

ДИНАМИКА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ И СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В СЕРДЦЕ РЫБЫ РОТАНА *PERCCOTTUS GLENII* (ODONTOBUTIDAE) ПРИ ЗИМНЕМ ГИПОБИОЗЕ

© 2024 Каранова М.В.^а, Гагаринский Е.Л.^а, Петрухин О.В.^б, Решетников А.Н.^{с,*}

^а Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, 142290, Россия

^б Лаборатория ООО «ИЛ Тест-Пушино», Пушкино, 142290, Россия

^с Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071, Россия
e-mail: *anreshetnikov@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.04.2024. После доработки 28.07.2024. Принята к публикации 17.08.2024

Пресноводная рыба ротан *Perccottus glenii* представляет интерес из-за широкого диапазона толерантности к температуре среды, но особенности механизмов его низкотемпературной адаптации изучены недостаточно. В наших предыдущих работах показано участие вторичных метаболитов и аминокислот в компенсаторных ответах на околонулевую температуру скелетных мышц, мозга, плазмы крови и печени *P. glenii*, а в данной работе исследовали подобные компенсаторные ответы в сердечной мышце. Показано, что в начале гипобиоза (декабрь) при температуре воды +1 °С уровень таурина, в сравнении с летним (9.70 ± 0.55 мкмоль/г сырого веса), снижается почти в два раза, а к моменту завершения зимнего гипобиоза (начало апреля) снижается ещё до 3.80 ± 0.25 мкмоль/г. Фосфоэтаноламин не обнаруживается летом, но в декабре появляется в количестве 0.81 ± 0.07 мкмоль/г, а до завершения гипобиоза увеличивается дополнительно. Цистеиновая кислота обнаруживается также только в декабре, но до завершения гипобиоза её концентрация снижается. Соотношение пулов глутамата и аланина, как возможного показателя метаболического вклада аэробной и анаэробной энергетики, в процессе гипобиоза демонстрировало умеренное снижение пула глутамата и такое же умеренное увеличение аланина. Ответы аминокислот дают основание предполагать, что даже в конце гипобиоза в энергообеспечении сердца *P. glenii* довольно активно участвуют окислительное фосфорилирование и цикл трикарбоновых кислот.

Ключевые слова: аланин, гидробиологическая станция «Озеро Глубокое», глутаминовая кислота, низкотемпературная адаптация, таурин, фосфоэтаноламин.

DOI:10.35885/1996-1499-17-3-134-144

Введение

Изучение проблем биохимической адаптации пойкилотермных животных к низким температурам необходимо для понимания механизмов, активируемых в экстремальных условиях. Функциональные возможности двухкамерного сердца рыб, сократительные характеристики миоцитов и частота разряда пейсмекерных клеток наиболее чувствительны к изменениям температуры окружающей среды; их адаптации при острых гипотермических стрессах имеют первостепенное значение для выживания животных [Tibbits et al., 1992; Nayward et al., 2014; Keen et al., 2017].

Пресноводная рыба ротан *Perccottus glenii* Dybowski, 1877 (семейство одонтобутовых Odontobutidae) преимущественно на-

селяет водоёмы, в которых нет условий для существования крупных хищных рыб: старицы рек, мелководные озёра, пруды, мелиоративные и придорожные каналы, и обладает широким диапазоном толерантности к абиотическим факторам среды, в том числе к гипоксии и колебаниям температуры [Решетников и др., 2018]. Этот вид рыб способен переносить значительный летний прогрев воды и гибнет лишь при +38 °С [Голованов, Ручин, 2011]. При промерзании водоёма до дна ротан способен вмерзать в лёд и в течение зимы находится в состоянии гипобиоза [Соколов, 2001]. Возможность выживать после зимовки во льду, наряду с низкой оксифильностью, делает этот вид животных интересным объектом для исследования механизмов адап-

тации к низким температурам и гипоксии [Lushchak, Bagnyukova, 2007; Karanova, 2009; 2018; Jiang et al., 2023].

Несмотря на довольно обширные исследования регуляции экспрессии генов при низких температурах в органах рыб, включая ротана [Vornanen et al., 2005; Long et al., 2020; Jiang et al. 2023], вторичные метаболиты сердца [Maplestone et al., 1992], а также свободные аминокислоты [Jurss, Bastrop, 1995] недостаточно изучены относительно их компенсаторных ответов на критическое снижение температуры. Однако окислительно-восстановительные процессы тесно связаны с метаболизмом свободных аминокислот, функционирующих как ключевые метаболиты, предшественники метаболитов и липидов, как регуляторы экспрессии генов и элементы клеточной сигнализации [Jurss, Bastrop, 1995; Wu, 2009]. Профили свободных протеиногенных аминокислот, а также упомянутых вторичных метаболитов, являются уникальными характеристиками каждого органа для каждого вида животных; их изменения имеют свои закономерности в процессе эволюции и в процессе онтогенеза [Bröder, Bröder, 2017]. Значительное изменение температуры влечёт специфическое для каждого органа и вида пойкилотермных животных изменение аминокислотного фонда и состава вторичных метаболитов, находящихся в зависимости от энергообеспечения тканей и органов. Сравнение сезонного изменения содержания вторичных метаболитов, а также соотношения разных аминокислот позволяет оценить их роль в механизме противостояния различных тканей и органов низким температурам и сопутствующей гипоксии, даёт возможность выявить адаптогенные аминокислоты и протекторы, которые аккумулируются в процессе снижения температуры и изменяют свои концентрации в течение длительного периода гипобиоза, влияя на биосинтез, поддержание электрической проводимости и стабильность состояния органов, в том числе сердца во время его дисфункции [Pisarenko, 1996].

Работа является продолжением наших предыдущих исследований изменений пулов вторичных метаболитов и аминокислот в различных органах рыб, зимне спящих сусликов

и других животных в ответ на снижение температуры [Karanova, 2009, 2018; Каранова, 2021; Karanova, Zakharova, 2022, 2023]. Цель данного исследования заключалась в изучении возможной роли вторичных метаболитов: таурина, фосфоэтанолamina (ФЭА), фосфосерина (ФС) и цистеиновой кислоты (ЦК) в адаптации метаболизма сердца эвритермной пресноводной рыбы ротана *Perccottus glenii* к низким температурам; в оценке и анализе вклада свободных аминокислот в энергообеспечение и формирование аминокислотного фонда сердца *P. glenii* во время гипобиоза при околонулевых температурах. Задачами исследования были определение состава и концентрации вторичных метаболитов и свободных аминокислот сердечной ткани ротана в летний период (контроль), в начале зимы в период старта гипобиоза и в момент завершения почти четырёхмесячного гипобиоза; сравнение с данными, полученными ранее на мозге этих же животных в тот же исследуемый период; обсуждение возможной роли некоторых метаболитов в адаптации к условиям низкой температуры.

