

## ГЕМОГЛОБИНОВАЯ СИСТЕМА ЧЕРНОМОРСКОГО БЫЧКА-КРУГЛЯКА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

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

<sup>1</sup>Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь, Крым;

<sup>2</sup>Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь, Крым, Украина;  
e-mail: soldatov@ibss.iuf.net

Досліджували гемоглобін бичка-кругляка (*Neogobius melanostomus* P.), стійкого до зовнішньої гіпоксії. Гемоглобін у цього виду розділено методом диск-електрофорезу на 4 компоненти (2 мінорних та 2 основних). Серед основних фракцій виявлено компонент, який мав водночас високу спорідненість до кисню ( $P_{50}$   $7,74 \pm 0,98$  гПа при рН 8,3) і підвищену чутливість до рН (ефект Бора –  $0,81 \pm 0,09$  при рН 8,3 → 7,5). У разі закиснення інкубаційного розчину (рН 8,3 → 7,5) помітним є також зниження насичення його киснем на  $12,8 \pm 1,4\%$  (ефект Рута). В умовах експериментальної гіпоксії (концентрація  $O_2$  у воді 1,7–1,8 мг·л<sup>-1</sup>; експозиція – 10 діб) вміст цієї фракції у крові зростає на 41,8% ( $p < 0,001$ ). Це впливає на респіраторні характеристики крові цілому і віддзеркалює процес адаптації цього виду тварин до дефіциту кисню.

**Ключові слова:** гіпоксія, гемоглобінова система, спорідненість до кисню, ефект Бора, ефект Рута, еритроцити, нуклеотидтрифосфати, *Neogobius melanostomus* P.

**Г**ипоксия является одним из распространенных явлений в водах Мирового океана и Черное море не является в этом аспекте исключением. Зона с устойчиво низким содержанием кислорода в воде (не более 2 мл·л<sup>-1</sup>) обнаружена на его северо-западном шельфе [1, 2]. Она имеет ширину 30 миль и захватывает придонные слои воды вдоль морского побережья.

Молекулярные механизмы, определяющие существование гидробионтов в условиях экстремальной гипоксии, пока трудно объяснимы и требуют специального изучения. Особый интерес представляет исследование гемоглобинов морских рыб. По сравнению с высшими позвоночными их респираторные пигменты характеризуются достаточно высокой степенью гетерогенности с явно выраженной функциональной специализацией отдельных компонентов. У рыб выявлены гемоглобины, не чувствительные к рН [3, 4], обладающие обратным эффектом Бора в щелочном диапазоне рН [5], ответственные за эффект Рута [6], различающиеся сродством к органическим фосфатам [4] и т.д. Показано, что гемоглобиновая система рыб способна активно перестраиваться при адаптации к новым условиям среды [7, 8].

Одним из массовых и наиболее устойчивых к гипоксии видов в Черном и Азовском морях является бычок-кругляк (*Neogobius melanostomus* P.). Предварительные исследования показали, что он способен выдерживать 15–20%-е на-

сыщение воды кислородом в течение 2-х и более месяцев без видимых признаков асфиксии [9]. Исследованию функциональных характеристик гемоглобинов бычка-кругляка в норме и в условиях экспериментальной гипоксии посвящена настоящая работа.

### Материал и методы

Рыбу отлавливали в Севастопольской бухте и содержали в аквариумах объемом 50 л с замкнутой системой циркуляции воды в течение 2-х недель с целью снятия стресса, вызванного отловом и транспортировкой. В течение указанного времени рыбу кормили. В эксперименте использовали только подвижных активно питающихся особей.

Экспериментальная часть работы выполнена на специально разработанном гипоксическом стенде. Он позволяет поддерживать заданную температуру и концентрацию кислорода в воде. В камеру объемом 13,5 л помещали 4 особи. Содержание кислорода в воде в течение 2,5–3,0 часов снижали с 8,5–9,0 до 1,7–1,8 мг·л<sup>-1</sup> (20% насыщения) прокачиванием  $N_2$ , температуру воды поддерживали на уровне  $15 \pm 1$  °С, фотопериод составлял 12 часов – день : 12 часов – ночь. Животных выдерживали в данных условиях в течение 10 суток. Контрольную группу рыб содержали при 100%-ом насыщении воды кислородом. Эксперимент повторяли дважды. Контрольная и опытная группы в каждом из них со-

держали по 4 особи. Результаты обоих экспериментов были объединены. В момент изъятия особей из камеры для предотвращения развития манипуляционного стресса применяли уретановый наркоз [10]. Уретан не вызывает развития асфиксии у рыб в отличие от других анестезирующих препаратов.

