

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА И АДЕНИЛАТНАЯ СИСТЕМА КАМЕР СЕРДЦА ЧЕРНОМОРСКОЙ СКОРПЕНЫ (*SCORPAENA PORCUS L.*) ПРИ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ

© 2021 г. Е. Э. Колесникова^{1,*}, А. А. Солдатов¹, И. В. Головина¹,
И. В. Сысоева¹, А. А. Сысоев¹, Т. А. Кухарева¹

¹ ФГБУН ФИЦ “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН”, Севастополь, Россия

*e-mail: dr-kolesnikova@mail.ru

Поступила в редакцию 14.04.2021 г.

После доработки 15.06.2021 г.

Принята к публикации 17.06.2021 г.

Сердце рыб представляет собой уникальную модель для сравнения устойчивости к гипоксии двух камер сердца (предсердие, желудочек), различающихся по строению и функциональной нагрузке. В условиях острой гипоксии ($0.9\text{--}1.2\text{ мг О}_2\text{ л}^{-1}$, 90 мин) изучали активность оксидоредуктаз (МДГ, 1.1.1.37; ЛДГ, 1.1.1.27) и параметры аденилатной системы в камерах сердца черноморской скорпены. Несмотря на главенствующую функциональную роль желудочка, активность МДГ в нем имела тенденцию к понижению по сравнению с предсердием при отсутствии различий в активности ЛДГ. Вместе с тем разница в содержании аденилатов (АТФ, АДФ, АМФ), суммарном аденилатном пуле (АП) и аденилатном энергетическом заряде (АЭЗ) между предсердием и желудочком была статистически незначимой, хотя абсолютное значение АП желудочка было практически в два раза больше АП предсердия. Величина АЭЗ перфузируемых венозной кровью предсердия и желудочка не превышала ~ 0.7 (против максимальных значений этого показателя $\sim 0.9\text{--}1.0$), что, по-видимому, отображает энергетический статус тканей, исходно адаптированных к условиям гипоксии. При острой гипоксии отмечалось две стратегии преобразования метаболизма относительно камер сердца в виде падения активности МДГ в 2.4 раза ($p < 0.05$) в предсердии и прироста активности ЛДГ в 2.2 раза ($p < 0.05$) в желудочке. Вероятно, снижение активности МДГ в ткани предсердия детерминировано более пассивной функцией этой камеры сердца в обеспечении кровотока. Острая гипоксия приводила к уменьшению количества адениловых нуклеотидов и убыванию АЭЗ в камерах сердца, что было наиболее явно выражено в миокарде желудочка. При снижении PO_2 сдвиги АЭЗ камер сердца происходили в достаточно узком диапазоне (от 0.7 до 0.6), что указывало на сохранение определенного стационарного энергетического состояния, достигаемого путем торможения потребления или потребности в АТФ. Предполагаемый нами механизм удержания величины АЭЗ может базироваться на отрицательном хронотропном эффекте гипоксии.

Ключевые слова: рыбы, гипоксия, камеры сердца, малатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, аденилатная система

DOI: 10.31857/S0044452921050089

ВВЕДЕНИЕ

Главный орган сердечно-сосудистой системы позвоночных животных — сердце — является аэробным органом, нуждающимся в постоянном снабжении АТФ. Высвобождающаяся в результате гидролиза АТФ энергия используется клетками сердца — кардиомиоцитами — для осуществления сокращений и поддержания внутриклеточного баланса ионов [1]; запас АТФ кардиомиоцитов ограничен настолько, что может обеспечить лишь незначительное количество сокращений в течение нескольких секунд.

Адаптивные возможности живых организмов в водной среде с постоянно варьирующим уровнем O_2 (P_wO_2) в значительной степени зависят от эффективности взаимодействия аэробного и анаэробного путей энергетического метаболизма и баланса между энергетическим обменом и запросом на макроэргические соединения. Реакции, которые обеспечивают оксидоредуктазы — малатдегидрогеназа (L-малат: НАД-оксидоредуктаза; МДГ, 1.1.1.37) и лактатдегидрогеназа (лактат: НАД-оксидоредуктаза; ЛДГ, 1.1.1.27), являются неотъемлемой частью нормального метаболизма и адаптации к изменяющимся условиям водной среды обита-

