

## ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ НА СОСТОЯНИЕ КАПИЛЛЯРНОЙ СЕТИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ МОРСКИХ РЫБ

А. А. Солдатов

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

В условиях гипотермии у ряда теплолюбивых видов рыб отмечается развитие асфиксии, которая часто сопровождается гибелью посадочного материала. Эта реакция наблюдается при температурах менее 7 °С (Куликова и др. 1986; Шекк и др., 1990). В тканях происходит усиление анаэробных процессов на фоне снижения содержания аденилатов и энергетического заряда (Арсан, 1986; Гулевский и др., 2007). Данная реакция в определенной степени парадоксальна, так как развивается при снижении потребности организма в кислороде и повышении его растворимости в воде, тканевых и циркуляционных средах.

Установлено, что низкие температуры индуцируют выработку HIF-1 (hypoxia inducible factor) (Neise et al., 2006). Сравнительно недавно данный фактор был идентифицирован в плазме крови форелей (Soitamo et al., 2001). Известно, что HIF-1, наряду с другими локусами генома, экспрессируется гипоксией (Bosworth et al., 2005; Ju et al., 2007). Это означает, что гипотермия должна изменять кислородный режим тканей. Исследования, выполненные на скелетных мышцах кефали-сингиля, действительно показали, что гипотермия вызывает снижение среднемышечного напряжения кислорода, рост числа гипоксических и аноксических зон в мышечной ткани на фоне общей активизации анаэробных процессов (Солдатов, Парфенова, 2009).

Известно, что одним из наиболее эффективных механизмов коррекции тканевого  $PO_2$  являются процессы микроциркуляции. Изменение числа функционирующих капиллярных единиц в ткани влияет на площадь диффузионной поверхности, толщину диффузионного слоя и характер распределения  $PO_2$  (Шошенко и др., 1984). Можно предположить, что гипотермия вызывает негативные изменения в состоянии сосудистой стенки теплолюбивых рыб, что снижает

эффективность сосудодвигательных реакции в коррекции кислородного режима тканей. Проверке данного предположения и посвящена настоящая работа.

### Материал и оборудование

В работе использовали взрослых особей теплолюбивой хамсы (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) и холодолюбивой тюльки (*Clupeonella cultriventris*, Nordmann, 1840) обоего пола в состоянии относительного физиологического покоя (стадия зрелости гонад – II-III). Размерно-весовые характеристики для особей хамсы составляли 8,3–13,1 г, 8,4–12,7 см, для особей тюльки – 7,0–9,0 г, 6,3–8,1 см.

Эксперименты были выполнены в аквариумах вместимостью 1,5 м<sup>3</sup>. Контрольную группу рыб содержали при температуре воды 15±1 °С. В ходе опыта температуру снижали со скоростью 0,2 °С ч<sup>-1</sup> от 15 до 5 °С. После этого исследовали адаптацию к указанным температурам в течение 15 суток. Затем отбирали образцы тканей. В эксперименте каждой опытной группе рыб соответствовала контрольная. Образцы мышечной ткани отбирали из большой белой боковой (*musculus lateralis magnus*) и поверхностной красной боковой (*musculus lateralis superficialis*) мышц, расположенных позади спинного плавника. В момент отбора проб применяли уретановую анестезию (Солдатов, 2003).

Для выявления числа функционирующих (открытых) капиллярных единиц в скелетных мышцах рыб использовали безинъекционный метод Слонимского (Киселева и др., 1983). Он основан на реакции циркулирующих эритроцитов с бензидиновым реагентом: 2 г чистого бензидина, 20 мл раствора Рингера, 60 мл дистиллированной воды, 0,5 г активированного угля.

Реагент после приготовления встряхивают, фильтруют и хранят без доступа света.

Кусочки *m. lateralis magnus* и *m. lateralis superficialis* брали позади спинного плавника и помещали в бензидиновый реагент до появления окраски микрососудов. После этого их переносили в 3%-ный раствор перекиси водорода, а затем в 8%-ный раствор аммония молибденовокислого, который закрепляет окраску гемоглобина. Далее образцы тканей фиксировали в 80%-ном этаноле и рассекали на поперечные срезы (толщина 25–30 мкм) на замораживающем микротоме. Препараты просветляли в метиловом эфире салициловой кислоты и докрашивали гематоксилин-эозином. На срезах подсчитывали число капиллярных единиц.