Кровь получали пункцией сердца в шприц под слой вазелинового масла. Стенки шприца предварительно ополаскивали 0,9%-ым раствором NaCl, содержащим 10 U мл<sup>-1</sup> гепарина («Richter», Венгрия). Клетки крови отделяли от плазмы центрифугированием (800 g, 15 мин). Эритроциты отмывали от плазмы трижды, используя охлажденный изотоничный раствор NaCl. Полученную клеточную массу лизировали 4-х кратным объемом охлажденной бидистиллированной воды. Строму клеток осаждали при 9000 g в течение 15 мин.

Фракционирование гемолизатов проводили при помощи диск-электрофореза в полиакриламидном геле. Разделение осуществляли в трубках диаметром 6 мм при концентрации акриламида 7,5%. Применяли 20 mM трис-глициновый буфер (pH 8,3). Режим фракционирования: 4 mA на трубку, длительность – 90–120 мин, температура – 4 °C. Часть электрофореграмм фиксировали 5% ТХУ и окрашивали 0,1%-ым раствором Кумасси (G-250), а также бензидиновым реагентом на присутствие гемовых групп [11]. Распределение оптических плотностей между фракциями оценивали при помощи денситометра («Carl Zeiss», Германия). Большую часть электрофореграмм использовали для элюирования основных фракций гемоглобина. В качестве трансформирующей среды применяли 1,5 mM NaCl. Концентрирование растворов проводили при помощи мембран фирмы «Amicon» (США).

Кривые кислородного насыщения для цельных гемолизатов и растворов отдельных фракций гемоглобина строили при помощи спектро-

фотометрического метода с использованием кювет-десатураторов [12]. Применяли спектрофотометрические кюветы толщиной 10 мм. Объем сатуратора – 50 мл. Измерения выполняли при 15 °C и pH 7,8 и 8,3, используя 20 mM фосфатный буфер. Величину pH крови и гемолизатов оценивали на pH-метре ELWRO N 5123 (Польша).

Концентрацию гемоглобина в крови и растворах контролировали при помощи гемоглобинцианидного метода. Применяли стандартный набор реактивов ООО «Агат-мед» (Россия). Число эритроцитов в крови подсчитывали в камере Горяева [13]. Гематокрит определяли путем центрифугирования образцов крови в гепаринизированных капиллярах (750 g, 30 мин). Центрифугирование проводили в специальном гематокритном роторе (центрифуга MPW-310, Польша). На основании полученных значений рассчитывали средноклеточный объем (MCV), средноклеточное содержание (MCH) и средноклеточную концентрацию гемоглобина (MCHC) [13]. Концентрацию нуклеотидтрифосфатов (НТФ) в эритроцитах определяли при помощи неферментативного метода Сейца [14].

Величину P<sub>50</sub> и коэффициент Хилла (n) рассчитывали по кривым кислородного насыщения. Эффект Бора (r) оценивали по уравнению Дилла:  $r = \Delta \lg P_{50} / \Delta pH$ . Результаты представлены как  $m \pm M$ . Статистическая обработка проведена с применением t-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Гипоксия не оказывает существенного влияния на кислородную емкость крови животных. Концентрация гемоглобина и число эритроцитов остается на уровне контрольных значений (табл. 1). Имеющиеся различия не являются статистически достоверными. Гематокритное число, напротив, претерпевает очевидные изменения. В сравнении с контрольной группой рыб наблю-

Т а б л и ц а 1. Гематологические характеристики крови бычка-кругляка в норме и в условиях экспериментальной гипоксии, n = 8