ния. Цитозольная форма МДГ принимает участие в аэробном гликолизе и малат-аспартатном шунте, окисляя поступающий из митохондрий малат в оксалоацетат с образованием НАДН, в то время как ЛДГ катализирует заключительный этап анаэробного гликолиза. Оба фермента обеспечивают производство макроэргов и регуляцию окислительно-восстановительного потенциала клеток; в качестве показателя интенсивности и направленности окислительных процессов в тканях используют соотношение их активности [2]. Изменение гидрохимических характеристик среды, прежде всего содержания O_2 , вызывает сдвиги между аэробным и анаэробным метаболизмом, включающие активность оксидоредуктаз.

Центральное место в энергообмене клеток всех типов принадлежит аденилатной системе, включающей АТФ, АДФ и АМФ [3]. Причем энергетический статус клеток в каждый определенный момент зависит от относительных концентраций всех трех компонентов. Для оценки энергетического состояния клеток используют показатель энергетического заряда аденилатной системы (АЭЗ), которая осуществляет регуляцию внутриклеточных процессов, ответственных за поставку и утилизацию энергии, поддерживает оптимальный уровень функционирования с наименьшими затратами энергии.

Недостаточное поступление O_2 (гипоксия) приводит к переключению аэробного энергетического метаболизма на анаэробный путь, что ведет к уменьшению количества производимого АТФ (вырабатывается только 2 молекулы АТФ вместо 38), нарастанием внутриклеточного ацидоза и неконтролируемым распадом АТФ на АДФ и АМФ [3].

Черноморская скорпена *Scorpaena porcus* является объектом многочисленных исследований, обладает значительной устойчивостью к действию ряда стрессорных факторов, включая гипоксию/аноксию [4, 5]. Как известно, сердце рыб гомологично сердцу человека [6]. Раскрытие сущности адаптивных процессов миокарда скорпены, способной длительно находиться в среде с крайне низкой концентрацией кислорода (менее $0.5 \text{ мг } O_2 \text{ л}^{-1}$ vs. норма — $7\text{--}8 \text{ мг } O_2 \text{ л}^{-1}$), представляет не только теоретический, но и практический интерес, который опирается на представление о существовании базовых, повторяющихся в разных таксономических группах позвоночных механизмах функционирования сердечной мышцы [7]. Вместе с тем считают, что сердце рыб обладает поразительной морфофункциональной пластичностью, проявляющейся при онтогенетических метаморфозах и эколого-физиологических трансформациях [8]. Оценка энергетической пластичности миокарда рыб, относящегося к разным отделам сердца с разной функциональной нагрузкой, также способна расширить границы представлений об

эталоне сердечной деятельности с максимальным анаэробным потенциалом.

Целью нашей работы было изучение активности ферментов энергетического обмена и параметров аденилатной системы в тканях камер сердца *Scorpaena porcus* в условиях острой гипоксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили половозрелые особи *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 в летний период (16 экз., длина тела — $13\text{--}17 \text{ см}$, вес — $100\text{--}190 \text{ г}$, стадия зрелости гонад VI–II) при температуре воды в море $21\text{--}23^\circ\text{C}$. Рыбу отлавливали в июле 2020 г. ставным неводом в прибрежной зоне на внешнем рейде Севастопольской бухты ($44^\circ36'50''\text{N}$ $33^\circ30'00''\text{E}$) и доставляли в лабораторию в пластиковых баках объемом 60 л с принудительной аэрацией. Для снятия стресса после отлова и транспортировки скорпену содержали одну неделю в проточном аквариуме, кормили рыбным фаршем, в работе использовали только подвижных и активно питающихся особей.

Экспериментальная часть выполнена с применением специально разработанного стенда, который позволяет стабилизировать температуру и концентрацию кислорода в воде на протяжении необходимого времени. Температура воды в рабочей камере поддерживалась на уровне $21\text{--}22^\circ\text{C}$, контрольная группа рыб содержалась при $5.6\text{--}6.7 \text{ мг } O_2 \text{ л}^{-1}$ (нормоксия). После адаптации к этим условиям (24 ч) концентрацию кислорода в воде снижали в течение $15\text{--}20 \text{ мин}$ до $0.9\text{--}1.2 \text{ мг } O_2 \text{ л}^{-1}$ путем прокачивания азота. Экспозиция особей в эксперименте составляла 90 мин. Содержание кислорода в воде контролировали потенциометрически с помощью оксиметра DO Meter ST300D RU (“Ohaus”, США).