Материалы и методы

Экспериментальная часть исследования проведена на гидробиологической станции «Озеро Глубокое» Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук (Рузский городской округ Московской области, Россия). Первая группа особей ротана была отловлена в сельском пруду (6–17 октября 2022 г.) и помещена в садки, размещённые на мелководье оз. Глубокое (55°45' с. ш.; 36°31' в. д.), для прохождения естественной акклимации к сезонному понижению температуры воды. Отслеживание температурных условий в месте нахождения подопытных рыб осуществляли при помощи терморегистраторов iButton DS1925L-F5 (Termochron, США). Часть особей была извлечена из этих садков 7 декабря 2022 г. при температуре воды +1.5 °С, то есть в начале установления стабильно низкой температуры озёрной воды после образования ледового покрова. Оставшиеся особи находились в садках ещё 115 дней в слое воды непосредственно подо льдом, кормление не осуществ-

вляли. Температура воды в садках с декабря по конец марта колебалась в узком диапазоне 0.5–1.5 °С. Финальная группа рыб была извлечена из-под льда (толщина приблизительно 0.4 м) при температуре воды +2 °С 1 апреля 2023 г, то есть в момент завершения периода стабильно-низкой температуры. Вторая (контрольная) группа особей ротана *P. glenii* обоего пола была отловлена в летний период (3 июля 2023 г) при температуре воды +20...+25 °С. В эксперименте были использованы особи обоих полов размером *TL от 110 до 212* мм и массой сердца от 42 до 292 мг.

После вскрытия рыб сердца извлекали в холодной комнате, взвешивали, помещали в пробирки Эппендорф и затем сохраняли при температуре –19 °С до последующей транспортировки в термобоксе в лабораторию.

Обработку биоматериала выполнили в Институте биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН). Биоматериал гомогенизировали в 0.5 н холодной хлорной кислоте (1:9) во льду и центрифугировали на аппарате Centricon (США) при температуре 4 °С 20 мин при 15000 об/мин [Каранова, Zakharova, 2023]. Конечный супернатант хранили для последующего анализа в жидком азоте при температуре приблизительно –200 °С в криобанке ИБК РАН.

Состав и количество свободных аминокислот определяли методом ионообменной жидкостной хроматографии [Sprachman et al., 1958] на модульном хроматографе Infinity LC–1260 (Agilent 1260, США). Разделение смеси аминокислот осуществляли на колонке с трёхступенчатым градиентом натрий-цитратного буфера: № 1 – 0.3 н, рН 2.98, № 2 – 0.4 н, рН 3.81, № 3 – 0.45 н, рН 9.97 в диапазоне температуры от 55 до 74 °С. Стационарная фаза: сульфированный сополимер стирола с дивинилбензолом. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.45 мл/мин. Послеколонную модификацию аминокислот выполняли с нингидрином; интенсивность окрашивания измеряли при 570 нм. Для каждого блока эксперимента делали хроматограмму стандартной смеси аминокислот; концентрация каждой из вносимых аминокислот 2.5 нмолей. Содержание свободных аминокислот выражали в виде мкмоль/г сы-

рой ткани. Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США).

Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., США). Для сравнения независимых измерений использовали тест U Манна – Уитни. Для каждого блока эксперимента данные представлены по 12 особям, как среднее значение из 3 параллельных анализов, в каждом из которых использовали 4 особи. Для описания результатов использовали среднее ± стандартная ошибка ($m \pm SE$).

Результаты

Вторичные метаболиты

Данные об изменении содержания вторичных метаболитов в сердце *P. glenii* в разные сезоны при разных физиологических условиях представлены в табл. 1 и на рис. 1. Самая высокая концентрация таурина (9.70 ± 0.55 мкмоль/г сырой ткани) выявлена летом, а не зимой, как предполагалось, имея в виду наши прежние данные, полученные на скелетных мышцах и плазме крови *P. glenii*: в декабре таурин превышал летний уровень в мышцах в 4 раза, а в плазме – в 8 раз [Каранова, 2009]. В сердце (табл. 1) в первой декаде декабря уровень этой непротеиногенной сульфаминокислоты снижался до 5.11 ± 0.17 мкмоль/г, а ко времени завершения зимней спячки (гипобоза) продолжил снижение до 3.8 ± 0.2 мкмоль/г. Кроме того, опираясь на литературные данные о высоком содержании таурина в сердце пресноводных и морских рыб [Boyd et al., 1977; Gras et al., 1982], можно было ожидать, что пул таурина в сердце ротана будет значительно выше, учитывая способность этой рыбы сохранять жизнеспособность после вмерзания в лёд при температуре ниже 0 °С, длительного оцепенения во льду и оттаивания [Каранова, 2018].

Пропорция таурина относительно суммы всех аминокислот составила в летнее время 41.9% (табл. 1, 2). Несмотря на последующее снижение, и в начале зимы, и после зимовки, она оставалась самой высокой, составляя 24.8 и 21.6%. Согласно литературным данным, в сердце форели при +12 °С пул таурина составляет 48.74 ± 6.16 мкмоль/г [Gras et

Таблица 1. Концентрации вторичных метаболитов (мкмоль/г сырого веса; $m \pm SE$) в сердце ротана *Perccottus glenii* в разные сезоны при разном физиологическом состоянии

Метаболит	3 июля	7 декабря	1 апреля
Цистеиновая кислота	следы	0.54 ± 0.06	$0.20 \pm 0.03^*$
Фосфосерин	0.44 ± 0.03	?	$0.92 \pm 0.08^*$
Таурин	9.70 ± 0.55 (41.9 %)	$5.11 \pm 0.33^*$ (24.8%)	$3.80 \pm 0.25^*$ (21.6%)
Фосфоэтаноламин	не обнаружен	0.81 ± 0.07	$1.40 \pm 0.10^*$
Сумма ВМ	10.14	6.46	6.32