Показатели	Условия эксперимента	
	Нормоксия	Гипоксия
Гемоглобин, г л <sup>-1</sup>	45,5 ± 3,2	51,1 ± 2,9
Эритроциты, (10 <sup>12</sup> ) л <sup>-1</sup>	1,04 ± 0,13	1,16 ± 0,04
Гематокрит, %	20,6 ± 1,6	28,5 ± 1,1**
МСН, пг	45,7 ± 3,1	44,1 ± 2,6
МСНС, %	22,4 ± 0,6	17,9 ± 0,9***
MCV, мкм <sup>3</sup>	204,6 ± 14,0	245,4 ± 4,6*

Примечание: тут и в табл. 2 различия достоверны при \* p < 0,05; \*\* при p < 0,01; \*\*\* при p < 0,001.

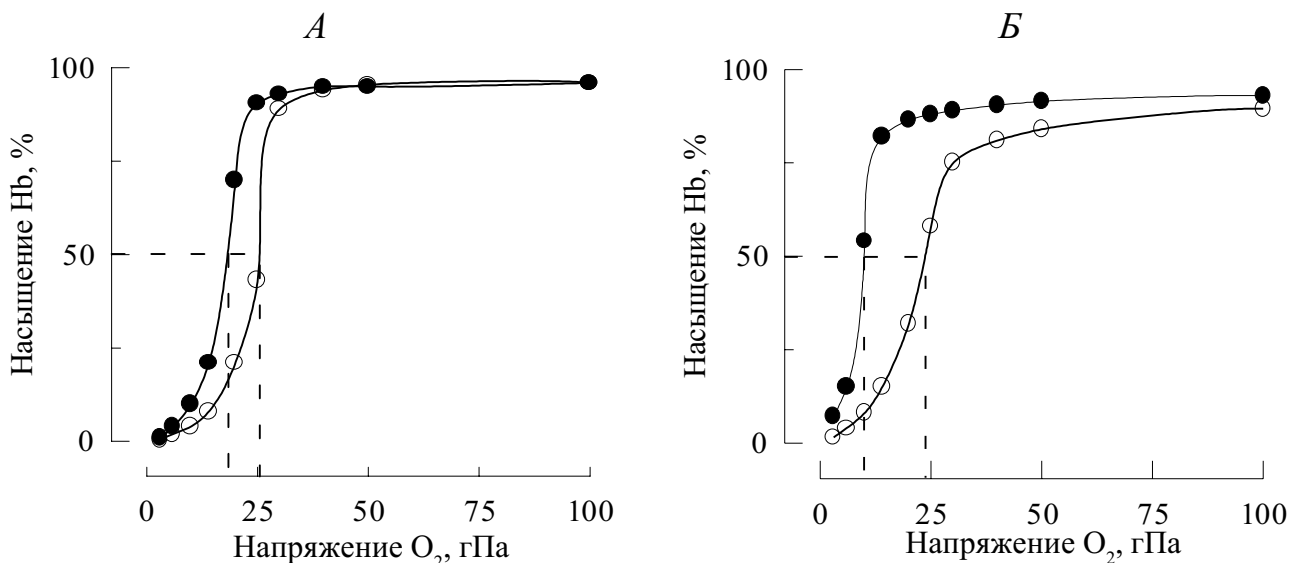


Рис. 1. Кривые оксигенации для цельных гемолізатов бычка-кругляка в норме (А) и в условиях экспериментальной гипоксии (Б); ● рН 8,3; ○ рН 7,8.

дается увеличение значений данного показателя на 38,3%. Расчет эритроцитарных индексов показал, что MCV при этом повышается на 19,9%, а MCHC снижается на 20,1%. Содержание же гемоглобина в клетке (MCH) остается неизменным. Такое соотношение процессов указывает на набухание (свелинг) циркулирующих эритроцитов, что может быть связано с гидратацией их цитоплазмы.

Случаи свелинга клеток красной крови в условиях внешней гипоксии были описаны ранее для радужной форели [15]. В основе данного явления лежит трансмембранный обмен  $Na^+/H^+$ , который индуцируется повышением концентрации катехоламинов в крови [16]. Выход  $H^+$  из клетки предотвращает значительное изменение рН эритроцитов в условиях плазменного ацидоза, что способствует нормальному функционированию его молекулярных систем, прежде всего гемоглобина. Одновременно происходит поступление  $Na^+$  в клетку, что повышает осмотическое давление и сопровождается оводнением эритроцита. По-видимому, эти процессы и определяли увеличение

объема клеток красной крови у скорпены в условиях экспериментальной гипоксии.