Препарирование тканей, гомогенизацию и центрифугирование проводили при охлаждении ($0 \pm 4^\circ\text{C}$). Сердце для исследования брали сразу после декапитации рыб и разделяли на предсердие и желудочек (рис. 1), ткани до анализа активности ферментов и содержания аденилатов хранили при температуре -80°C в морозильной камере (Farma 900 Series, TermoScientific, США).

Активность цитоплазматической МДГ и ЛДГ измеряли спектрофотометрически (СФ-2000 ОКБ “Спектр”, Россия) в кварцевой кювете с ходом луча 10 мм , объемом 3 мл при длине волны 340 нм по скорости окисления восстановленной формы кофермента НАДН, используя в качестве среды выделения 0.2 М Трис-НСI буфер, рН 7.5, как описано ранее [5]. Реакцию начинали внесением экстракта и снимали отсчеты через 30 с в течение $2\text{--}3 \text{ мин}$. Субстратом для определения активности ЛДГ служил пируват, для МДГ — оксалоацетат. Активность МДГ, ЛДГ определяли при температуре

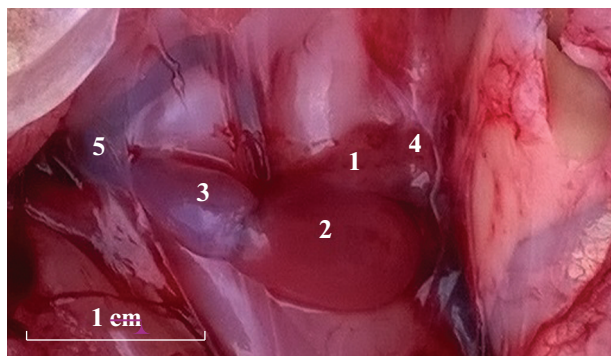


Рис. 1. Сердце *Scorpaena porcus*. 1 – предсердие; 2 – желудочек; 3 – луковичка аорты; 4 – венозный синус, 5 – брюшная аорта.

инкубации реакционной смеси 25°C. Удельную активность ферментов выражали в мкмольх НАДН мин⁻¹ мг⁻¹ белка супернатанта. Содержание белка определяли микробиуретовым методом, экстинкцию измеряли при длине волны 330 нм. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали препарат кристаллического сывороточного альбумина.

Содержание адениловых нуклеотидов миокарда скорпены регистрировали хемилюминесцентным методом [9]. Результаты выражали в мкмольх г⁻¹ сырой массы ткани. Средняя масса навески предсердия составляла 4.81 мг, желудочка сердца – 6.89 мг. Исследуемые ткани гомогенизировали в 0.1 М трис-ацетатном буфере, рН 7.75, на холоде. Аденилатный комплекс экстрагировали в кипящем буфере на водяной бане в течение 5 мин. Полученные экстракты замораживали до дальнейшего анализа. Определение АТФ проводили по стандартной методике, по световой эмиссии с добавлением люциферин-люциферазы на приборе

АТФ-Luminometer 1250 (ЛКВ, Швеция). АДФ и АМФ восстанавливали до АТФ с применением энзимов пируваткиназы и аденилаткиназы. Аденилатный энергетический заряд (АЭЗ) рассчитывали, используя концентрацию (С) нуклеотидов по формуле [10]:

$$АЭЗ = \frac{C_{АТФ} + 1/2C_{АДФ}}{C_{АТФ} + C_{АДФ} + C_{АМФ}}$$

Результаты представлены как $M \pm m$. Нормальность распределения проверена при помощи критерия Пирсона. Статистическое сравнение выполнено на основе двустороннего t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Парный линейный коэффициент корреляции Пирсона (r) рассчитывали между активностью МДГ, ЛДГ и содержанием АТФ в камерах сердца. Статистическая обработка и графическое оформление полученной информации проводили при помощи стандартного программного обеспечения Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные нами значения исследованных параметров – активности МДГ, ЛДГ, содержания адениловых нуклеотидов и величина АЭЗ – свидетельствуют о существовании различий в энергетическом обмене отделов миокарда *Scorpaena porcus* в условиях нормоксии и острой гипоксии (рис. 2 и 3).