Свежие пробы красных и белых мышц взвешивали на аналитических весах. Затем помещали их на кварцевое стекло и высушивали при 105 °С до постоянного веса. Органическое вещество, полученное после высушивания проб, растворяли в концентрированной HNO<sub>3</sub>. В растворах определяли концентрацию Ca<sup>2+</sup>. Измерения выполняли на пламенном фотометре ПАЖ-3 с использованием смеси ацетилен-воздух.

Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов проведены с применением стандартного пакета Grapher (версия 1.25). Результаты представлены в виде  $\bar{x} \pm S_x$ . Значимость различий оценивали при помощи параметрического t-критерия Стьюдента. О нормальности распределения судили по сопоставлению среднеарифметической величины и моды.

### Результаты и обсуждение

Как показали результаты наблюдений, плотность капиллярной сети в мышечной ткани хамсы и тюльки при 15 °С была близкой (рис. 1). В красных мышцах она составляла соответственно 448,1±6,5 и 421,3±10,0 единиц мм<sup>-2</sup>, а в белых 65,2±3,5 и 61,1±2,6 единиц мм<sup>-2</sup>. Понижение температуры воды в диапазоне 5–15 °С вызывало сокращение числа функционирующих капилляров в красных мышцах хамсы на 29,7% (p<0,001), а в белых на 39,3% (p<0,001). У тюльки изменения были менее выражены. Плотность капиллярной сети в красных мышцах при 5 °С была на 17,8% (p<0,001), а в белых на 20,3% (p<0,01) ниже, чем при 15 °С.

Следует отметить, что при 5 °С особи тюльки активно перемещались в аквариуме. Подвиж-

ность же особей хамсы, напротив, была крайне ограничена. Рыбы часто зависали в толще воды. Проявлялась реакция асфиксии. Особи поднимались к поверхности и захватывали ртом воздух. Отмечались единичные случаи потери координации движений. Они выражались в покачивании тела при движении.

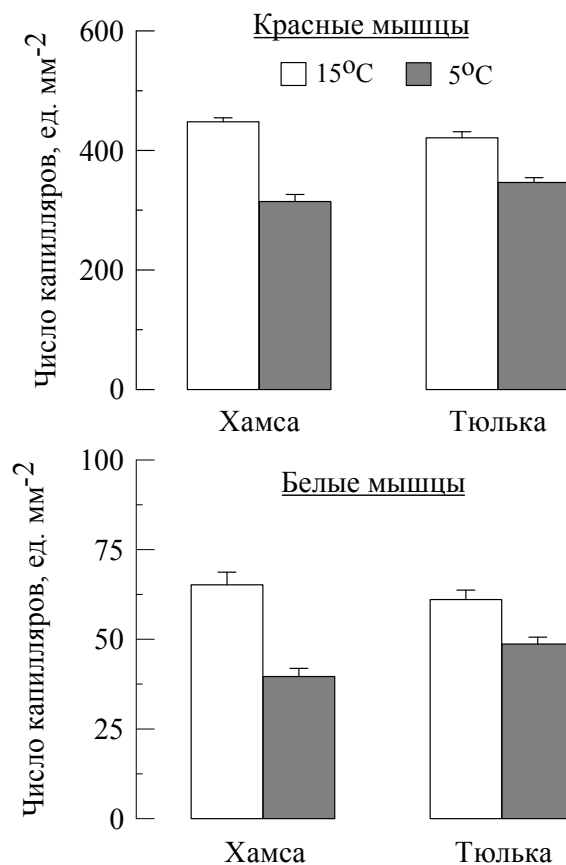


Рис. 1. Плотность капиллярной сети в скелетных мышцах хамсы и тюльки при 15 и 5 °С

Известно, что реакции перераспределения крови принимают достаточно активное участие в адаптации организма рыб к условиям среды. Наиболее выраженное действие оказывает внешняя гипоксия. В большинстве случаев она вызывает депрессорный эффект у гладкомышечной стенки сосудов многих органов (Richards et al., 1997; Olson et al., 2000; Dombkowski et al., 2006), в том числе и сосудов скелетных мышц (Schwerte et al., 2003). Это приводит к увеличению числа функционирующих капиллярных единиц.