Кривые кислородного насыщения гемолізатов бычка-кругляка в условиях экспериментальной гипоксии смещаются влево, что отражает увеличение сродства гемоглобина к кислороду (рис. 1). Форма кривых приближается к гиперболе. Параллельно значительно возрастает чувствительность гемоглобина к рН (табл. 2). Величина  $P_{50}$ , отражающая сродство гемоглобина к кислороду, в условиях гипоксии снижается на 21,8%. Коэффициент Хилла падает на 30,5%, что указывает на снижение степени кооперативного взаимодействия между субъединицами в молекуле гемоглобина. Эффект Бора, рассчитанный по уравнению Дилла для диапазона рН 7,5–8,3 возрастает в 3,2 раза. Одновременно отмечается появление эффекта Рута. Это выражается в том, что при снижении рН (8,3→7,5) насыщение гемолізатов кислородом при  $P_{O_2}$  100 гПа уменьшалось на  $4,63 \pm 1,21\%$ . У рыб контрольной группы подобного эффекта не наблюдали.

Рассмотренные выше изменения респиратор-

Т а б л и ц а 2. Влияние экспериментальной гипоксии на характеристики связывания кислорода гемолізатами бычка-кругляка,  $n = 8$

Показатели	Условия эксперимента	
	Нормоксия	Гипоксия
$P_{50}$ , гПа (рН 8,3)	$15,6 \pm 0,8$	$12,2 \pm 0,7^{**}$
Коэффициент Хилла (рН 8,3)	$2,49 \pm 0,06$	$1,73 \pm 0,07^{***}$
Эффект Бора (рН 8,3→7,5)	$-0,22 \pm 0,06$	$-0,70 \pm 0,04^{***}$
Эффект Рута (при 100 гПа)	–	$4,63 \pm 1,21$

ных характеристик гемоглобина бычка-кругляка в условиях гипоксии носят явно адаптивный характер и имеют два важных следствия:

- рост сродства гемоглобина к кислороду облегчает его насыщение в условиях низкого  $P_{O_2}$  в среде;

- повышение чувствительности гемоглобина к рН способствует его деоксигенации на тканевом уровне, особенно в условиях внешнего ацидоза.

Подобная стратегия отмечена для рыб, адаптированных к существованию в среде с низким содержанием кислорода [17].

Гемоглобин бычка-кругляка был разделен при помощи электрофореза в ПААГе на четыре компонента: два основных ( $F_1$  и  $F_2$ ) и два минорных ( $M_1$  и  $M_2$ ). Относительная электрофоретическая подвижность  $F_1$  и  $F_2$  составила соответственно  $0,224 \pm 0,004$  и  $0,254 \pm 0,003$ , а  $M_1$  и  $M_2$  –  $0,198 \pm 0,004$  и  $0,272 \pm 0,003$ . Гипоксия не оказывает статистически значимого влияния на число компонентов и их подвижность. Соотношение же фракций в гемоглобиновой системе претерпевает выраженные изменения. Это видно из результатов денситометрирования электрофореграмм (рис. 2). Уровень  $F_1$  снижается на 26,8%, а  $F_2$  – повышается на 41,8% (табл. 3).

Отмечено, что гемоглобиновая система рыб может активно перестраиваться путем изменения числа компонентов и содержания белка в них. Подобные реакции отмечены при адаптации к температуре [18], гипоксии [7] и другим факторам. При этом в некоторых случаях изменения происходят весьма быстро (несколько часов) и наблюдаются как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* [19]. Они, по-видимому, связаны с конформационными переходами. В некоторых слу-