Нормоксия. В предсердии скорпены зарегистрирована самая высокая активность МДГ (6.39 ± 0.92 мкмоль НАДН₂ мин⁻¹ мг⁻¹ белка), что на 28% выше, чем в желудочке сердца (4.59 ± 0.87 мкмоль НАДН₂ мин⁻¹ мг⁻¹ белка), однако различия не были статистически значимы ($p > 0.05$) (рис. 2а). Так же не выявлено существенных различий между отделами миокарда по активности ЛДГ

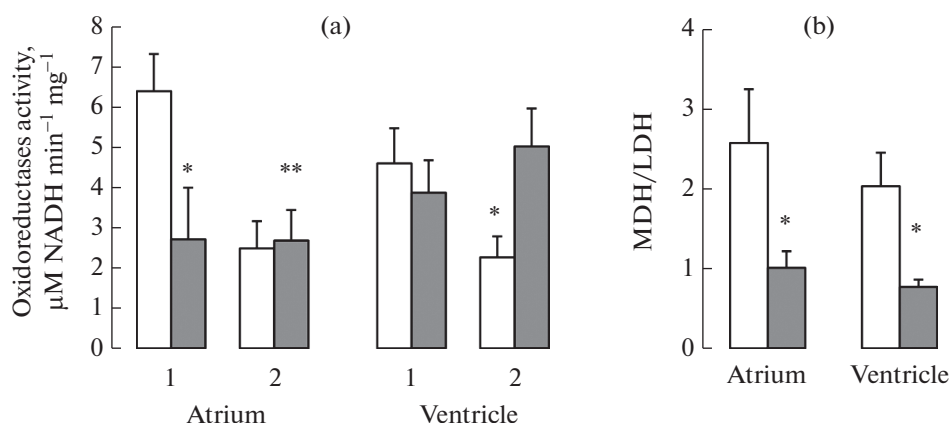


Рис. 2. Активность оксидоредуктаз (а) и индекс МДГ/ЛДГ (б) в камерах сердца *Scorpaena porcus*. Светлые столбики – нормоксия, темные – острая гипоксия; 1 – МДГ; 2 – ЛДГ; * – достоверно по сравнению с нормоксией, $p < 0.05$; ** – достоверно при сравнении камер сердца, $p < 0.05$.

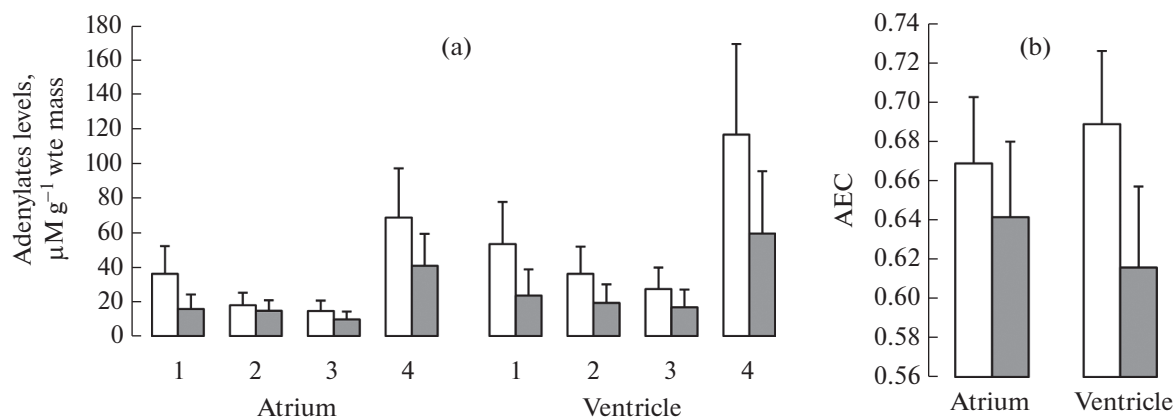


Рис. 3. Содержание аденилатов (а) и аденилатный энергетический заряд (б) в камерах сердца *Scorpaena porcus*. Светлые столбики – нормоксия, темные – острая гипоксия; 1 – АТФ; 2 – АДФ; 3 – АМФ; 4 – аденилатный пул.

