

УДК 577.115.346

## БІЛКОВИЙ І ЛІПІДНИЙ СКЛАД СИРОВАТКИ КРОВІ ТА ПЕЧІНКИ АНТАРКТИЧНИХ РИБ

В.М. Войціцький<sup>1</sup>, С.В. Хижняк<sup>1</sup>, А.Е. Павлик<sup>1</sup>, Л.Г. Манило<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 01033, Київ, вул. Володимирська, 60, [vmv@biocc.univ.kiev.ua](mailto:vmv@biocc.univ.kiev.ua)

<sup>2</sup>Національний науково-природничий музей (ННПМ) НАН України, Зоологічний музей ім. Н.Н. Щербака, [manilo@museum.kiev.org.ua](mailto:manilo@museum.kiev.org.ua)

Проведено порівняльний аналіз вмісту білків і ліпідів сироватки крові та печінки різних видів антарктичних риб, яких було виловлено під час роботи 9-ї та 11-ї Української антарктичної експедиції в районі Аргентинських островів. Виявлено наявність низькомолекулярного білку (глікопротеїну) з молекулярною масою 13 кДа у *N. coriiceps*, *P. charcoti*, *C. aceratus* і його відсутність у *T. bernacchii* та *G. gibberifrons*. Встановлені для різних видів відмінності у ліпідному й білковому складі сироватки крові та клітин печінки свідчать про характерні особливості метаболізму, що може пояснюватись видовою відмінністю, а також різними шляхами адаптації до низькотемпературних умов.

**Белковый и липидный состав сыворотки крови и печени антарктических рыб.** В.М. Войццкий, С.В. Хижняк, А.Е. Павлик, Л.Г. Манило

Проведен сравнительный анализ содержания белков и липидов сыворотки крови и печени разных видов антарктических рыб, выловленных во время 9-й и 11-й Украинских антарктических экспедиций в районе Аргентинских островов. Выявлено присутствие низкомолекулярного белка (гликопротеина) с молекулярной массой 13 кДа у *N. coriiceps*, *P. charcoti*, *C. aceratus* и его отсутствие у *T. bernacchii* и *G. gibberifrons*. Выявленные у разных видов антарктических рыб отличия в составе белков и липидов сыворотки крови и печени свидетельствуют об особенностях метаболизма, что может обуславливаться видовым отличием, а также разными путями адаптации к низкотемпературным условиям.

**Proteins and lipids of the blood serum and the liver of Antarctic fishes.** V.Voitsitsky, S.Khyzhnyk, A.Pavlyk, L.Manilo

It was realized the comparative analysis of protein and lipid contents of the blood serum and the liver of the different species of antarctic fishes. The materials were collected during the 9-th and 11-th Ukrainian antarctic expedition in Argentine islands region. We have defined the presence of the low-molecular protein (glycoprotein) with molecular weight 13kDa in *N. coriiceps*, *P. charcoti*, *C. aceratus* and its absence in *T. bernacchii* and *G. gibberifrons*. It was determined that Antarctic fishes is characterized by the features of lipids' component of the blood serum and liver cells, which may determine the features of its metabolism. Established differences of protein and lipid components of the different species of Antarctic fishes may be interpreted as the species difference, also as the different ways of adaptation to low temperature conditions.

**Key words:** adaptation, antarctic fishes, blood serum, proteins, lipids.

### Вступ

Антарктичним риbam властива низка фізіолого-біохімічних особливостей адаптації до низьких температур: полімеризація тубулінових молекул у мікротрубочки [1], висока каталітична активність ферментів, що компенсує ефект низьких температур [2]. На додачу до набутих специфічних фізіолого-біохімічних властивостей деякі види *Notothenioidae* втратили протягом еволюції певні ознаки, наприклад, риби родини *Channichthyidae* – властивість

експресувати гемоглобін та міоглобінові білки [3, 4, 5]. Здатність риб пристосовуватись до низьких температурних умов пов'язують також з еволюцією глікопептидних антифризних білків, які в найбільшій кількості містяться в крові та міжклітинній рідині [6].

