединицы при адаптациях леща и плотвы к условиям повышенной солености.** Все образцы ИЖ рыб являются фильтрами ПК (Андреева и др., 2007, 2008). Отличием ИЖ является высокое относительное содержание низкомолекулярных белков, маркером которых является макрокомпонент с ММ около 25 kDa. В условиях солености воды 8 и 10% изменений фракционного состава белков ПК по сравнению с контрольной группой рыб

(из пресной воды) не выявлено. Выраженные изменения фракционного состава белков в ПК и ИЖ выявлены при солёности 11,5‰ и 20‰ : с ростом солёности воды в СК лещей и плотвы относительное содержание белка-олигомера снижалось почти в два раза, при этом нарастания относительного содержания низкомолекулярных белков не было отмечено. В ИЖБМ рост солёности также приводил к резкому снижению относительного содержания белка-олигомера (в 3–4 раза), но при этом отмечался рост относительного содержания низкомолекулярных белков, в особенности белка с ММ 30 kDa (Рис.3). Таким образом, рост солёности воды приводил к снижению относительного содержания белка-олигомера и в СК, и в ИЖ, но это событие совпадало с ростом относительного содержания низкомолекулярных белков только в ИЖ. Данное обстоятельство позволяет предположить, что при повышенной солёности пул низкомолекулярных белков в ИЖ пополняется за счёт диссоциации белка-олигомера.



*a*



*б*

Рис.3. Относительное содержание олигомерного белка и белков низкомолекулярных фракций НМФ (с ММ 60–70 и 30 kDa) в сыворотке крови (*a*) и интерстициальной жидкости мышц (*б*) лещей 2<sup>+</sup> при адаптациях к солёности: 1 – пресная вода, 2 – солёность 8‰, 3 – солёность 10‰, 4 – солёность 11,5‰. Разной заливкой выделены НМФ, белки с ММ 60–70 kDa, белок с ММ 30 kDa и белок-олигомер

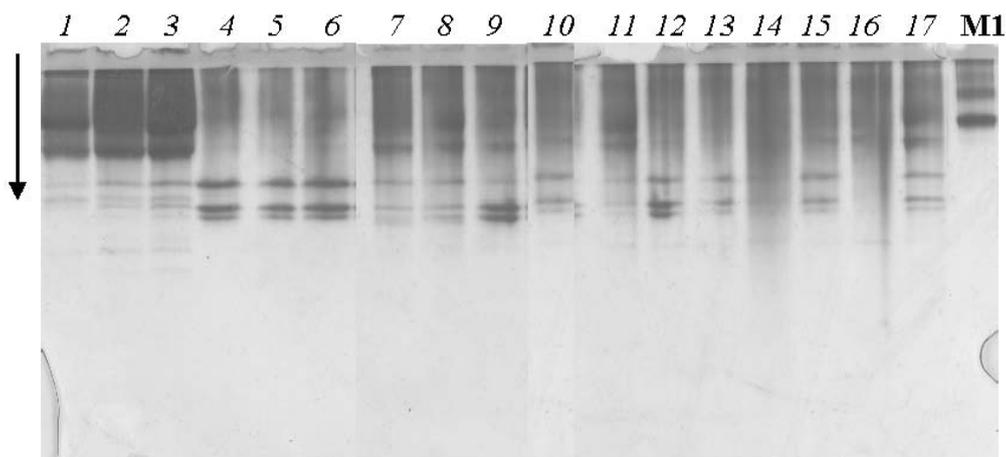


Рис.4. Электрофорез в ПААГ с 8М мочевиной белков сыворотки крови (1–3) и тканевой жидкости мозга (4–6), перитонеальной жидкости (7–9), жидкости белых мышц (10–17). Вертикальная стрелка указывает направление электрофореза, M1 – САЧ

Если низкомолекулярные белки, характерные для ИЖ, происходят из белков ПК и образуются при диссоциации белка-олигомера, то субъединичный состав белков ПК и ИЖ рыб должен совпадать, различия же будут касаться только относительного содержания фракций. Результаты действительно показали принципиальное сходство субъединичного состава белков ПК и ИЖ, выявлено сходство ПК и ИЖ и в ПААГ с мочевиной (Рис.4). Доказательством формирования пула низкомолекулярных белков из олигомера служит и тот факт, что в его составе есть субъединица с ММ около 27 kDa, и такой же белок (ММ около 25 kDa) присутствует в ИЖ.