Примечания: ВМ – вторичные метаболиты; знак вопроса в третьем столбце («Фосфосерин», декабрь) означает отсутствие адекватного отражения количества ФС в процессе элюции: ФС (0.47 мкмоль/г) выявлен только в одной из трёх проб. Цифры в скобках отражают долю таурина от суммы всех обнаруженных аминокислот (таблица 2). * = значимые различия ($p < 0.05$). Декабрьские значения сравнивали с июльскими; апрельские значения сравнивали с декабрьскими.

al., 1982], и это совпадает с пулом таурина в сердце ежевого ската *Raja erinacea* [Boyd et al., 1977]. В сердце разных видов животных количество таурина варьирует в широком диапазоне, от ~ 1.8 мкмоль/г сырого веса у лягушки до ~ 39.4 мкмоль/г у мышей; самый большой пул выявлен у видов с самой высокой частотой сердечных сокращений [Kocsis et al., 1976]. В сердце 30-месячных крыс пул таурина – 26.5, в сердце мышей – 33.9 мкмоль/г [Thurston et al., 1981; Dawson, Wallace, 1992], в миокарде якутского суслика в летний период – 7.31 мкмоль/г [Каранова, Захарова, 2023].

Характер сезонных ответов ФЭА был направлен в сторону, противоположную таурину: летом ФЭА не обнаруживался, но в начале зимы повысился до 0.81 ± 0.07 мкмоль/г, а к моменту окончания зимнего гипобиоза дополнительно увеличился до 1.40 ± 0.10 мкмоль/г (табл. 2). Не понятна своей «непоследовательностью» динамика ФС, который заметно присутствовал летом (0.44 ± 0.03 мкмоль/г), но в начале зимы обнаружился только в одной пробе из трёх, однако в конце периода гипобиоза появился вновь, причём в увеличенной, по сравнению с летней, концентрации (0.92 ± 0.08 мкмоль/г). Профиль ЦК имел

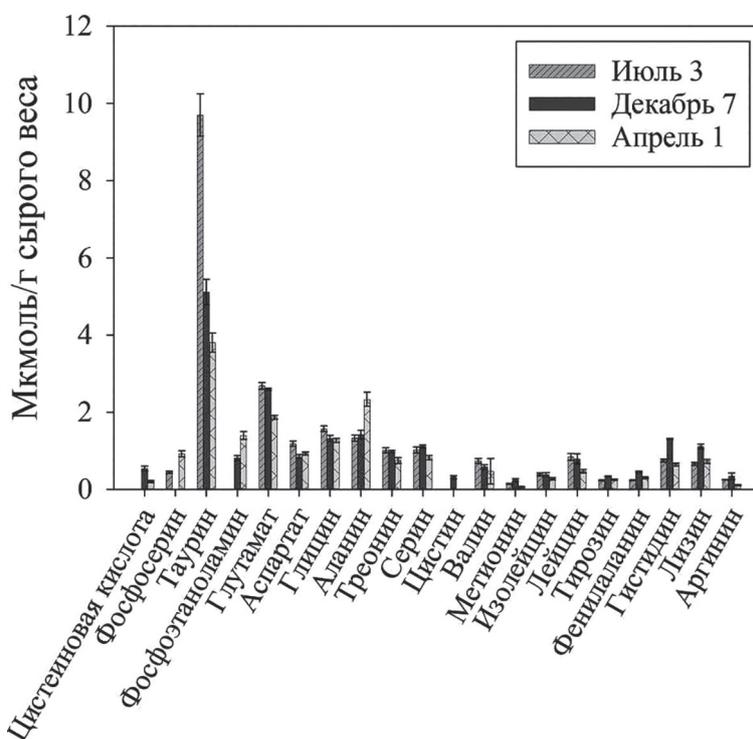


Рис. 1. Концентрации (мкмоль/г сырого веса; $m \pm SE$) вторичных метаболитов и свободных аминокислот в сердечной мышце ротана *Perccottus glenii* в зависимости от сезона и пребывания в гипометаболическом состоянии.

Таблица 2. Концентрации протеиногенных аминокислот (мкмоль/г сырого веса; $m \pm SE$) в сердце ротана *Percottus glenii* в зависимости от сезона и пребывания в гипометаболическом состоянии

Аминокислота	3 июля	7 декабря	1 апреля
Глутамат	2.68 ± 0.09	2.59 ± 0.03	1.87 ± 0.05*
Аспарат	1.18 ± 0.07	0.85 ± 0.05*	0.93 ± 0.04
Глицин	1.57 ± 0.07	1.32 ± 0.08*	1.27 ± 0.05
Аланин	1.33 ± 0.08	1.42 ± 0.11	2.33 ± 0.18*
Треонин	1.01 ± 0.07	0.98 ± 0.03	0.75 ± 0.07*
Серин	1.02 ± 0.08	1.11 ± 0.04	0.82 ± 0.06*
Цистин	–	0.32 ± 0.04	–
Валин	0.74 ± 0.06	0.58 ± 0.06	0.47 ± 0.33*
Метионин	0.14 ± 0.01	0.24 ± 0.04*	0.06 ± 0.01*
Изолейцин	0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.27 ± 0.03*
Лейцин	0.84 ± 0.09	0.79 ± 0.13	0.47 ± 0.05*
Тирозин	0.23 ± 0.01	0.33 ± 0.01*	0.25 ± 0.02*
Фенилаланин	0.24 ± 0.01	0.45 ± 0.02*	0.30 ± 0.02*
Гистидин	0.75 ± 0.04	1.30 ± 0.02*	0.65 ± 0.04*
Лизин	0.66 ± 0.04	1.11 ± 0.06*	0.73 ± 0.05*
Аргинин	0.25 ± 0.01	0.34 ± 0.08	0.11 ± 0.01*
Сумма ПАК	13.04	14.11	11.28
Сумма ПАК+ВМ	23.17	20.57	17.60

Примечания: ПАК – протеиногенные аминокислоты. ВМ – вторичные метаболиты. * = значимые различия ($p < 0.05$). Значимость отличия апрельских значений указана относительно как июльских, так и (отдельно) декабрьских значений. Значимость отличий декабрьских значений указана относительно июльских.

также свои особенности: летом – «следы», а в начале зимы и после зимнего гипобиоза 0.54 ± 0.06 и 0.20 ± 0.03 мкмоль/г, соответственно (табл. 1). По данным Граса и соавторов [Gras et al., 1982], в сердце форели ФЭА, ФС и ЦК также выявлены как следы при +12 °С.