Адаптація – це здатність організмів пристосовуватись до умов довкілля, які змінюються з одночасним підвищенням ймовірності виживання та самовідтворення. У свою чергу адаптація має місце лише тоді, коли організми проявляють стійкість, а саме – здатні протистояти дії несприятливих чинників без порушень своєї життєдіяльності. Це фактор надійності організмів як живої системи. Стійкість організмів забезпечується насамперед сукупністю реакцій обміну речовин і перетворення енергії. Істотними є також генетичні та фізіологічні механізми підтримки стійкості організмів, сприйняття дії чинників довкілля та адекватна реакція на цю дію [7].

Біохімічна адаптація спричиняє пристосування хімічного складу, обміну речовин і перетворення енергії стосовно умов існування. Наслідком біохімічної адаптації є фізіологічна адаптація – сукупність реакцій організмів, які забезпечують пристосування. Виходячи з цього, мета даної роботи полягає у порівняльній оцінці білкового й ліпідного складу сироватки крові та печінки різних видів антарктичних риб.

### Матеріали та методи дослідження

Роботу виконано в рамках Державної програми проведення дослідницьких робіт в Антарктиці на 2002–2010 роки за сприяння НАНЦ України.

Матеріал відібрано під час 9-ї та 11-ї Українських антарктичних експедицій у район Аргентинських островів (поблизу станції «Академік Вернадський»). Після ідентифікації та повного біологічного аналізу у риб відбирали кров із хвостової вени. Досліджено особини наступних видів: *Notothenia coriiceps*, *Trematomus bernacchii*, *Gobionotothen gibberifrons* (родина Nototheniidae), *Chaenocephalus aceratus* (родина Channichthyidae) та *Parachaenichthys charcoti* (родина Bathydraconidae) (загалом 73 особини).

Досліджені види – бентичні, що мешкають на глибинах від незначних до 700–800 м. Всі оброблені екземпляри представлені статевозрілими особинами обох статей. Кров відбирали у найбільш активний період їх життєвого циклу (грудень–січень).

Об'єкт досліджень – сироватка крові та гомогенні препарати печінки риб. Сироватку крові отримували згідно [8], її заморожували та зберігали при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ . Препарати печінки отримували згідно [8]. Білок визначали згідно [9]. Білки розділяли за використання SDS-електрофорезу у 10 або 15% поліакриламідному гелі (ПААГ) [10]. Вміст загальних ліпідів (ЗЛ), триацилгліцеролів (ТГ), фосфоліпідів (ФЛ), холестеролу (ХЛ) визначали за використання набору реактивів фірми «ІНТЕРО, Ltd». Кожне вимірювання проводили у трьох повторах.

Експериментальні дані оброблено загальноприйнятними методами варіаційної статистики [11].

### Результати досліджень

Результати SDS-електрофорезу сироватки крові антарктичних риб у 10% ПААГ свідчать, що білковий спектр для різних видів відрізняється (рис. 1 А). *S. aceratus* та *N. coriiceps* характеризуються наявністю білків мол. маси від 95 до 170 кДа. Кількісний вміст та різноманітність білків цього діапазону для *T. bernacchii* є відносно меншими. Як відомо, у риб досліджуваних видів наявні ферменти, а саме аспаратамінотрансфераза (95 кДа) та аланінамінотрансфераза (114 кДа) з високою каталітичною активністю, що розглядається як компенсаторний чинник на дію низьких температур [12]. Крім того, у всіх пробах сироватки крові виявлено наявність білків з мол. масами 72 кДа та 55 кДа. Однак лише для *T. bernacchii* характерна наявність білка з мол. масою 69 кДа (рис. 1, А). На відміну від ссавців, у сироватці крові риб відносний вміст альбуміну (67 кДа) до загального вмісту білків [1] незначний.

