

УДК 577.112:597,554,3.044.084

А. К. Гулевский, Л. И. Релина, Е. Г. Погожих

ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ ГОДА И ТЕМПЕРАТУРНОГО РЕЖИМА НА СПЕКТР БЕЛКОВ ТКАНЕЙ КАРАСЯ СЕРЕБРЯНОГО *CARASSIUS AURATUS*

Представлены данные SDS-электрофореза белков тканей карася серебряного *Carassius auratus*, выловленного в зимний, весенний и летний периоды, которого содержали при различной температуре. Установлено, что после содержания «зимних» рыб в течение двух недель при 5°C значительно уменьшается количество белка 205 кДа в красных мышцах и сердце и белка 172 кДа — в печени. В белых мышцах наблюдается незначительное снижение содержания белков 105 и 15 кДа у деакклимированных рыб. Белковый состав мозга карасей в условиях эксперимента практически не изменялся. Состав белков тканей «летних» и «зимних» карасей почти не отличается. Белковый спектр тканей *C. auratus* зависит не только от температуры содержания, но и от сезона года, поскольку у «весенних» рыб, несмотря на низкую температуру воды, только в красных мышцах обнаружен белок 205 кДа, характерный для «зимних» рыб. Спектры белков миокарда и печени не отличаются от спектров у «летних» рыб. Холодовая акклимация в течение двух недель летом не оказывала влияния на белковый состав тканей скелетных мышц, миокарда и печени.

Ключевые слова: карась серебряный, акклимация, спектр белков.

Рыбы сем. карповых (Cyprinidae) являются широко распространённым объектом исследований, поскольку, с одной стороны, к ним относятся многие промысловые виды, а с другой — ряд представителей этого семейства характеризуются очень интересными физиологическими и биохимическими свойствами. Так, например, карп и карась хорошо известны своей способностью выдерживать длительную гипоксию и гипотермию. В период подготовки к неблагоприятному периоду белковый состав тканей и клеток изменяется. «Летние» изоформы частично или полностью заменяются на «зимние». Прежде всего это затрагивает сократительную систему мышечных волокон [5, 12—14]. Перечень белков, претерпевающих сезонные изменения, продолжает пополняться. Целью данной работы был анализ спектра белков тканей карася серебряного *Carassius auratus* L. в зависимости от времени года.

Материал и методика исследований. В работе использованы караси из прудов Валковского рыбного хозяйства Харьковской области, выловленные в зимний (январь — февраль), летний (июль — август) и весенний (конец марта) периоды. Одна группа рыб, выловленных зимой, содержалась в холо-

© Гулевский А. К., Релина Л. И., Погожих Е. Г., 2010

довой комнате при температуре воды 4—5°C. Другую группу рыб помещали в аэрируемый аквариум при температуре 20°C не менее чем на 2 недели (процесс, названный нами деакклимацией) с целью моделирования летнего режима в зимний период. Часть рыб, выловленных летом, подвергали поэтапной холодной акклимации с целью моделирования зимних условий в летний период — 7 сут при 7°C, после чего рыб переносили в холодовую камеру с температурой 3°C еще на 7 сут. Часть «летних» рыб после холодной экспозиции погибла. Выживших особей использовали для приготовления проб на электрофорез.