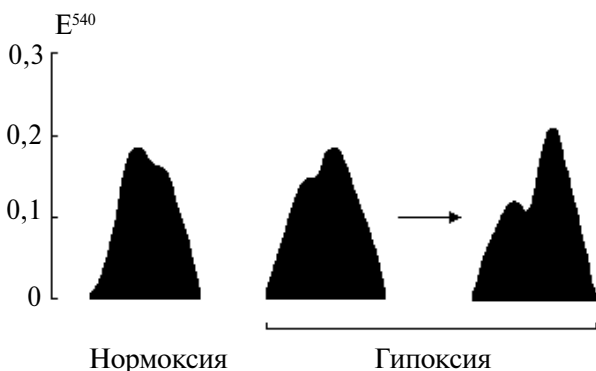


Рис. 2. Денситограммы гемоглобиновой системы бычка-кругляка в норме и при экспериментальной гипоксии (показаны минимальные и максимальные перестройки гемоглобиновой системы у опытной группы рыб).

Таблица 3. Соотношение компонентов в гемоглобиновой системе бычка-кругляка в условиях нормоксии и гипоксии,  $n = 8$

Фракции, %	Условия эксперимента	
	Нормоксия	Гипоксия
$F_1$ (%)	$61,0 \pm 1,3$	$44,7 \pm 2,3^{***}$
$F_2$ (%)	$39,0 \pm 1,3$	$55,3 \pm 2,3^{***}$

Примечание: \*\*\* различия достоверны при  $p < 0,001$ .

чаях отмечается активное участие кроветворной ткани, приводящее к появлению в крови новой популяции эритроцитов с измененной гетерогенной структурой гемоглобина [8].

Для определения функционального значения перестроек гемоглобиновой системы бычка-кругляка в условиях гипоксии компоненты  $F_1$  и  $F_2$  были выделены путем элюирования участков электрофореграмм. Полученные образцы использовали для построения кривых оксигенации (рис. 3). Показано, что  $F_2$  имеет более высокое сродство к кислороду и повышенную чувствительность к рН. При рН 8,3 кривые оксигенации его располагаются левее, чем у  $F_1$ . Закисление инкубационной среды (рН 8,3→7,5) приводит к более значительному смещению кривых вправо. Количественные показатели приведены в табл. 4. В сравнении с  $F_1$  величина  $P_{50}$  для  $F_2$  в 2,8 раза ниже. Более низкие значения имеет и коэффициент Хилла. Различия составляют 36,5%. Эффект Бора для  $F_2$  в 4,8 раза выше. Данный компонент обладает также эффектом Рута, тогда как у  $F_1$  он отсутствует.

Известно, что коррекция сродства гемоглобина к кислороду у рыб может осуществляться тремя основными путями: изменением концентрации органических фосфатов в клетке, качественными или количественными перестройками в гемоглобиновой системе, регуляцией величины рН внутриэритроцитарной среды (трансмембранный  $Na^+/H^+$  обмен) [20].

АТФ и ГТФ являются основными аллостерическими регуляторами сродства гемоглобина к кислороду у рыб [21]. Повышение концентрации их в клетке приводит к росту значений  $P_{50}$ . В настоящих экспериментах суммарный уровень нуклеотидтрифосфатов (НТФ) в эритроцитах не изменяется: у рыб контрольной группы он составил  $8,12 \pm 0,39$  ммоль·л<sup>-1</sup> Нб, опытной –  $7,63 \pm 0,44$  ммоль·л<sup>-1</sup> Нб суспензии клеток. Отсутствие изменений вероятно связано с тем, что НТФ не могут одновременно повысить сродство гемоглобина к кислороду и чувствительность его к рН, что важно при адаптации к гипоксии. Согласно опубликованным данным, при повыше-