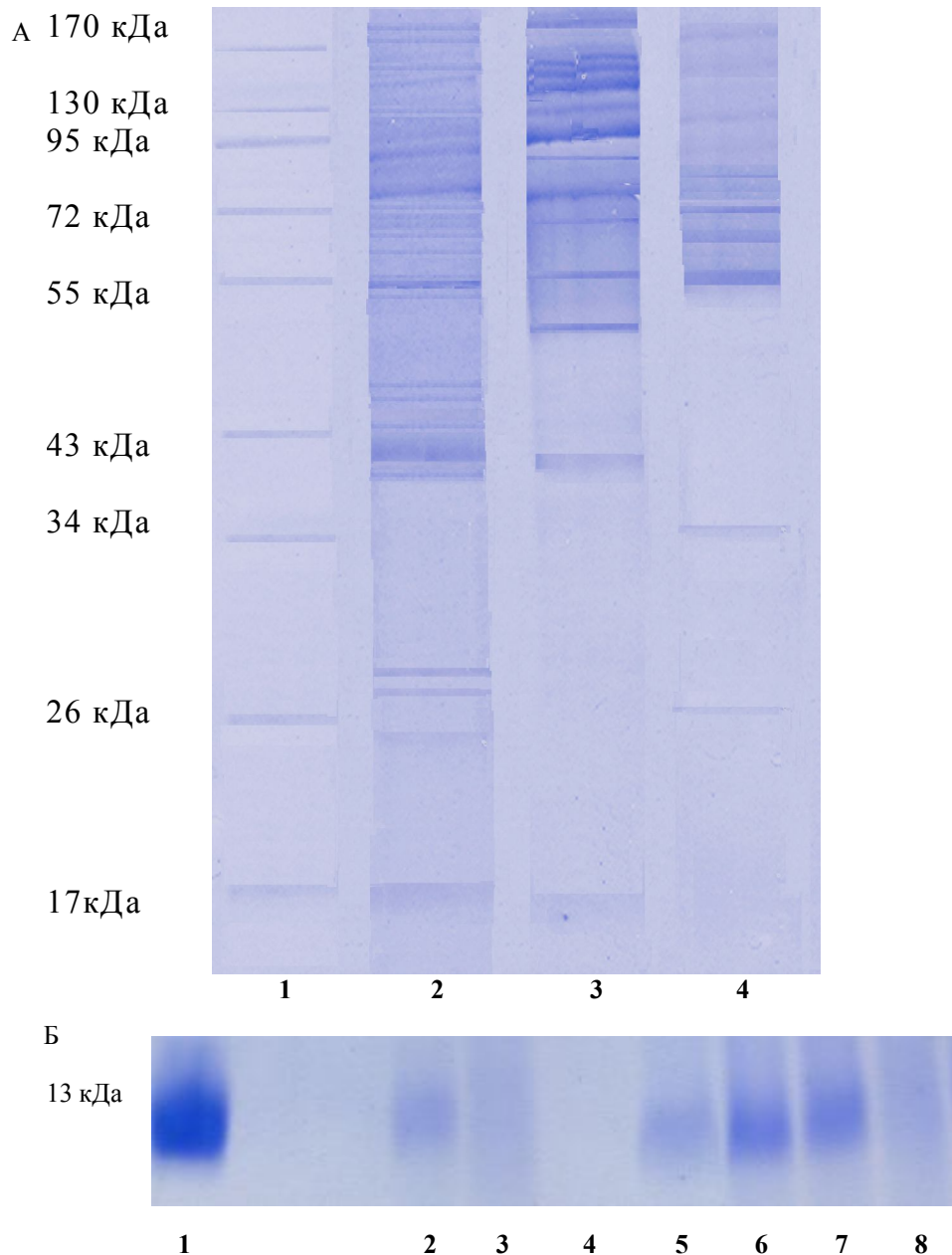


Рис. 1. SDS-електрофорез білків сироватки крові антарктичних риб у 10%-ному поліакриламідному гелі (А) (типовий дослід):