Аминокислоты

Содержание протеиногенных аминокислот в летнее время, в начале и в конце зимы представлено в табл. 2 и на рис. 1. Летний уровень показал, что суммарное количество самых представленных аминокислот, аланина и глутамата, составляет 4.01 мкмоль/г. Это количество не изменялось при снижении температуры к началу зимы и на финальной стадии гипобиоза (табл. 2). Примечателен и другой факт: в начале зимы, когда температура воды в водоёме, в зоне нахождения рыб, была +1 °С, но ротаны были вполне активны, соотношение глутамата и аланина лишь незначительно изменилось по сравнению с летним: пул глутамата незначительно уменьшился, а пул аланина незначительно увеличился (табл. 2, рис. 2). Этот факт свидетельствует о тонкой компенсаторной перестройке метаболизма пойкилотермного животного, которая позволяет сохранять прежний баланс метабо-

лизма, несмотря на весьма значительное снижение температуры. Удивительно, но общее количество глутамата и аланина в сердце ротанов совпадало с таковым в сердце форели, а аспарат и глицин приблизительно соответствовали декабрьскому уровню *аспартата* (0.62 ± 0.05 мкмоль/г) и *глицина* (1.41 ± 0.11 мкмоль/г) в сердце форели [Gras et al., 1982]. На конечной стадии гипобиоза, в первый день апреля (табл. 2), в сердце *P. glenii* произошло некоторое сокращение пула глутамата (до 1.87 мкмоль/г) и соответствующее увеличение аланина (до 2.33 мкмоль/г). Для сравнения, в сердце ужа, отловленного в сентябре и акклимированного в течение 2–3 недель до 3 °С, пул глутамата составлял 1.953, аланина – 0.52, глицина – 0.10, аспартата + аспарагина – 1.47 мкмоль/г [Churchill, Storey, 1992]. В сердце крыс пул глутамата составляет 5.17, аланина – 1.51 мкмоль/г [Adibi, 1971].

Аспарагиновая кислота представляет особый интерес вследствие медленного нарастания своей роли в эволюции, подтверждаемой исключительно малым присутствием в мозге ротана: 0.08, 0.06 и 0.00 мкмоль/г летом, в декабре и после четырёхмесячного оцепенения в замёрзшей воде, соответственно [Каранова, 2018]. В плазме крови пул аспартата летом

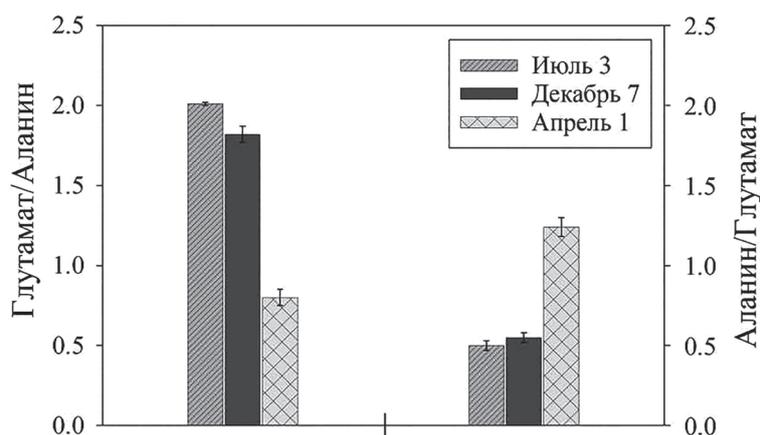


Рис. 2. Количественное соотношение глутамата/аланина и аланина/глутамата [(мкмоль/г)/(мкмоль/г); $m \pm SE$] в сердце ротана *Perccottus glenii* в разные сезоны.

был таким же низким [Там же]. В отличие от своей не востребоваемости в мозге, в сердце *P. glenii* пул аспартата летом уже сопоставим с аланином (1.18 и 1.33 мкмоль/г, соответственно (табл. 2)). В холодное время параллельно со снижением глутамата происходит заметное снижение аспартата, до 0.86 ± 0.06 и 0.93 ± 0.04 мкмоль/г соответственно для начала зимы и окончания гипобиоза (табл. 2).

Разветвлённые аминокислоты (валин, изолейцин и лейцин), по-видимому, активно участвуют в компенсаторных ответах сердечной ткани (табл. 2). Снижение уровня валина происходит как в начале гипобиоза, так и в момент его завершения: от 0.74 ± 0.06 мкмоль/г летом до 0.58 ± 0.08 в начале зимы и 0.47 ± 0.33 после четырёхмесячного гипобиоза. Пулы изолейцина и лейцина (0.39 и 0.84 мкмоль/г соответственно) в начале зимы не изменились в сравнении с летними, но к началу апреля снизились значительно, до 0.27 и 0.47 мкмоль/г (табл. 2). Снижение уровня разветвлённых аминокислот к апрелю, возможно, вызвано их вовлечённостью в глюконеогенез для компенсации снижения количества глюкозы. Интересно отметить, что разветвлённые аминокислоты метаболизируются миокардом млекопитающих даже во время нормальной сердечной функции [Schwartz et al., 1985]; кроме того, ранее была показана способность сердца использовать валин в качестве альтернативы глюкозе для поддержания длительности потенциала действия [Nishimura et al., 1989]. Несмотря на то, что эти факты получены на млекопитающих,

можно со значительной долей вероятности применить их и для рыб.

Обсуждение

Вторичные метаболиты

Вектор сезонных изменений пула таурина в сердце (рис. 1), в отличие от предполагаемого, оказался аналогичным направлению сезонных изменений таурина в мозге, где его уровень в летний период был значительно ниже, чем в сердце, и составлял 3.9 ± 0.4 мкмоль/г, снижаясь в декабре более чем в 4 раза, до 0.90 мкмоль/г [Karapova, 2018]. Схожие, но, как и для таурина, существенно отличающиеся количественные изменения отмечались для ФЭА, который в мозге от минимального летнего уровня 0.039 поднимался в декабре до 3.66 мкмоль/г, количественно как бы замещая ушедший таурин [Там же].