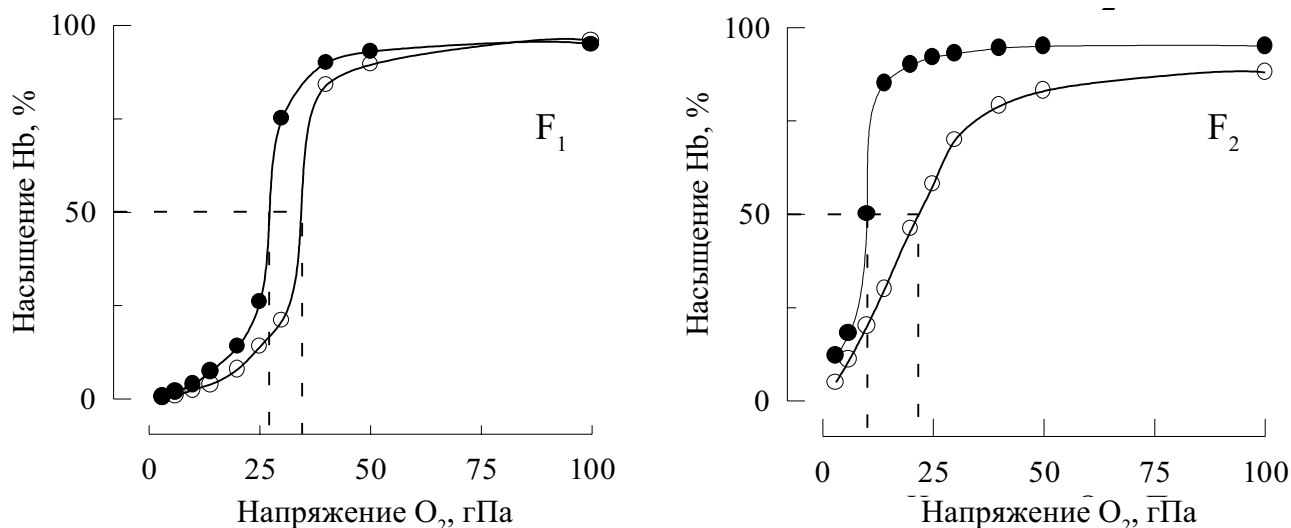


Рис. 3. Кривые оксигенации для отдельных компонентов гемоглибиновой системы бычка-кругляка, ● рН 8,3; ○ рН 7,8.

Таблица 4. Характеристика способности отдельных компонентов гемоглибиновой системы бычка-кругляка к связыванию кислорода, n = 5

Показатели	Фракции гемоглибина	
	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>
P <sub>50</sub> , гПа (рН 8,3)	21,5 ± 1,9	7,74 ± 0,98***
Коэффициент Хилла (рН 8,3)	2,60 ± 0,09	1,65 ± 0,08***
Эффект Бора (рН 8,3→7,5)	-0,17 ± 0,03	-0,81 ± 0,09***
Эффект Руга (при 100 гПа)	–	12,8 ± 1,4

Примечание: \*\*\* различия достоверны при p < 0,001.

нии концентрации НТР в эритроцитах растет только показатель эффекта Бора, сродство же к кислороду снижается. При понижении концентрации НТР изменения имеют противоположный характер [22].

Трансмембранный Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> обмен в эритроцитах бычка-кругляка очевидно имеет место. Об этом свидетельствует свелинг циркулирующих клеток красной крови. Однако данная реакция могла направленно повлиять только на сродство гемоглибина к кислороду, но не на чувствительность его к рН.

Различия в функциональных характеристиках компонентов F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub>, а также рассмотренные выше перестройки в системе гемоглибина, напротив, хорошо объясняют изменения респираторных характеристик цельного гемолизата бычка-кругляка при адаптации к условиям экспериментальной гипоксии. По-видимому данный процесс и является определяющим.

Таким образом, система гемоглибина бычка-кругляка способна активно перестраиваться при адаптации к внешней гипоксии. Эти перестрой-

ки направлены на повышение сродства гемоглибина к кислороду и увеличение его чувствительности к рН. Они связаны с наличием в гетерогенной системе гемоглибина особого компонента, функциональное значение которого повышается в условиях дефицита кислорода.

### HAEMOGLOBIN SYSTEM OF BLACK SEA ROUND GOBY UNDER EXPERIMENTAL HYPOXIA CONDITIONS

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

<sup>1</sup>Institute of Biology of Southern Seas, National Academy of Sciences of Ukraine, Sevastopol;

<sup>2</sup>Tavrishesky National University, Simferopol; e-mail: soldatov@ibss.iuf.net