1 – суміш стандартів молекулярної маси (BioRad, США; Fermentas, Литва), 2 – препарати сироватки крові *N. coriiceps*, 3 – препарати сироватки крові *C. aceratus*, 4 – препарати сироватки крові *T. bernacchii*

та у 15% поліакриламідному гелі (Б) (типовий дослід):

1 – лізоцим (М.м. = 13 кДа), 2 – препарати сироватки крові *P. charcoti*, 3, 8 – препарати сироватки крові *T. bernacchii*, 4 – препарати сироватки крові *G. gibberifrons*, 5 – препарати сироватки крові *C. aceratus*, 6, 7 – препарати сироватки крові *N. coriiceps*

Найбільші відмінності спостерігаються для низькомолекулярної фракції білків сироватки крові досліджуваних видів риб. *N. coriiceps* характеризується наявністю білків з мол. масами 28, 27, 25 і 17 кДа; *C. aceratus* – 17 кДа; *T. bernacchii* – 34 та 26 кДа (рис. 1, А).

Для дослідження фракції низькомолекулярних білків сироватки крові (в діапазоні 10–17 кДа) використовували SDS-електрофорез у 15% ПААГ. Відомо [13], що низькомолекулярним глікопротеїнам (10–13 кДа) притаманні антифризні властивості. У досліджуваному діапазоні лише для *N. coriiceps*, *P. charcoti* та *C. aceratus* характерна присутність низькомолекулярного білка з мол. масою 13 кДа (рис. 1, Б). У крові *T. bernacchii* та *G. gibberifrons* подібних білків не виявлено. Відомо [13], що у крові *T. bernacchii* глікопротеїн-антифриз міститься у трьох формах з мол. масою 10,5; 17 та 21,5 кДа. Однак отримані нами результати не підтвердили цей факт.

Результати SDS-електрофорезу білків препаратів печінки у 10 % ПААГ свідчать, що їх спектр для різних видів антарктичних риб також відрізняється (рис. 2). У високомолекулярному діапазоні лише для *C. aceratus* білки характеризується найбільшою різноманітністю. Водночас для *T. bernacchii* спостерігаємо найбільшу різноманітність білків у діапазоні 50–60 кДа. У всіх пробах присутні білки з мол. масами 72 кДа та 55 кДа, а також білок 25-26 кДа. Виявлені особливості білкового складу сироватки крові та печінки антарктичних риб можна пояснити як видовою відмінністю, так і різними шляхами адаптації до низькотемпературних умов.