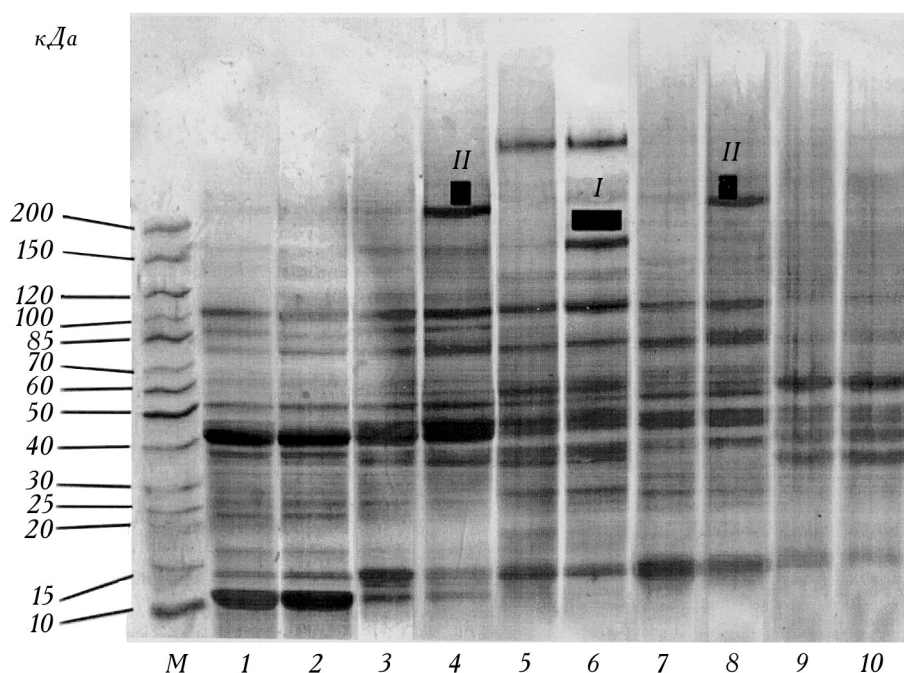
Для приготовления проб ткани мозга, сердца, печени, красных и белых мышц гомогенизировали в 0,1 моль фосфатном буфере (pH 8,0). Для приготовления одной пробы использовали навески тканей от шести особей. Пробы для электрофореза готовили на стандартном Sample-буфере (pH 6,8). SDS-электрофорез проводили в градиентном 10—25% ПААГе [1]. В работе использованы стандарты молекулярной массы фирмы Fermentas UAB (Литва).

Результаты исследований и их обсуждение

При сравнении белковых спектров тканей карасей наиболее примечательным является практически полное исчезновение полосы 205 кДа в красных мышцах и сердце зимой после деакклимации (рис. 1). Эти изменения могут быть частью комплексной перестройки сократительной системы мышц при смене температурного режима. Так, в миокарде карася обыкновенного *Carassius carassius* зимой обнаружена только одна изоформа тяжелой цепи миозина, однако летом и при акклимации при 22°C 50% этой изоформы заменяется на «летнюю» полосу [12]. Тем не менее, в этой области молекулярных масс (200—205 кДа) [8, 11] мы не наблюдали в сердце и красных мышцах дополнительной полосы у деакклимированных особей.

В белых мышцах *C. auratus* в наших экспериментах зимой в условиях деакклимации при температуре 20°C наблюдается только незначительное уменьшение полос 105 и 45 кДа (см. рис. 1). Эти изменения на данный момент не удается соотнести с ранее обнаруженными изменениями белковых спектров белых мышц во время температурной акклимации. Так, установлено, что все три изоформы мышечной креатинкиназы деградируют в процессе специфического, индуцированного снижением температуры, протеолиза при акклимации карпа обыкновенного *Cyprinus carpio* в воде с температурой 10°C [10]. Молекулярная масса субъединиц креатинкиназы составляет 40—45 кДа [2], однако в области этих молекулярных масс нами не зафиксировано исчезновение либо количественное уменьшение каких-либо полос у «зимних» рыб.

В белых мышцах карпа, акклимированного при 10°C, легкая цепь миозина представлена полосами 69, 66 и 62 кДа, тогда как у карпа, акклимированного при 30°C, присутствовали полосы 74, 69, 66 и 62 кДа [14]. У карпа в белых мышцах также обнаружено 3 изоформы тяжелой цепи миозина в зависимости от температуры акклимации, которые отличаются уровнем Mg^{2+} -АТФ-азной активности [5]. Кроме того, сообщалось, что в белых мыш-