(2.48 vs 2.26 мкмоль НАДН₂ мин⁻¹ мг⁻¹ белка) и величине индекса МДГ/ЛДГ (2.57 vs 2.03) (рис. 2а и 2b). В желудочке величина коэффициента корреляции (*r*) в системе МДГ↔ЛДГ достигала 0.85 (*p* < 0.05) (табл. 1).

Содержание каждого аденилата (АТФ, АДФ, АМФ), их общий пул (АП) и АЭЗ были незначительно выше в желудочке сердца (*p* > 0.05) (рис. 3). Величина *r* для АЭЗ между предсердием и желудочком составила 0.68 (*p* = 0.05). Корреляция между активностью ферментов и содержанием АТФ достигала 0.90–0.99 (*p* < 0.05–0.001) (табл. 1).

Острая гипоксия вызвала снижение активности МДГ в предсердии в 2.4 раза (*p* < 0.05), активность ЛДГ сохранилась на прежнем уровне, в результате индекс МДГ/ЛДГ уменьшился в 2.5 раза (*p* < 0.05) и составил 1.01 (рис. 2b). По сравнению с нормок-

сией корреляция в системе МДГ↔ЛДГ предсердия увеличилась вдвое (*r* = 0.86, *p* < 0.05) (табл. 1).

Напротив, в желудочке сердца активность МДГ незначительно снизилась, в то время как активность ЛДГ достоверно увеличилась в 2.2 раза до 5.01 мкмоль НАДН₂ мин⁻¹ мг⁻¹ белка (*p* < 0.05) (рис. 2а). Таким образом, активность ЛДГ в желудочке вдвое превысила таковую в предсердии (*p* < 0.05). Величина индекса МДГ/ЛДГ уменьшилась в 2.6 раза и составила 0.77 (*p* < 0.05) (рис. 2b). Корреляция в системе МДГ↔ЛДГ желудочка сердца еще более увеличилась (*r* = 0.98, *p* < 0.05) (табл. 1).

В условиях острой гипоксии содержание АТФ, АДФ, АМФ и величина АП в камерах сердца уменьшались в 1.5–2.3 раза, наибольшие изменения происходили с АТФ, но различия не были статистически значимы (*p* > 0.05) (рис. 3а). Корреляция между активностью ферментов и содержанием АТФ в желудочке составляла 0.96–0.99 (*p* < 0.001) (табл. 1). АЭЗ незначительно понизился в предсердии с 0.67 до 0.64, в желудочке – с 0.69 до 0.62 (рис. 3b). Величина *r* для АЭЗ между отделами миокарда возросла до 0.82 (*p* < 0.05).

Таблица 1. Коэффициент корреляции (*r*) между активностью МДГ, ЛДГ и содержанием АТФ при нормоксии и острой гипоксии в камерах сердца *Scorpaena porcus*

Ткани Tissues	Концентрация кислорода, мг О ₂ л ⁻¹ Concentration of O ₂ , mg L ⁻¹	
	5.6–6.7	0.9–1.2
Предсердие/Heart atrium		
МДГ ↔ ЛДГ	0.42	0.86*
МДГ ↔ АТФ	0.66	0.78*
ЛДГ ↔ АТФ	0.77*	0.80*
Желудочек/Heart ventricle		
МДГ ↔ ЛДГ	0.85*	0.98**
МДГ ↔ АТФ	0.90*	0.99**
ЛДГ ↔ АТФ	0.99**	0.96**

Примечание. * – *p* < 0.05; ** – *p* < 0.001.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для понимания механизмов устойчивости сердца к гипоксии решающее значение имеют фундаментальные знания о сердечном метаболизме [11]. “Пойкилотермное” сердце рыб представляет собой уникальную модель для сравнения толерантности к кислородному голоданию двух камер сердца, которые различаются по строению, функциональной нагрузке и характеру кровоснабжения.