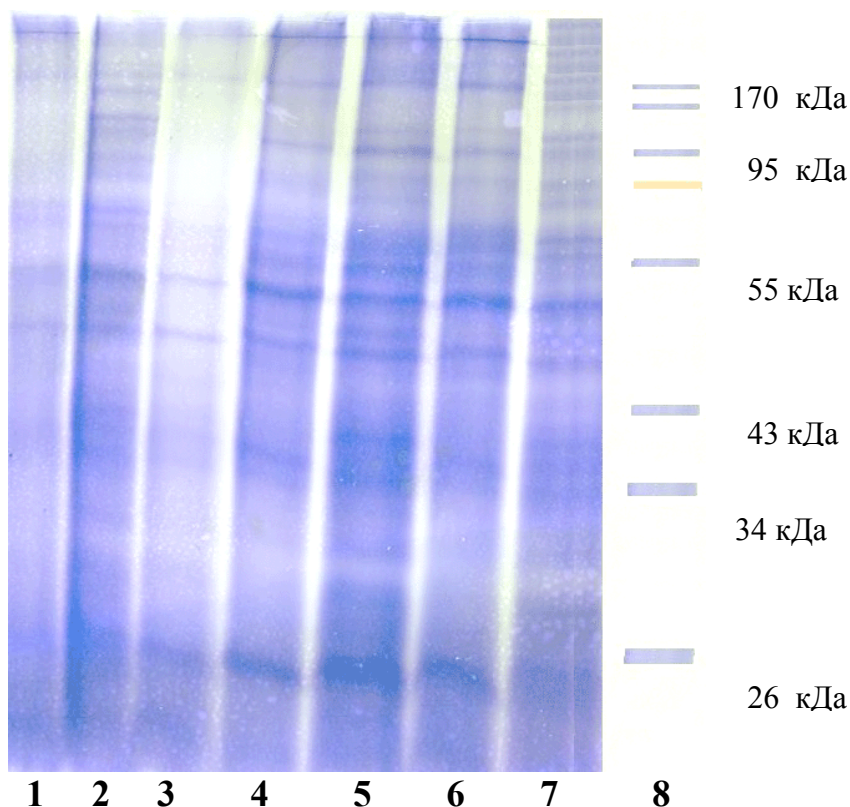


Рис. 2. SDS-електрофорез білків печінки антарктичних риб у 10%-ному поліакриламідному гелі (типовий дослід): 4, 6 – препарати печінки *N. coriiceps*, 2, 7 – препарати печінки *C. aceratus*, 5 – препарати печінки *T. bernacchii*, 8 – суміш стандартів молекулярної маси (BioRad, США; Fermentas, Литва)

Суттєва роль у перебігу обмінних процесів та у структуруванні компонентів живих організмів належить сполукам ліпідної природи [14]. Саме тому ліпідний обмін є однією з найнеобхідніших ланок у забезпеченні загальних метаболічних механізмів підтримання гомеостазу. Сироватка крові відноситься до найважливіших пулів ліпідних сполук, зокрема, їх транспортних форм. У зв'язку з цим вміст ліпідів сироватки крові є інформативним показником при оцінці загального ліпідного обміну.

Головними ліпідними компонентами клітин різних тканин є фосфоліпіди (ФЛ), холестерол (ХС) та триацилгліцероли (ТГ) [14]. Результати дослідження вмісту ліпідів у сироватці крові представлено в табл. 1. Отримані результати свідчать, що *T. bernacchii* характеризуються зниженим вмістом ЗЛ та ФЛ порівняно із іншими видами риб. Водночас вміст ТГ та ХС для всіх видів риб майже однаковий. Величина співвідношення ХС/ФЛ (показник, який характеризує структурно-функціональну активність мембран) для *N. coriiceps* і *C. aceratus* становить 1,76 та 1,74 відповідно, а для *T. bernacchii* – 2,44.

Таблиця 1. Вміст загальних ліпідів (ЗЛ) триацилгліцеролів (ТГ), холестеролу (ХЛ) та фосфоліпідів (ФЛ) сироватки крові антарктичних риб,  $M \pm m$

Види риб	ЗЛ, г/л	ТГ, ммоль/л	ХЛ, ммоль/л	ФЛ, ммоль/л
<i>N. coriiceps</i> (n = 22)	5,10±0,38	7,82±0,61	5,21±0,31	2,96±0,11
<i>T. bernacchii</i> (n = 5)	3,52±0,36*	7,61±0,70	4,75±0,28	1,95±0,10*
<i>C. aceratus</i> (n = 11)	4,65±0,40	7,83±0,66	4,81±0,34	2,76±0,16

\* $p \leq 0,05$  – відносно відповідного показника для інших видів риб;  
n – кількість особин.

Дослідження вмісту ліпідів у тканинах печінки показало (табл. 2), що вміст ХС не відрізняється, а вміст ТГ у середньому на 34% більший для *T. bernacchii* порівняно із іншими видами. Підвищений рівень ТГ може свідчити про ймовірність використання їх як додаткового джерела енергії поряд із сполуками вуглеводної природи. Відомо [15], що за екстремальних умов, до яких відносяться і умови Антарктики, механізми енергозабезпечення можуть модифікуватися і пріоритет у процесах окиснення надається ліпідам, що використовуються як енергетичні сполуки.