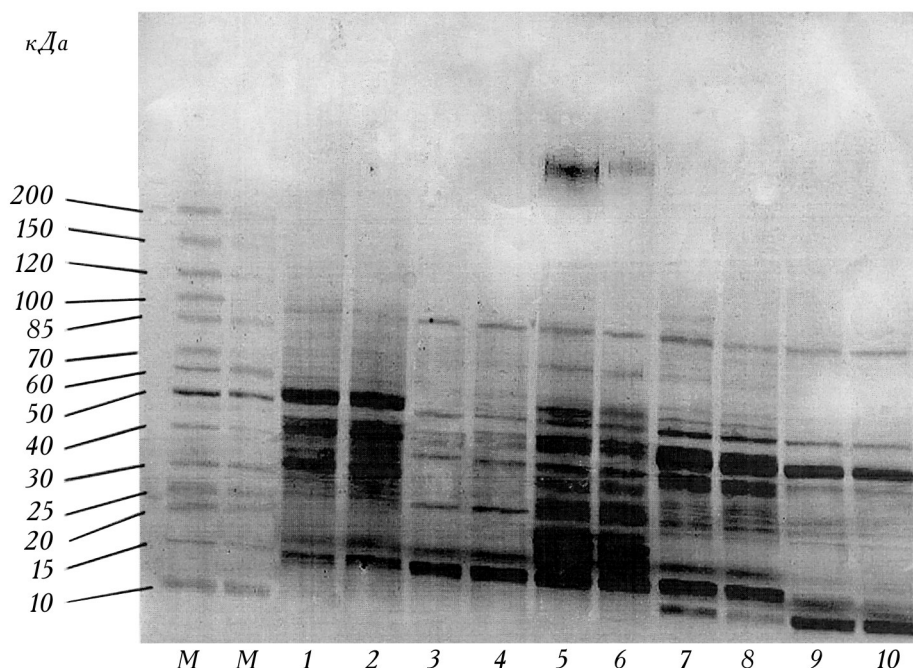
1. Спектр белков тканей *C. auratus* зимой до и после деакклимации: 1, 3, 5, 7, 9 — деакклимированные рыбы; 2, 4, 6, 8, 10 — «зимние» рыбы; I — белок 172 кДа; II — белок 205 кДа. Здесь и на рис. 2: M — маркеры молекулярной массы; 1, 2 — белые мышцы; 3, 4 — красные мышцы; 5, 6 — печень; 7, 8 — сердце; 9, 10 — мозг.

цах *C. carpio* β -субъединица митохондриальной АТФ-синтазы с молекулярной массой 55 кДа накапливается во время холодной акклимации, что сопровождается двукратным возрастанием активности этого фермента в низкотемпературных условиях [7].

Практически отсутствуют сведения о белковых спектрах тканей головного мозга в зависимости от сезона и температуры содержания. На полученной нами электрофореграмме единственное различие в составе белков мозга «зимних» и деакклимированных карасей — это незначительное увеличение полосы 117 кДа при температуре содержания 20°C (см. рис. 1).

В печени у «зимних» карасей присутствует четко выраженная полоса 172 кДа, которая практически исчезает после деакклимации. Кроме того, при деакклимации незначительно уменьшается полоса 205 кДа. Известно, что летом у самцов карпа содержание рецепторов эстрогена в клетках печени в 2,5 раза выше, чем зимой [6]. Молекулярная масса этого белка — 63 кДа [3]. Ранее в печени пресноводных рыб не наблюдали появления или увеличения количества каких-либо белков при снижении температуры.

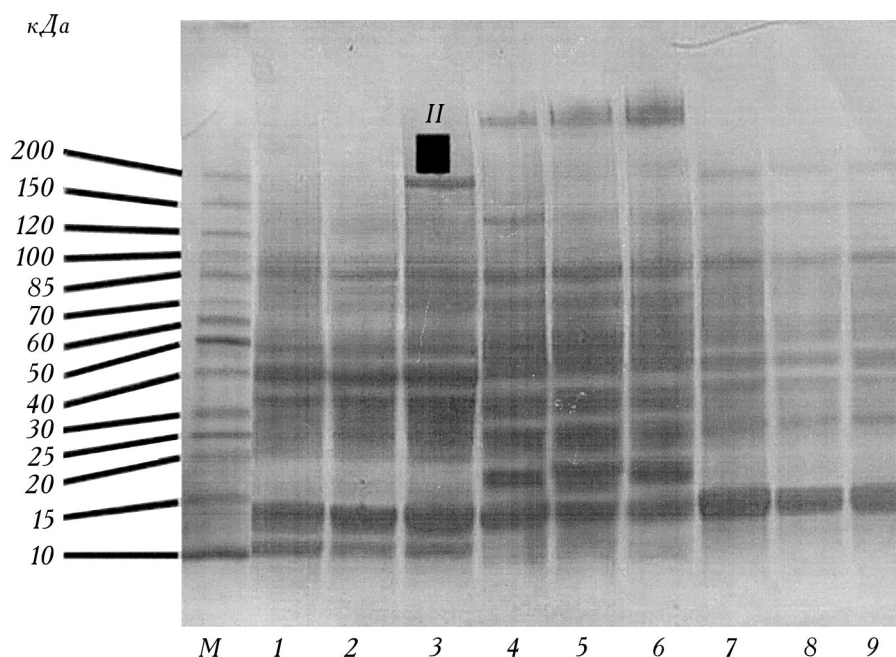
Электрофорез белков из тканей рыб, выловленных в летний период, показал такие же различия между спектрами белков «зимних» и «летних» ка-



2. Спектр белков тканей *C. auratus* летом и после деакклимации зимой: 1, 3, 5, 7, 9 — деакклимированные рыбы; 2, 4, 6, 8 — «летние» рыбы.