Как известно, заключенное в перикардиальный мешок (перикардиальную мембрану) сердце костистых рыб находится вблизи жаберного аппарата в небольшой околосердечной полости и состоит

только из двух камер — предсердия и желудочка (двухкамерное сердце). Предсердие имеет вид мышечной камеры неправильной формы с тонкой трабекулированной стенкой [12]. По сравнению с предсердием желудочек, обеспечивающий сердечный выброс и генерирующий высокое давление в кровеносной системе, может отличаться относительным разнообразием массы, морфологии, гистологии и васкуляризации у разных видов рыб [12]. Вместе с тем типичное сердце рыб (“венозное сердце”, сердце I типа) построено из губчатого (трабекулированного) миокарда и снабжается только венозной кровью из межтрабекулярных пространств (трабекулярных полостей, лакун) при полном отсутствии коронарного кровообращения [14].

По сравнению с сердцем гомойотермных животных (птиц, млекопитающих) сердце рыб обычно функционирует, сталкиваясь с относительно низкими и переменными уровнями парциального давления кислорода (P_{O_2}) [12, 13]. Среди позвоночных животных костистые рыбы демонстрируют самые высокие межвидовые различия в паттернах морфодинамических механических характеристик [12, 13] и способе снабжения кислородом структур сердца [11], что определяет рабочий потенциал миокарда камер сердца.

Активность оксидоредуктаз миокарда скорпены при нормоксии. Малоподвижный образ жизни придонных видов рыб (включая скорпену) предполагает наличие у них “аваскулированной/венозной” разновидности сердца без коронарного кровоснабжения [14]. Одновременно не вызывает сомнения тот факт, что сердце скорпены является оксифильным органом, имеющим высокие энергетические потребности, интенсивность метаболизма которого сопоставима с ее мозгом [15, 5], что позволяет синхронизировать высокую интенсивность аэробного и анаэробного метаболизма обеспечивающих выживание организма структур. Вместе с тем нами было установлено, что производство энергии в камерах сердца скорпены характеризуется следующими отличительными чертами. При условии кровоснабжения камер сердца скорпены исключительно венозной кровью с характерным для рыб низким напряжением кислорода (P_{vO_2}) [16], предсердие и желудочек демонстрировали сопоставимо высокие показатели активности МДГ по сравнению со снабжаемым исключительно артериальной кровью O_2 -зависимым мозгом [5].

Одновременно, несмотря на условно главенствующую функциональную роль желудочка, активность МДГ данной структуры имела тенденцию к понижению по сравнению с предсердием. Доминирующим фактором, влияющим на снабжение O_2 структур сердца, являются тип и общая емкость сердечного кровоснабжения [11], что, по-видимому, может определять особенности энергетическо-

го метаболизма ткани. Для сердечной ткани рыб некоторое снижение кровообращения может сопровождаться понижением уровня ее метаболизма, что проявляется на фоне вялой двигательной функции донных рыб [15]. Сложная лакунарная организация миокарда рыб по принципу “много маленьких сердец” в границах “большого” желудочка [17] позволяет предполагать высокую вариабельность P_{O_2} [14] либо наличие отрицательного градиента P_{vO_2} по мере удаления от основного просвета камеры до конечных участков лакун на фоне замедленного кровотока, что, по-видимому, может детерминировать флуктуации в работе оксидоредуктаз энергетического метаболизма.

При нормоксии активность ЛДГ в обеих камерах сердца скорпены имела сопоставимые значения. Считают, что более низкие значения активности ЛДГ, в частности, по сравнению с разновидностью мышечной ткани — белыми мышцами, являются характерной особенностью сердечной мышцы, определяемой преимущественно аэробным метаболизмом данного органа [15].

Кроме того, в сердце скорпены было отмечено достаточно высокое соотношение МДГ/ЛДГ как в предсердии, так и желудочке относительно аналогичных показателей упоминавшихся выше тканей мозга [5]. Предполагают, что такого рода высокие значения индекса МДГ/ЛДГ могут свидетельствовать об ослабленном преобразовании пирувата в лактат, что, как следствие, направляет метаболизм углеводов в сторону их наиболее полного окисления [18]. Установленный нами характер отношения МДГ/ЛДГ является дополнительным свидетельством “приверженности” миокарда скорпены к аэробному метаболизму, его оксифильности.