Таблиця 2. Вміст триацилгліцеролів (ТГ) та холестеролу (ХЛ) у тканинах печінки антарктичних риб,  $M \pm m$

Види риб	ТГ (мкг ліпиду/мг білка)	ХС (мкг ліпиду/мг білка)
<i>N. coriiceps</i> (n = 11)	243,7±6,1	44,1±0,87
<i>T. bernacchii</i> (n = 5)	369,1±7,2*	43,11±0,91
<i>C. aceratus</i> (n = 8)	270,2±7,5	41,50±0,55

\* $p \leq 0,05$  – відносно відповідного показника для інших видів риб;  
n – кількість особин.

Таким чином, отримані результати свідчать, що *T. bernacchii* характеризується певними особливостями ліпідного складу. Це може відбитися на структурі та функціях клітинних мембран, а також свідчить про можливість використання ТГ як енергетичних субстратів.

## Висновки

Виявлені відмінності у білковому та ліпідному складі (сироватки крові та клітин печінки) для різних видів антарктичних риб вказують на існування особливостей протікання енергетичних та метаболічних процесів, пов'язаних із пристосуванням до умов Антарктики.

## Література

1. **Detrich H.W.** Polymerization of microtubule proteins from Antarctic fish // *Biology of Antarctic Fish*. Berlin: Springer-Verlag. – 1991. – P. 248–262.
2. **Fields P.A., Somero G.N.** Hot-spots in cold adaptation: Localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A<sub>4</sub> orthologs of Antarctic notothenioid fishes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – Vol. 95. – P. 243–282.
3. **Cocca E., Ratnayakelecamwasam M., Parker S.K., Camardella L., Ciaramella M., Di Prisco G. and Detrich H.W.** Do the gemoglobinless icefishes have globin genes? // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1997. – Vol. 118 A. – P. 1027–1030.
4. **Sidell B.D., Vayda M.E., Small D.J., Moylan T.J., Londraville R.L., Yuan M.L., Rodnick K.J., Eppley Z.A. and Costello L.** Variable expression of myoglobin among the hemoglobinless Antarctic icefishes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1997. – Vol. 94. – P. 3420–3424.
5. **Somero G.N., Fields P.A., Hofmann G.E., Weinstein R.B. and Kawall H.** Cold adaptation and stenothermy in Antarctic notothenioid fishes: what has been gained and what has been lost? // *Fishes of Antarctica. A Biological Overview*. Italia: Springer-Verlag. – 1998. P. 97–109.
6. **Arthur L. De Vries.** The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the freezing avoidance of Antarctic fishes // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1988. – Vol. 90B, No.3. – P. 611–621.
7. **Екологічна біохімія:** Навч. посібник / Ісаєнко В.М., Войціцький В.М., Бабенюк Ю.Д., Хижняк С.В., Ільїн В.М., Олійник С. А. – К.: Книжкове вид-во НАУ, 2005. – 440 с.
8. **Методы биохимических исследований.** / Под ред. Прохоровой М.–Л.: Наука, 1982.
9. **Greenberg C.S., Craddock P.R.** Rapid single-step membrane protein assay // *Clin. Chem.* – 1982. – Vol. 28, № 7. – P. 1725–1726.
10. **Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, №259. – P. 680–685.
11. **Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Войціцький В.М.** Сучасні методи біохімічних досліджень : Учбовий посібник. – К.:Фітосоціоцентр, 2001. – 424 с.
12. **Войціцький В., Хижняк С., Манило О., Павлович А.** Біохімічні показники сироватки крові риб Антарктики // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія*. – 2006. – Т. 47–48. – С. 67–68.
13. **Van der Oost R., Beyer J., Nico P.E. Vermeulen.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2003. – Vol. 13. – P. 57–149.
14. **Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Васильєв О.М.** та ін. Біохімія : Підручник. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2002. – 480 с.
15. **Хочачка П., Сомеро Дж.** Стратегия биохимической адаптации. – М.: Наука, 1977. – 292 с.