Функции таурина настолько многообразны, что выявить специфику его роли для сердечной ткани, тем более пойкилотермных животных, в настоящее время вряд ли представляется возможным [Tibbits et al., 1992; Ogasawara et al., 1994; Schaffer et al., 1995; Hansen et al., 2006]. Таурин опосредует множество мембраносвязанных эффектов в возбудимых тканях млекопитающих, но катионный гомеостаз, возможно, одна из важнейших его функций [Там же]. Предполагается, что причиной влияния таурина на транспорт кальция является или взаимодействие с нейтральными фосфолипидами мембран, или вызванные таурином изменения в фосфорилировании белков [Satoh, Horie, 1997; Satoh,

Sperelakis, 1998; Huxtable, 2000; Satoh, 2001]. Помимо участия в катионном гомеостазе, таурин, благодаря относительной химической инертности, функционирует как модулятор регуляции активности ферментов, в клеточной сигнализации и т. д. [Huxtable, 2000; Ito et al., 2009; Ripps, Shen, 2012]. Взаимодействуя с мембранами, таурин стабилизирует их, при этом предполагается, что между аминокислотными и сульфогруппами таурина и фосфатной и аминокислотными группами мембранных фосфолипидов образуется электростатическое взаимодействие [Schaffer et al., 1995]. Одним из изменений в функционировании мембран, вызванных таурином, является ингибирование N-метилтрансферазы, катализирующей превращение фосфатидилэтаноламина в фосфатидилхолин (ФХ) [Hamaguchi et al., 1991]. Таурин способен изменять фосфорилирование ключевых белков, в частности, пируватдегидрогеназы (ПДГ) [Schaffer et al., 1995]. Введённый экзогенно перед экспериментальной индукцией ишемии миокарда, таурин уменьшает синтез лактата и увеличивает продукцию пирувата во время ишемии [Miyamoto et al., 2009]. Принимая во внимание вышесказанное, можно предположить наличие для сердца и мозга рыб каких-то общих функций таурина, – например, таких как модуляция катионного гомеостаза, влияние на фосфорилирование белков и т. д. Предположительно, снижение количества таурина в зимнее время в сердце может свидетельствовать об активном расходе этого важного для гомеостаза химического соединения.

Относительно функциональных особенностей ФЭА, находящегося в противофазе с изменениями пулов таурина как в сердце *P. glenii* (табл. 1), так и в его мозге [Karanova, 2018], известно, что он играет важную роль в биосинтезе клеточных мембран живых организмов, являясь участником синтеза фосфатидилэтаноламина и ФХ; участвует в транспорте жирных кислот в митохондрии, в обеспечении электролитного баланса клеточной мембраны и т. д. [Modica-Napolitano, Renshaw, 2004; Farine et al., 2015]. Появление ФЭА при низкой температуре позволяет предположить его участие в тех или иных компенсаторных реакциях, обеспечивающих

адаптацию сердечно-сосудистой системы *P. glenii* к низким температурам; не исключена его регуляторная роль в переключении аэробного гликолиза сердца *P. glenii* на анаэробный. Так, повышение количества ФЭА, совпадающее с убылью глутамата (маркера цикла трикарбоновых кислот, ЦТК) и с нарастанием аланина (маркера анаэробного гликолиза) (табл. 2), может предполагать ингибирование этим фосфомоноэфиром метаболизма фосфолипидов митохондриальных мембран и, как следствие, замедление окислительного фосфорилирования и ЦТК.

Аминокислоты

Кровеносная система рыб имеет один круг кровообращения. Через двухкамерное сердце этих животных проходит только венозная кровь, нагнетаемая в жабры [Сухаренко, Максимов, 2021]. После обогащения кислородом в жаберных лепестках кровь поступает в другие органы. Большая часть энергии сердца рыб, как и у млекопитающих, создаётся с участием кислорода в процессе окисления жирных кислот, метаболизирующих в кетоновые тела; меньшая – за счёт анаэробного гликолиза, окисления глюкозы до лактата и свободных аминокислот [Li et al., 2020; Crockett, Sidell, 1990]. В результате окисления жирных кислот и работы сложного пируватдегидрогеназного комплекса, определяющего интенсивность ЦТК и окислительного фосфорилирования, из пирувата в митохондриях образуется ацетил-КоА, с которого начинается ЦТК. Регуляция окисления жирных кислот в сердце эвритермных рыб умеренного пояса осуществляется путём изменения активности ПДГ, ключевого фермента пируватдегидрогеназного комплекса. Отметим, что в сердце арктических рыб, в отличие от сердца эвритермных, скорость окисления жирных кислот регулируется активностью карнитин-пальмитоилтрансферазы (КПТ) [Sugden, Holness, 1994], переносящей ацильную группу от ацетил-КоА на карнитин через митохондриальную мембрану сердца, ставшую «жесткой» при низкой температуре [Iftikar, Hickey, 2013]. Сравнивая митохондриальный метаболизм сердца двух экотипично похожих рыб, антарктическую (*Trematomus newnesi*) и

умеренную (*Tautoga onitis*), Крокетт и Сиделл обнаружили у антарктических видов значительно более высокую активность КППТ (в 1.9 раза) и гидроксацил-КоА-дегидрогеназы (в 27.2 раза) [Crockett, Sidell, 1990].

По данным С.В. Шеховцова и соавторов [Shekhovtsov et al., 2020], в сердце сибирской лягушки *R. amurensis* в ответ на 17-дневную экстремальную гипоксию при 2 °С пулы аланина и лактата увеличиваются приблизительно в 4 раза, аспаратат снижается более чем в 3 раза, однако глутамат повышается, согласно рисунку авторов, лишь на 16%. В нашем исследовании в природных условиях при слабopоложительной температуре воды, возможно при незначительной гипоксии или даже её отсутствии, в сердце ротана почти за 4 месяца (с декабря до конца марта) пул аланина тоже увеличился, но всего лишь в 1.6 раза по сравнению с июльским значением (табл. 2). Концентрация аспаратата также снизилась, но всего в 1.2 раза. Однако уровень глутамата, в отличие от лягушки, не повысился, а даже незначительно снизился, с 2.7 до 1.9 мкмоль/г (табл. 2). Эти данные, за исключением глутамата, отражают принципиальное сходство соотношения ответов ключевых аминокислот, участвующих в энергетических процессах (в данном случае, аланина и аспаратата). Небольшое несовпадение ответов глутамата у рыбы ротана (табл. 2) и лягушки [Shekhovtsov et al., 2020], как и красноухой черепахи, также показавшей небольшое увеличение глутамата в условиях гипоксии [Bundgaard et al., 2019]), можно объяснить различиями условий воздействия на животных, биохимической специфичностью их метаболизма, а также чрезвычайно широкими биологическими функциями глутаминовой кислоты, реализующими эту специфичность.