расей, как и между спектрами белков «зимних» и деакклимированных карасей (рис. 2). Наше заключение по этому поводу согласуется с результатами, опубликованными в работе [12], где отмечается наличие одинаковых изоформ тяжелых цепей миозина в миокарде «летних» карасей и карасей, акклимированных при 22°C в лабораторных условиях. Здесь же говорится о наличии только одной изоформы тяжелой цепи миозина в миокарде *C. carassius* зимой и во время холодовой акклимации при 2°C в лабораторных условиях по сравнению с присутствием двух изоформ у «летних» рыб. Однако мы не наблюдали изменений в белковых спектрах тканей *C. auratus* после двухступенчатой холодовой акклимации летом длительностью 2 недели (рис. 3). Очевидно, что для изменения состава белков требуется более длительная экспозиция при низкой температуре. Например, исследования на калифорнийском бычке *Gillichthys mirabilis* показали, что для изменения спектра белков эпителиальных клеток жабр требуется акклимация при 10°C длительностью 2 мес [9].

Тем не менее, сезонные ритмы оказывают значительное влияние на белковый состав тканей *C. auratus*, так как у рыб, выловленных весной из пруда, где температура воды была 5°C, только в красных мышцах обнаружен белок 205 кДа, свойственный «зимним» рыбам, а в миокарде эти различия уже не наблюдаются (см. рис. 3). В печени также исчезает белок 172 кДа. Это свидетельствует о том, что в тканях карася в весенний период, несмотря на низкую температуру окружающей среды, происходят биохимические из-



3. Спектр белков тканей *C. auratus* зимой после деакклимации, летом после холодовой акклимации и весной: М — маркеры молекулярной массы; 1, 2, 3 — красные мышцы; 4, 5, 6 — печень; 7, 8, 9 — сердце; 1, 4, 7 — деакклимированные рыбы; 2, 5, 8 — «летние» рыбы после 2-недельной холодовой акклимации; 3, 6, 9 — «весенние» рыбы; 1 — белок 205 кДа.

менения, направленные на переключение организма на летний режим функционирования. К подобным выводам пришли и авторы, исследовавшие ультраструктуру мышечных волокон радужной форели *Oncorhynchus mykiss* [4]. Они отмечали, что у форели зимой расстояние между митохондриями почти в 2 раза меньше, чем весной, несмотря на то, что температура содержания рыб составляла 4°C и зимой, и весной.

Заключение

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных установлено, что во время деакклимации карася серебряного *C. auratus* при температуре 20°C в зимний период изменяется спектр белков красных мышц, сердца и печени, что проявляется в существенном количественном уменьшении полос 205 и 172 кДа соответственно. Условия деакклимации в эксперименте воспроизвели летний режим существования рыб, поскольку отличий в белковых спектрах «летних» и деакклимированных рыб не наблюдалось. Двухнедельная холодовая акклимация в летний период не оказывала влияния на спектры белков тканей *C. auratus*. Сезонные ритмы, судя по полученным результатам, играют существенную роль в перестройках белкового состава, так как в марте, несмотря на низкую температуру воды, сходную с зимней, белковый состав тканей печени и сердца уже не отличается от такового у «летних» рыб. Только в красных мышцах в это время наблюдался белок 205 кДа, характерный для зимнего периода.

**

В роботі представлено дані SDS-електрофорезу білків тканин карася сріблясто-го *Carassius auratus*, якого було виловлено в зимовий, весняний та літній періоди і якого утримували при різній температурі. Встановлено, що після утримання «зимових» риб протягом двох тижнів при 5°C значно зменшується кількість білка 205 кДа в червоних м'язах та серці і білка 172 кДа — в печінці. У білих м'язах спостерігається незначне зменшення вмісту білків 105 та 15 кДа у деаклімованих риб. Білковий склад мозку карасів в умовах експерименту практично не зазнавав змін. Склад білків тканин «літніх» і «зимових» карасів майже не відрізняється. Білковий спектр тканин *C. auratus* залежить не лише від температури утримання, а й від пори року, оскільки у «весняних» риб, незважаючи на низьку температуру води, тільки в червоних м'язах виявлено білок 205 кДа, притаманний «зимовим» рибам. Спектри білків міокарду і печінки не відрізняються від спектрів у «літніх» риб. Холодова аклімація протягом двох тижнів влітку не впливала на білковий склад тканин скелетних м'язів, міокарду і печінки.