#### S u m m a r y

Haemoglobin of the Black Sea round goby (*Neogobius melanostomus* P.) resisting to external hypoxia was studied. Haemoglobin of this species was frac-

tionated into 4 components (2 minor and 2 major ones) by the disk-electrophoresis in polyacrylamid gel. The major fractions were eluted and their respiration parameters were investigated. One of them showed high affinity for O<sub>2</sub> (P<sub>50</sub> 5.81 ± 0.74 mm Hg at pH 8.3) and heightened sensibility to pH (Bohr effect amounted to -0.81 ± 0.09 at pH of 8.3→7.5) simultaneously. Moreover, an acidosis incubation medium (pH 8.3→7.5) decreased its O<sub>2</sub> saturation by 12.8 ± 1.4 % (Root effect). The level of this fraction increased by 41.8 % (*p* < 0.001) under the experimental hypoxia conditions (seawater O<sub>2</sub> concentration range was 1.7–1.8 mg l<sup>-1</sup>; exposition – 10 days). It affected blood respiration parameters and reflected the process of adaptation of this species to oxygen deficiency. The nucleotidtriphosphate level in red blood cells did not change. Swelling of circulated erythrocytes was observed simultaneously.

**К е у w o r d s:** hypoxia, haemoglobin system, haemoglobin affinity for oxygen, Bohr and Root effects, erythrocytes, nucleotidtriphosphates, *Neogobius melanostomus* P.

1. Берлинский Н. Н., Дыханов Ю. М. // Экология моря. 1991. **38**. С. 11–15.
2. Фесюнов О. Е., Назаренко М. Ф. // Там же. **37**. С. 20–26.
3. Schweitzer-Stenner R., Bosenbeck M., Dreybrodt W. // Biophys. J. 1993. **64**. P. 1194–1209.
4. Huber F., Braunitzer G. // Biol. Chem. Hoppe Seyler. 1989. **370**. P. 831–838.
5. Fago A., Carratore V., Di Prisco G. et al. // J. Biol. Chem. 1995. **270**. P. 18897–18902.
6. Di Prisco G., D'Avino R., Camardella L., Caruso C. et al. // Polar. Biol. 1990. **10**. P. 269–274.
7. Marinsky C. A., Houston A. H., Murad A. // Can J. Zool. 1990. **68**. P. 884–888.
8. Солдатов А. А. // Журн. эволюц. биохим. физиол. 1988. **24**, № 4. С. 601–603.
9. Shulman G. E., Stolbov A. Y., Soldatov A. A. et al. // 33rd Eur. Mar. Biol. Symp. 7–11 Sept. 1998. Abstr. Wilhelmshaven (Germany). 1998. P. 93.
10. Солдатов А. А. // Гидробиол. журн. 2003. **39**, № 1. С. 51–63.
11. Маурер Г. Диск-электрофорез (теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле). Москва: Мир. 1971. 247 с.
12. Крикливый И. А., Рекун Г. М., Артюх В. П., Стародуб Н. Ф. / Методы молекулярной биологии. К.: Наук. думка. 1979. С. 191–201.
13. Золотницкая Р. П. / Лабораторные методы исследования в клинике (справочник). Москва: Медицина. 1987. С. 106–148.
14. Терехов Н. Т., Петров М. М. Применение консервированных эритроцитов. Киев: Здоровье. 1983. 141 с.
15. Plante S., Chabot D., Dutil J. // J. Fish Biol. 1998. **53**, N 6. P. 1342–1356.
16. Perry S. F., Thomas S. // J. Comp. Physiol. 1991. **161B**. P. 489–497.
17. Lowe T. E., Brill R. W., Cousins K. L. // Mar. Biol. 2000. **136**. P. 1087–1098.
18. Brix O., Clements K. D., Wells R. M. // J. Comp. Physiol. 1999. **169**, N 4/5. P. 329–334.
19. Houston A. H., Rupert R. // Can. J. Zool. 1976. **54**, N 10. P. 1734–1741.
20. Солдатов А. А. // Журн. эвол. биох. физиол. 2003. **39**, № 2. С. 121–127.
21. Val A. L., Lessard J., Randall D. J. // J. Exp. Biol. 1995. **198**, N 2. P. 305–310.
22. Pellegrini M., Giardina B., Olianias A. et al. // Eur. J. Biochem. 1995. **234**. P. 431–436.

Получено 22.08.2003