Иная картина наблюдается у млекопитающих, в частности у сусликов, находящихся в состоянии длительного оцепенения при температуре сердца около 0 °С [Каранова, Захарова, 2023]. Энергетический метаболизм этих животных в конце торпора замедляется довольно существенно и, вероятно, за счёт подавления окислительного фосфорилирования и ЦТК, что находит отражение в трёхкратном падении уровня глутамата в конце торпора и

соответствующем трёхкратном возрастании уровня аланина [Там же]. Не слишком значительно различающиеся в сердце в конце зимней спячки пропорции участников анаплеротических реакций, глутамата, аланина, а также аспаратата (табл. 2, рис. 2), умеренно истощаемого малат-аспарататным челноком, свидетельствуют о не столь глубоком, как можно было ожидать, снижении активности ЦТК и переключении сердца *P. glenii* на энергетику экономичного анаэробного гликолиза, когда источником АТФ становится глюкоза. Возможно, это связано с тем, что в течение эксперимента рыбы оставались ниже уровня льда при слабopоложительных температурах.

Таким образом, наши данные об изменении аминокислотного профиля сердца *P. glenii* выявляют ещё один вариант адаптации, существующий у эвритермных рыб: умеренное снижение аэробной энергетики на протяжении длительного периода гипобиоза при околонулевой температуре.

Для поддержания температурно-специфической устойчивости сердца рыб активизируется экспрессия определённых генов [Vornanen et al., 2005; Long et al., 2020; Jiang et al., 2023]. Показано, что из 1380 проанализированных генов более 100 были дифференцированно экспрессированы у форели, акклимированной к холодным и тёплым температурам [Там же], при этом наиболее существенно были повышены транскрипты генов, участвующих в синтезе белка и промежуточном метаболизме.

Заключение

Итак, в природном водоёме с естественной сезонной динамикой температуры, у ротана при разном физиологическом состоянии, в том числе в состоянии гипобиоза, выявлена динамика содержания вторичных метаболитов и свободных аминокислот в сердечной мышце. Высокий уровень таурина в сердце *P. glenii* при сравнительно высокой температуре (+20...+25 °С), снижение в процессе температурной акклимации до +2 °С и продолжающееся снижение при стабильно низких температурах во время гипобиоза (+0.5...+1.5 °С) предполагает разные функции этого метаболита в сердце при разных температурах, од-

нако не исключает вероятность протекторной роли таурина при низких температурах.

Нарастающее повышение уровня ФЭА и его известные из литературы функциональные свойства, обеспечивающие перестройку клеточных мембран, дают основание для предположения регуляторной роли ФЭА в механизме переключения аэробного гликолиза на анаэробный во время гипобииоза.

Значительный уровень аспарагиновой кислоты в сердце и её динамика в разные периоды указывают на её актуальность для этого важного органа, опережающую актуальность для мозга, наблюдаемую ранее.

В течение длительного срока зимнего гипобииоза при положительных околонулевых температурах в сердце ротана не происходит значительного преобладания анаэробного гликолиза над аэробным, о чём может свидетельствовать соотношение пулов аланина и глутамата. Этот факт, вероятно, подтверждает наличие весьма успешного механизма адаптации ротанов к экстремальным условиям гипобииоза и, наряду с другими результатами, даёт дополнительное понимание механизмов холодоустойчивости этого вида рыб.

Благодарности

Авторы искренне благодарны директору лаборатории «ИЛ Тест-Пушино» В.М. Возняку за предоставленную помощь при анализе образцов, М.Г. Зибровой за ценные замечания по тексту, а также А.С. Карягиной и И.Г. Шоркунову за помощь в полевых работах на льду оз. Глубокое 1 апреля 2023 г.

Финансирование работы

Публикация подготовлена в рамках государственного задания № FFER-2024-0013.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

Процедура эксперимента с животными одобрена Комиссией по биоэтике Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (заключение № 10 от 8 июля

2017; продление 14.05.2018, 23.04.2021, 18.03.2024).

Литература

- Голованов В.К., Ручин А.Б. Критический термический максимум головешки-ротана *Perccottus glenii* в разные сезоны года // Вопр. ихтиол. 2011. Т. 51. № 6. С. 822–827.
- Каранова М.В. Влияние сезонного снижения температуры и холодового шока на состав свободных аминокислот и фосфомоноэфиров в разных органах ротана-головешки *Perccottus glenii* (Eleotridae) // Вопросы ихтиологии. 2018. Т. 58. № 4. С. 486–495.
- Каранова М.В. Адаптация к низким температурам икроножных мышц травяной лягушки *Rana temporaria* в начале анабиоза // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2021. Т. 57. № 1. С. 81–87.
- Каранова М.В., Захарова Н.М. Адаптивная модификация пулов аминокислот в миокарде длиннохвостого суслика *Urocitellus undulatus* на разных стадиях гибернации // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2023. Т. 59. № 4. С. 262–270. DOI: 10.31857/S0044452923040034, EDN: OTXJJC
- Решетников А.Н., Зиброва М.Г., Дгебуадзе Ю.Ю. *Perccottus glenii* Dybowski, 1877 // В кн.: Самые опасные инвазионные виды России (ТОП-100) / Ред. Ю.Ю. Дгебуадзе, В.Г. Петросян, Л.А. Хляп. М.: Т-во научных изданий КМК, 2018. С. 553–562.
- Соколов Л.И. О зимовке ротана в Амурских водоёмах // Вопр. ихтиол. 2001. Т. 41. № 4. С. 572–573.
- Сухаренко Е.В., Максимов В.И. Физиология рыб. М.: Изд-во ООО НПО «Сельскохозяйственные технологии», 2021. 156 с.
- Adibi S.A. Interrelationships between level of amino acids in plasma and tissues during starvation // American J. Physiology. 1971. Vol. 221. № 3. P. 829–838. DOI: 10.1152/ajplegacy.1971.221.3.829
- Boyd T.A., Cha C.J., Forster R.P., Goldstein L. Free amino acids in tissues of the skate *Raja erinacea* and the stingray *Dasyatis sabina*: Effects of environmental dilution // J. Exp. Zool. 1977. Vol. 199. P. 435–442. DOI: 10.1002/jez.1401990318
- Bröer S., Bröer A. Amino acid homeostasis and signaling in mammalian cells and organisms // Biochem J. 2017. Vol. 474. No. 12. P. 1935–1963. DOI.org/10.1042/BCJ20160822
- Bundgaard A., Qvortrup K., Rasmussen L.J., Fago A., Turtles maintain mitochondrial integrity but reduce mitochondrial respiratory capacity in the heart after cold acclimation and anoxia // Journal of Experimental Biology. 2019. Vol. 222(11), jeb200410
- Churchill T.A., Storey K.B. Freezing survival of the garter snake *Thamnophis sirtalis parietalis* // Can. J. Zool. 1992. No. 70. P. 99–105.
- Crockett E.L., Sidell B.D. Some pathways of energy metabolism are cold adapted in Antarctic fishes // Physiol. Zool. 1990. Vol. 63. P. 472–488. DOI: 10.1086/physzool.63.3.30156223