**

SDS-electrophoresis data on protein patterns of tissues of the goldfish Carassius auratus netted in winter, spring and summer and kept at different temperatures are presented. It has been ascertained that after keeping «winter» fish at 5°C for 2 weeks quantities of the protein 205 kD in red muscles and heart and the protein 172 kD in liver are significantly decreased. In white muscles a slight decline in contents of the proteins 105 and 45 kD was observed in the deacclimated fish. The protein composition of brain in the goldfish did not undergo virtual changes under the experimental conditions. Tissue protein patterns in the «summer» fish and «winter» ones did not differ. The tissue protein spectrums in C. auratus depend not only on keeping temperature, but also on a season, since in the «spring» fish despite low temperature of water there was only the protein 205 kD in red muscles peculiar to «winter» fish, and the protein patterns of myocardium and liver were not different from the ones in the «summer» fish. Cold acclimation for 2 weeks in summer did not affect protein compositions of skeletal muscle, myocardium and liver tissues.

**

1. Остерман Л. А. Электрофорез // Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. — М.: Наука, 1981. — С. 3—120.
2. Batista e Silva C.M., Nunes Tavares N., Giovanni-De-Simone S. et al. Purification and partial characterization of creatine kinase from electric organ of *Electrophoras electricus* (L.) // Intern. J. Biochem. Cell. Biol. — 2000. — Vol. 32, N 4. — P. 427—433.
3. Choi C.Y., Habili H.R. Molecular cloning of estrogen receptor alpha and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish // Mol. Cell. Endocrinol. — 2003. — Vol. 204, N 1—2. — P. 169—177.
4. Egginton S., Cordiner S., Skilbeck C. Thermal compensation of peripheral oxygen transport in skeletal muscle of seasonally acclimatized trout // Amer. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. — 2000. — Vol. 279, N2. — P. R375—R388.
5. Guo X.F., Nakaya M., Watabe S. Myosin subfragment-1 isoforms having different heavy chain structures from fast skeletal muscle of thermally acclimated carp // J. Biochem. — 1994. — Vol. 116, N 4. — P. 728—735.

6. *Hernández L., Poblete A., Amthauer R. et al.* Effect of seasonal acclimatization on estrogen-induced vitellogenesis and on the hepatic estrogen receptors in the male carp // *Biochem. Intern.* — 1992. — Vol. 28, N 3. — P. 559—567.
7. *Itoi S., Kinoshita S., Kikuchi K., Watabe S.* Changes of carp FoF1-ATPase in association with temperature acclimation // *Amer. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* — 2003. — Vol. 284, N 1. — P. R153—R163.
8. *Jin J.P., Malik M.L., Lin J.J.* Monoclonal antibodies against cardiac myosin heavy chain // *Hybridoma.* — 1990. — Vol. 9, N 6. — P. 597—608.
9. *Kültz D., Somero G.N.* Differences in protein patterns of gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis* after osmotic and thermal acclimation // *J. Comp. Physiol. Biochem. Syst. Environ. Physiol.* — 1996. — Vol. 166, N 2. — P. 88—100.
10. *McLean L., Young I.S., Doherty M.K. et al.* Global cooling: cold acclimation and the expression of soluble proteins in carp skeletal muscle // *Proteomics.* — 2007. — Vol. 7, N 15. — P. 2667—2681.
11. *Park J.D., Yongsawatdigul J., Choi Y.J., Park J.W.* Biochemical and conformational changes of myosin purified from Pacific sardine at various pHs // *J. Food. Sci.* — 2008. — Vol. 73, N3. — P. C191—C197.
12. *Vornanen M.* Seasonal and temperature-induced changes in myosin heavy chain composition of crucian carp hearts // *Amer. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* — 1994. — Vol. 267, N 6 Pt 2. — P. 1567—1573.
13. *Watabe S., Hwang G.C., Nakaya M. et al.* Fast skeletal myosin isoforms in thermally acclimated carp // *J. Biochem.* — 1992. — Vol. 111, N 1. — P. 113—122.
14. *Watabe S., Imai J., Nakaya M. et al.* Temperature acclimation induces light meromyosin isoforms with different primary structures in carp fast skeletal muscle // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1995. — Vol. 208, N 1. — P. 118—125.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, Харьков

Поступила 06.04.10