#### Заключение

Среди различающихся по типу водно-солевого обмена рыб белок-олигомер обнаруживается только у видов, связанных с пресными водами: у пресноводных рыб, проходной красноперки, солонатоводной тюльки. У туводных морских видов белки-олигомеры не обнаружены. Почему олигомеры обнаружены только у рыб, так или иначе связанных с пресной водой? Вероятно, их появление связано с особенностями становления внутренней жидкой среды в эволюции рыб. Историческое прошлое костистых рыб предположительно связано с длительной фазой жизни в море и дальнейшим освоением пресных вод (Ромер, Парсонс, 1992), Учитывая этот факт и предположение о формировании первичных белковых систем в соответствии с соленостью внутренней жидкой среды организма около 5–8‰ (Хлебович, 1974), можно предположить, что во внеклеточной среде древних морских рыб белки существовали в виде отдельных полипептидных цепей, которые в ходе освоения рыбами пресных вод объединялись в белковые комплексы. Морским видам в условиях гипертоничной внешней среды для удержания воды в организме, возможно, «выгоднее» иметь в крови больше белков-мономеров, так как образование олигомеров снизило бы онкотическое давление крови. Белкам пресноводных рыб в силу гипертоничности внутренних жидкостей в пресных водах не угрожает дегидратация, наоборот – организм постоянно откачивает лишнюю воду, поэтому образование олигомеров способствовало снижению онкотического и общего осмотического давления крови. Приобретение пресноводными костистыми рыбами механизма быстрой «настройки» онкотического давления внеклеточных жидкостей организма за счет диссоциации белков-олигомеров, несомненно, не могло не способствовать высокой приспособляемости этой группы рыб.

#### Литература

- Андреева А.М., 1999. Структурно-функциональная организация альбуминовой системы крови рыб // Вопр. ихтиологии. Т. 39.№0 6. С. 825–832.
- Андреева А.М., 2001. Сывороточные  $\gamma$ -глобулины рыб//Вопр. ихтиологии.Т. 41. N04. С. 550–556.
- Андреева А.М., Чалов Ю.П., Рябцева И.П., 2007. Особенности распределения белков плазмы между специализированными компартаментами внутренней среды на примере карпа *Cyprinus carpio* (L.) // Журн. эвол. биох и физиол. Т.43. №6. С.501–504.

Андреева А.М., Рябцева И.П., Большаков В.В., 2008. Анализ проницаемости капилляров разных отделов микроциркуляторной системы для белков плазмы у некоторых представителей костистых рыб // Журн. эвол. биох и физиол. Т.44. №2. С.212–214.

Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л., 1982. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 448 с.

Ромер А., Парсонс Т., 1992. Анатомия позвоночных. В 2-х томах. М.: Мир.

Хлебович В.В., 1974. Критическая соленость биологических процессов. Л.: Наука, 236с.

Шульц Г., Ширмер Р., 1982. Принципы структурной организации белков. М.: Мир. 354 с.

Itzhaki R.F., Gill D.M., 1964. A micro- biuret method for estimating protein // Anal.Biochem. Vol.9. P.401–410.

## **THE ROLE OF OLIGOMEROUS PLASMA PROTEINS IN STABILIZATION OF WATER METABOLISM FROM BONY FISHES**

**A.M. Andreeva**

Institute of Internal Waters Biology, Russian Academy of Sciences, Borok,  
Yaroslavl Oblast, Russia, e-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru

In the blood of freshwater bony fishes in the fraction of albumins the protein-oligomers, capable of the dissociation to the components of their subunit with the content of fishes in the conditions of the increased salinity (higher than 10‰) are revealed. The dissociation of oligomeric proteins occurred in the course of their transcapillary transport into the interstitial liquid. Protein-oligomers were encountered only in those fishes, whose life cycle was connected with the fresh waters, in nonmigratory marine fishes such proteins were not discovered. The appearance of the serum proteins-oligomers in taxon Teleostei can be connected with the formation of the internal environment in the sea ancestors of bony fishes and with the subsequent mastery by them fresh waters. Taking also into consideration the formation of primary protein systems with the salinity of the internal environment of about 8‰ (Хлебович, 1974), we assume that the proteins of ancient marine fishes could exist in the internal environment in the form of the separate polypeptide, which in the course of mastery the fishes of fresh waters were united into the complexes for reduction in the value of the oncotic pressure of the blood, which stabilized the processes of filtration in the organism of fishes under the conditions of fresh waters.

## **АДАПТАЦИИ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ КРОВИ У ПРЕСНОВОДНЫХ КОСТИСТЫХ РЫБ**

**А.М. Андреева, И.П. Рябцева, В.В. Лукьяненко**

Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод  
им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок, Ярославская обл., Россия  
e-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru

### **Введение**

Дыхание, наряду с питанием и репродукцией, относится к числу наиболее важных функций организма. Его стабильность поддерживается на всех суборганизменных уровнях: молекулярном, биохимическом, клеточном и тканевом. У рыб, как представителей эктотермных организмов, дыхательные адаптации крови теснейшим образом связаны с внешней средой, так как кровь опосредует воздействия этой среды на организм. Основным носителем дыхательной функции крови является белок гемоглобин, заключенный в эритроциты. По прочности стенки эритроцита к дестабилизирующим факторам костистые рыбы среди *Pisces* занимают особое положение: у большинства костистых рыб отмечается практически перманентный гемолиз эритроцитов, в результате которого в крови присутствует внеклеточный гемоглобин (Андреева, 1997, 2008). Остается неясным, в какой форме находится в крови внеклеточный гемоглобин и как при этом поддерживается стабильность внутренней среды организма у костистых рыб.

Целью работы является исследование механизмов стабилизации дыхательной функции крови на разных суборганизменных уровнях у пресноводных костистых рыб. Для этого мы изучали устойчивость гемоглобина и эритроцитов костистых рыб к действию различных дестабилизирующих факторов.