- Dawson R.Jr., Wallace D.R. Taurine content in tissues from aged Fischer 344 rats // *Age*. 1992. Vol. 15. P. 73–81.
- Farine L., Niemann M., Schneider A., Bütikofer P. Phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine biosynthesis by the Kennedy pathway occurs at different sites in *Trypanosoma brucei* // *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5. Article number: 16787. DOI: 10.1038/srep16787
- Gras J., Gudefin Y., Chagny F., Perrier H. Free amino acids and ninhydrin-positive substances in fish-II. Cardio-respiratory system: plasma, erythrocytes, heart and gills of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson) // *Comp. Biochem. Physiol.* 1982. Vol. 73B. No. 4. P. 845–847.
- Hamaguchi T., Azuma J., Schaffer S.W. Interaction of taurine with methionine: inhibition of myocardial phospholipid methyltransferase // *J Cardiovasc. Pharmacol.* 1991. Vol. 18. P. 224–230. DOI: 10.1097/00005344-199108000-00008.
- Hansen S.H., Andersen M.L., Birkedal H. et al. The Important Role of Taurine in Oxidative Metabolism // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2006. Vol. 583. P. 129–135. DOI: 10.1007/978-0-387-33504-9_13
- Hayward S.A.L., Manso B., Cossins A.R. Molecular basis of chill resistance adaptations in poikilothermic animals // *J. Exp. Biol.* 2014. Vol. 217. No. 1. P. 6–15. DOI: 10.1242/jeb.096537.
- Huxtable R.J. Expanding the circle 1975–1999 Sulfur biochemistry and insights on the biological functions of taurine // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2000. Vol. 483. P. 1–25.
- Iftikar F.I., Hickey A.J.R. Do Mitochondria Limit Hot Fish Hearts? Understanding the Role of Mitochondrial Function with Heat Stress in *Notolabrus celidotus* // 2013. Vol. 28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064120>
- Ito T., Pastukh V., Solodushko V., et al. Effect of Taurine on Protein Kinase C Isoforms: role in taurine's actions? // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009. Vol. 643. P. 3–11. DOI: 10.1007/978-0-387-75681-3_1.
- Jiang H., Wenqi Lv., Ying Wang et al. Multi-omics Investigation of Freeze Tolerance in the Amur sleeper, an Aquatic Ectothermic Vertebrate // *Mol. Biol. E.* 2023. Vol. 40. No. 3. P. msad040. DOI: 10.1093/molbev/msad040
- Jurss K., Bastrop R. Amino acid metabolism in fish // In: Hochachka P.W., Mommsen T.P. (eds), *Biochemistry and molecular Biology of fishes*. Elsevier. 1995. Vol. 4. P. 159–189.
- Karanova M. Free amino acid composition in blood and muscle of the gobi *Percottus glehni* at the period of preparation and completion of hibernation // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2009. Vol. 45. P. 67–77.
- Karanova M.V. Impact of seasonal temperature decrease and cold shock on the composition of free amino acids and phosphomonoethers in various organs of Amur sleeper *Percottus glenii* (Eleotridae) // *J. Ichthyol.* 2018. Vol. 58. P. 570–579. DOI: 10.1134/S0032945218040069
- Karanova M.V., Zakharova N.M. Pools of amino acids of skeletal muscle in Yakutian ground squirrel *Urocitellus undulatus* during different hibernation stages // *Biophys. J.* 2022. Vol. 67. No. 2. P. 288–293. DOI: 10.1134/S0006350922020105
- Karanova M.V., Zakharova N.M. Adaptive modification of amino acid pools in the myocardium of a Long-tailed ground squirrel *Urocitellus undulatus* at different stages of hibernation // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2023. Vol. 59. No. 4. P. 1027–1036. DOI: 10.1134/S0022093023040038
- Keen A.N., Klaiman J.M., Shiels H.A., Gillis T.E. Temperature-induced cardiac remodelling in fish // *J. Exp. Biol.* 2017. Vol. 220. P. 147–160. DOI: 10.1242/jeb.128496
- Kocsis J.L., Kostos V.J., Baskin S.I. Taurine levels in the heart tissues of various species // In: *Taurine* / Eds. R. Huxtable, A. Barblau. New York: Raven Press, 1976. P. 145–153.
- Long Y., Xixi Li, Fengyang Li, et al. Transcriptional programs underlying cold acclimation of Common carp (*Cyprinus carpio* L.) // *Front. Genet.* 2020. Vol. 23. No. 11. DOI: 10.3389/fgene.2020.556418
- Li Ling-Yu, Li Jia-Min, Ning Li-Jun, et al. Mitochondrial fatty acid β -oxidation inhibition promotes glucose utilization and protein deposition through energy homeostasis remodeling in fish // *The Journal of Nutrition*. 2020. Vol. 150. No. 9. P. 2322–2335. DOI: 10.1093/jn/nxaa187
- Lushchak V.I., Bagnyukova T.V. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Percottus glenii* // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2007. Vol. 148. No. 4. P. 390–397.
- Maplestone R.A., Stone M.J., Williams D.H. The evolutionary role of secondary metabolites – a review // *Gene*. 1992. Vol. 115. P. 151–157. DOI: 10.1016/0378-1119(92)90553-2
- Miyamoto T.A., Takayuki U., Yoshihumi I., et al. Taurine-mediated cardioprotection is greater when administered upon reperfusion than prior to ischemia // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009. Vol. 647. P. 27–36. DOI: 10.1007/978-0-387-75681-3_3
- Modica-Napolitano J.S., Renshaw P.F. Ethanolamine and phosphoethanolamine inhibit mitochondrial function *in vitro*: implications for mitochondrial dysfunction hypothesis in depression and bipolar disorder // *Biol. Psychiatry*. 2004. Vol. 55. P. 273–277. DOI: 10.1016/S0006-3223(03)00784-4
- Nishimura M., Tanaka H., Homma N., et al. Ionic mechanisms of the depression of automaticity and conduction in the rabbit atrioventricular node caused by hypoxia or metabolic inhibition and protective action of glucose and valine // *Am. J. Cardiol.* 1989. Vol. 64. P. 24–28. DOI: 10.1016/0002-9149(89)91193-4
- Ogasawara M., Nakamura T., Koyama I., et al. Reactivity of taurine with aldehydes and its physiological role // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994. Vol. 359. P. 71–78. DOI: 10.1248/cpb.41.2172
- Pisarenko O. Mechanisms of myocardial protection by amino acids: Facts and hypotheses // *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 1996. Vol. 23. No. 8. P. 627–633. DOI: 10.1111/j.1440-1681.1996.tb01748.x
- Ripps H., Shen W. Review: taurine: a “very essential” amino acid // *Molecular Vision*. 2012. Vol. 18. P. 2673–2686.
- Satoh H. $[Ca^{2+}]_i$ -dependent actions of taurine in spontaneously beating rabbit sino-atrial nodal cells // *Eur. J. Pharmacol.* 2001. Vol. 424. P. 19–25. DOI: 10.1016/S0014-2999(01)01128-1