Для проверки функциональной полноценности сосудистой сети хамсы и тюльки в условиях гипотермии был выполнен дополнительный эксперимент. Особей обоих видов помещали в гипоксические условия: в воду с концентрацией кислорода 2,6–2,7 мг л<sup>-1</sup>, что соответствует 30%

насыщения от нормального. Экспозиция составила 2 часа.

При 15 °С гипоксия вызывала рост числа функционирующих капилляров в красных и белых мышцах хамсы на 34–42% ( $p < 0,001$ ) (рис. 2). В то же время, аналогичное воздействие при 5 °С не оказывало заметного влияния на плотность капиллярной сети. В сравнении с контрольной группой различия не были статистически значимы. Утрата чувствительности к гипоксии при 5 °С, по-видимому, отражает негативное влияние гипотермии на сосудистую стенку у данного вида. В тоже время, у холо-

долюбивой тюльки при 5 °С реакция была выражена. Гипоксия вызывала увеличения числа капилляров на 46–51% ( $p < 0,001$ ).

Анализ причин негативного эффекта гипотермии на сосудистую систему скелетных мышц теплолюбивой хамсы позволил выявить значительный рост содержания  $Ca^{2+}$  в мышечной ткани у данного вида (рис. 3). Так, при 15 °С содержание  $Ca^{2+}$  в мышцах у обеих рыб было близким – 2,5–2,9 мэкв  $кг^{-1}$ . При 5 °С оно повышалось, но если у тюльки рост составил только 23,6–32,2% ( $p < 0,001$ ), то у хамсы содержание  $Ca^{2+}$  повышалось в 2,1–2,2 раза ( $p < 0,001$ ) и достигало 5,8–5,9 мэкв  $кг^{-1}$ .

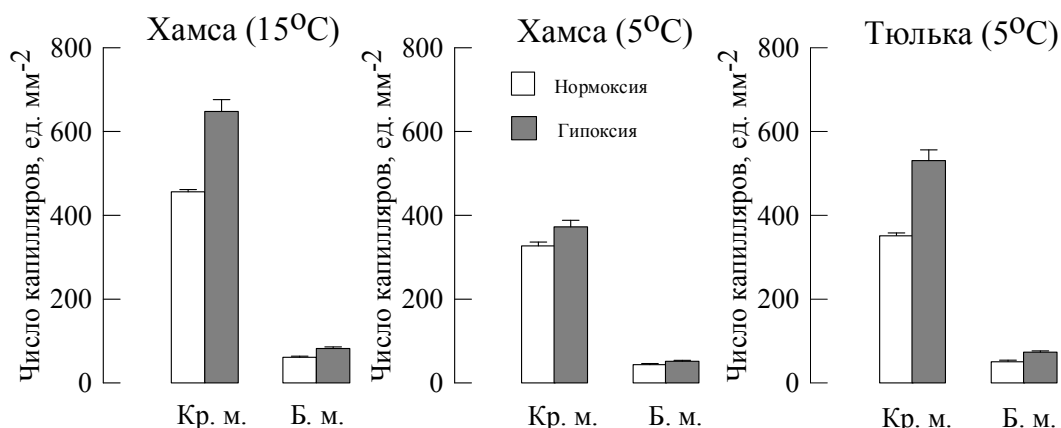


Рис. 2. Влияние внешней гипоксии на плотность капиллярной сети в скелетных мышцах хамсы и тюльки при различных температурах воды (Кр. м. – красные мышцы; Б. м. – белые мышцы)

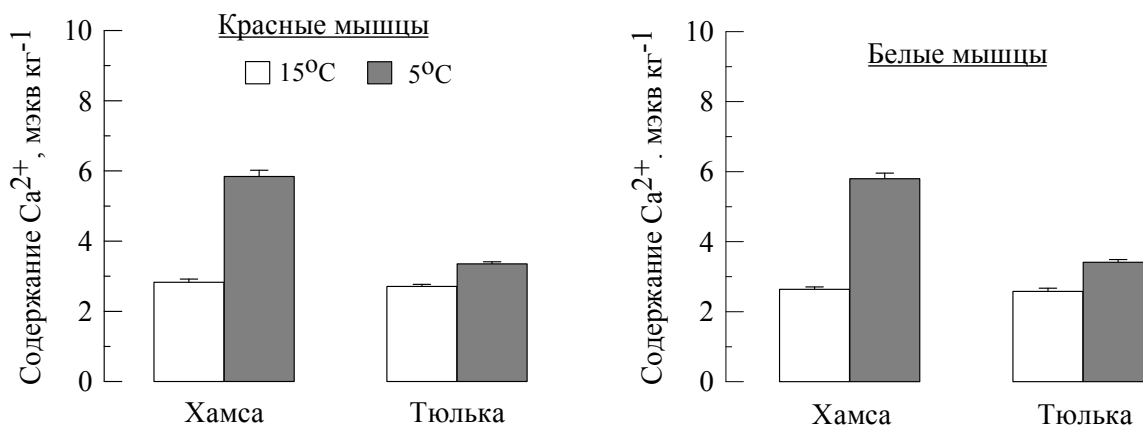


Рис. 3. Содержание  $Ca^{2+}$  в скелетных мышцах хамсы и тюльки при 15 и 5 °С

Известно, что у клеток чувствительных к гипотермии в области низких температур происходит нарушение мембранных функций, приводящее к диссипации ионных градиентов, что сопровождается входом  $Ca^{2+}$  в клетки (Ночачка, 1986). Поступление внеклеточного  $Ca^{2+}$  в гладкомышечные клетки активирует базальный тонус сосудов (Шуба, Кочемасова, 1988). Это исключает активные

вазодилататорные реакции их на тестовые нагрузки. Такой механизм развития тканевой гипоксии на основе уменьшения плотности капиллярной сети мышц при низких температурах у рыб вполне реален, если учесть, что многие из них являются типично теплолюбивыми видами. Не следует исключать из внимания и факт высокой  $Ca^{2+}$ -связывающей способности митохондрий рыб в сравнении

с теплокровными животными (Романенко и др., 1980). При этом  $\text{Ca}^{2+}$ , подавляя активность сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы, разобщает дыхание и окислительное фосфорилирование (Арсан, 1986), что может существенно снижать энергетический статус клетки. Следует отметить, что вазоконстрикторный эффект  $\text{Ca}^{2+}$  ранее был выявлен и в условиях гипоксии у циклостомат (Olson et al., 2001; Russell et al., 2001).

Таким образом, в сравнении с холодолюбивой тюлькой капиллярная сеть скелетных мышц теплолюбивой хамсы в условиях гипотермии (5 °C) утрачивает способность реагировать на тестовые нагрузки (внешняя гипоксия). Число функционирующих капилляров не изменяется в условиях внешнего дефицита кислорода. Это связано со значительным повышением концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в мышечной ткани.

## Литература

Арсан О. М. Роль температуры водной среды в регуляции процессов гликолиза и трикарбонового цикла в организме рыб // Гидробиол. ж. – 1986. – Т. 22, N 3. – С. 57–62.

Арсан О. М. Участие  $\text{Ca}^{2+}$  в регуляции процессов гликолиза и трикарбонового цикла в тканях карпа при различном температурном режиме водной среды // Гидробиол. ж. – 1986. – Т. 22, N 5. – С. 71–74.

Гулевский А. К., Релина Л. И., Жегунова Е. Г. и др. Роль гликолиза при холодовой адаптации карася серебряного *Carassius auratus gibelio* // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 1. – С. 64–70.

Киселева А. Ф., Житников А. Я., Кейсевич Л. В. и др. Морфофункциональные методы исследования в норме и при патологии. – Киев: Здоров'я, 1983. – 168 с.

Куликова Н. И., Шекк П. В., Руденко В. И. Об отношении молоди черноморских кефалей к низкой температуре // Вопр. ихтиол. – 1986. – Т. 26, Вып. 1. – С. 119–128.

Романенко В. Д., Евтушенко Н. Ю., Коцарь Н. И. Метаболизм углекислоты у рыб. – Киев: Наук. думка, 1980. – 180 с.

Солдатов А. А. Физиологические аспекты действия уретанового наркоза на организм морских рыб // Гидробиол. журн. – 2003. – Т. 39, N 1. – С. 51–63.

Солдатов А. А., Парфенова И. А. Напряжение кислорода в крови, скелетных мышцах и особенности тканевого метаболизма кефали-сингиля в условиях экспериментальной гипотермии // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 3. – С. 290–300.