- Satoh H., Horie M. Actions of taurine on the L-type Ca²⁺ channel current in guinea pig ventricular cardiomyocytes // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1997. Vol. 30. P. 711–716. DOI: 10.1097/00005344-199712000-00002
- Satoh H., Sperelakis N. Review of some actions of taurine on ion channels of cardiac muscle cells and others // *Gen. Pharmacol.* 1998. Vol. 30. P. 451–463. DOI: 10.1016/s0306-3623(97)00309-1
- Schaffer S.W., Azuma J., Matura J.D. Mechanisms underlying taurine-mediated alterations in membrane function // *Amino Acids.* 1995. Vol. 8. P. 231–246. DOI: 10.1007/BF00806821
- Shekhovtsov S.V., Bulakhova N.A., Tsentelovich Y.P., Zelentsova E.A., Yanshole L.V., Meshcheryakova E.N., Berman D.I., Metabolic response of the Siberian wood frog *Rana amurensis* to extreme hypoxia // *Scientific Reports.* 2020. Vol. 10. Article number: 14604
- Schwartz R.G., Barrett E.J., Francis C.K., Jacob R., Zaret B.L. Regulation of Myocardial of Amino Acid Balance In the conscious dog // *J. Clin. Invest.* 1985. Vol. 75. P. 1204–1211.
- Spachman D.H., Stein W.H., Moore S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids // *Anal. Chem.* 1958. Vol. 30. No. 7. P. 1190–1206.
- Sugden M.C., Holness M.J. Interactive regulation of the pyruvate dehydrogenase complex and the carnitine palmitoyltransferase system // *FASEB J.* 1994. Vol. 8. P. 54–61. DOI: 10.1096/fasebj.8.1.8299890
- Thurston J.H., Hauhart R.E., Naccarato E.F. Taurine: possible role in osmotic regulation of mammalian heart // *Science.* 1981. Vol. 214. No. 4527. P. 1373–1374.
- Tibbits G.F., Philipson K.D., Kashiwara H. Characterization of myocardial Na(+)-Ca²⁺ exchange in rainbow trout // *Am. J. Physiol.* 1992. Vol. 262. No. 2. P. 411–417. DOI: 10.1152/ajpcell.1992.262.2.C411
- Vornanen M., Hassinen M., Koskinen H., Krasnov A. Steady-state effects of temperature acclimation on the transcriptome of the rainbow trout heart // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005. Vol. 289. No. 4. P. 1177–1184. DOI: 10.1152/ajpregu.00157.2005
- Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition // *Amino Acids.* 2009. Vol. 37. P. 1–17 DOI: 10.1007/s00726-009-0269-0

DYNAMICS OF SECONDARY METABOLITES AND FREE AMINO ACIDS IN THE HEART OF THE FISH ROTAN *PERCCOTTUS GLENII* (ODONTOBUTIDAE) DURING WINTER HYPOBIOSIS

© 2024 Karanova M.V.^a, Gagarinsky E.L.^a, Petrukhin O.V.^b, Reshetnikov A.N.^{c,*}

^aInstitute of Cell Biophysics, FRC PSCBR, RAS, Pushchino, 142290, Russia

^bLaboratory “IL Test-Pushchino”, Pushchino, 142290, Russia

^cEcology and Evolution Institute, RAS, Moscow, 119071, Russia

e-mail: *anreshetnikov@yandex.ru

The freshwater fish *P. glenii* is of interest due to its tolerance to a wide range of environmental temperatures; however, the details of the mechanisms of its low-temperature adaptation have been insufficiently studied. Our previous work has shown the involvement of secondary metabolites and amino acids in the compensatory responses to near-zero temperatures of skeletal muscles, brain tissue, blood plasma, and liver of *P. glenii*. In the current study we report their compensatory responses in the heart. It has been shown that at the beginning of hypobiosis (December), at a water temperature of +1 °C, the level of taurine almost halves in comparison with summer concentration ($9.70 \pm 0.55 \mu\text{mol/g}$ wet weight), and it decreases further to $3.80 \pm 0.25 \mu\text{mol/g}$ by the end of winter hypobiosis (beginning of April). Phosphoethanolamine was not detected in summer, but it appears in December ($0.81 \pm 0.07 \mu\text{mol/g}$), and increases until the end of hibernation. Cysteic acid was also found only in December but its concentration decreased before the end of hibernation. The ratio of glutamate and alanine pools, the indicator of the metabolic contribution of aerobic and anaerobic energy, showed slight decrease of glutamate during hypobiosis and increase of alanine. Amino acid responses suggest that oxidative phosphorylation and the tricarboxylic acid cycle are actively involved in the energy supply of the heart of *P. glenii* even at the end of hypobiosis.

Keywords: alanine, Amur sleeper, Chinese sleeper, Glubokoe Lake Hydrobiological Station, glutamate, low-temperature adaptation, phosphoethanolamine, taurine.