Шекк П. В., Куликова Н. И., Руденко В. И. Возрастные изменения реакции черноморского сингиля *Liza aurata* на низкую температуру // Вопр. ихтиол. – 1990. – Т. 30, Вып. 1. – С. 94–106.

Шошенко К. А., Баранов В. И., Брод В. И., Вязовой В. В., Голубь А. С., Иванова С. Ф., Нешумова Т. В. Органное кровоснабжение и особенности кислородного транспорта в мышцах // Исслед. энергетики движения рыб. – Новосибирск: Наука, 1984. – С. 78–115.

Шуба М. Ф., Кочемасова Н. Г. Физиология сосудистых гладких мышц. – Киев: Наукова думка, 1988. – 252 с.

Bosworth C.A., Chou C.W., Cole R.B., Rees B.B. Protein expression patterns in zebrafish skeletal muscle: initial characterization and the effects of hypoxic

exposure // Proteomics. – 2005. – Vol. 5, N 5. – P. 1362–1371.

Dombkowski R.A., Doelman M.M., Head S.K., Olson K.R. Hydrogen sulfide mediates hypoxia-induced relaxation of trout urinary bladder smooth muscle // J. Exp. Biol. – 2006. – Vol. 209, Pt 16. – P. 3234–3240.

Heise K., Puntarulo S., Nikinmaa M. et al. Oxidative stress and HIF-1 DNA binding during stressful cold exposure and recovery in the North Sea eelpout (*Zoarces viviparus*) // Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. – 2006. – Vol. 143, N 4. – P. 494–503.

Hochachka P. Defence strategies against hypoxia and hypothermia // Science. – 1986. – Vol. 231. – P. 324–241.

Ju Z., Wells M.C., Heater S.J., Walter R.B. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia // Comp. Biochem. Physiol. C. – 2007. – Vol. 145, N 1. – P. 134–144.

Olson K.R., Forster M.E., Bushnell P.G., Duff D.W. Spontaneous contractions in elasmobranch vessels *in vitro* // J. Exp. Zool. – 2000. – Vol. 286, N 6. – P. 606–614.

Olson K.R., Russell M.J., Forster M.E. Hypoxic vasoconstriction of cyclostome systemic vessels: the antecedent of hypoxic pulmonary vasoconstriction? // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2001. – Vol. 280, N 1. – P. R198–R206.

Richards G.P., Liang Y.M., Chao J., Chao L. Purification, characterization and activation of fish muscle prokallikrein // Comp. Biochem. Physiol. – 1997. – Vol. 118C, N 1. – P. 39–48.

Russell M.J., Pelaez N.J., Packer C.S., Forster M.E., Olson K.R. Intracellular and extracellular calcium utilization during hypoxic vasoconstriction of cyclostome aortas // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2001. – Vol. 281, N 5. – P. R1506–R1513.

Schwerte T., Uberbacher D., Bernd P. Non-invasive imaging of blood cell concentration and blood distribution in zebrafish *Danio rerio* incubated in hypoxic condition *in vivo* // J. Exp. Biol. – 2003. – Vol. 206. – P. 1299–1307.

Soitamo A.J., Raabergh C.M.I., Gassmann M. et al. Characterization of a Hypoxia-inducible Factor (HIF-1) from Rainbow Trout: Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, N 23. – P. 19699–19705.

## EXPERIMENTAL HYPOTHERMIA INFLUENCE ON THE CAPILLARY NETWORK STATE OF MARINE FISHES SKELETAL MUSCLES

A.A.Soldatov

*Institute of Biology of the Southern Seas of Ukrainian National Academy of Science, Sevastopol*  
e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Influence of low temperatures on a capillary network state in skeletal muscles heat- and cold-loving species of marine fishes: *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) and *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840) accordingly were investigated in experimental conditions. Control group of fishes contained at  $15 \pm 1$  °C. During experiment temperature decreased with a rate  $0,2$  °C  $h^{-1}$  from 15 up to 5 °C.

Exposition – 15 days. It was shown, that the capillary network of skeletal muscles heat-loving *En. encrasicolus* loses ability to react to test loadings (external hypoxia) at 5 °C in comparison with cold-loving *Cl.cultriventris*. The number of functioning capillaries does not change in conditions of oxygen external deficiency. It is connected to substantial increase of  $Ca^{2+}$  concentration in a muscle tissue.