Несмотря на характерные для рыб низкие значения P_{vO_2} [16] перфузирующей сердце венозной крови, вероятно, существует ряд механизмов, позволяющих оксифильным кардиомиоцитам (в частности, желудочка) увеличивать экстракцию O_2 . Факторами, способствующими увеличению экстракции O_2 , являются большая площадь поверхности губчатого миокарда, расположение трабекул губчатого миокарда тонкими слоями для уменьшения диффузионного расстояния, минимизация внутреннего диффузионного расстояния за счет веретенообразной формы мышечных клеток. Также активность оксидоредуктаз может коррелировать с некоторыми чертами тканевой морфологии, такими как соотношение миофибриллярных и периферических митохондриальных популяций внутри кардиомиоцитов, объемная плотность митохондрий или разделение миокарда на типы клеток, “предпочитающих” аэробный или анаэробный метаболизм [19, 20]. Дополнительным фактором, поддерживающим высокую эффективность энергетического метаболизма желудочка, может быть повышенное содержание миоглобина в кар-

диомиоцитах (*myoglobin-rich hearts*), которое позволяет сердцу рыб экстрагировать постоянное количество кислорода даже при снижении его содержания в перфузате [21] независимо от скорости перфузии [22].

Аденилатная система миокарда скорпены при нормоксии. Разница в содержании аденилатного пула (АП) между предсердием и желудочком была статистически незначимой, хотя абсолютные значения АП между камерами сердца отличались практически вдвое. Закономерность неравномерного распределения аденилатов относительно камер сердца ранее была зафиксирована у млекопитающих [23], у которых наибольшее количество аденилатовых нуклеотидов приходится на желудочки сердца. У скорпены абсолютная величина АП и уровень АЭЗ миокарда желудочка как основной нагнетающей камеры отражают его специфические потребности в макроэргах и потенциальные возможности для осуществления синтеза/ресинтеза АТФ, которые определяют большие способности к напряжению мышечной ткани [24]. Вероятно, величина АЭЗ предсердия и желудочка, не превышающая ~0.7 (против максимальных значений показателя ~0.9–1.0), также отображает энергетический статус тканей, адаптированных к условиям гипоксемии.

Очевидно, что при кровоснабжении миокарда венозной кровью уровень активности ферментов цикла Кребса и гликолитических ферментов (включая изучаемые нами МДГ, ЛДГ) на фоне сравнительно невысоких показателей АЭЗ скорпены позволяет ей существовать за счет характерной для пойкилотермных животных высокой аэробной и гликолитической емкости тканей сердца, определяемых соотношением активности креатинкиназы к цитохром *c*-оксидазе и пируваткиназы к цитохром *c*-оксидазе [25, 11], которые поддерживают производство АТФ, и в полной мере удовлетворяет энергетические запросы миокарда малоактивного хищника-засадчика (“sit-and-wait” or ambush predator) с низкой ЧСС (11–14 ударов/мин).

Активность оксидоредуктаз миокарда при острой гипоксии. В условиях резкого ограничения доступности O_2 (гипоксии) анаэробный метаболизм становится основным источником продукции АТФ для кардиомиоцитов. Гипоксия сопровождается увеличением удельной активности ЛДГ, что характерно для многих тканей (печень, мозг, мышцы), включая сердце, и указывает на их переход к анаэробному дыханию и снижению потребления энергии [26]. Так, в частности, подобное воздействие гипоксии на активность ЛДГ было зафиксировано в миокарде ряда видов рыб — ангольского клариуса *Clarias batrachus* [26], астронотуса *Astronotus crassipinnis* и дискуса *Symphysodon aequifasciatus* [27].

У скорпены, подвергшейся экспозиции к гипоксии, изменения активности оксидоредуктаз относительно камер сердца носили разнонаправленный характер. Существенное падение активности МДГ было найдено только в предсердии. Напротив, в ткани желудочка заметно возросла активность ЛДГ. Вместе с тем соотношение МДГ/ЛДГ в обеих камерах сердца уменьшалось пропорционально, что указывало на снижение выработки АТФ (метаболическая депрессия).

Как известно, основная роль МДГ заключается в обеспечении промежуточных метаболитов (оксалоацетата) для цикла Кребса, используемых в качестве источника углерода в окислительном метаболизме [26]. По-видимому, менее выраженное снижение активности МДГ в желудочке скорпены под воздействием гипоксии было сопряжено с двойственной функцией этого фермента в аэробном и анаэробном метаболизме [28], хотя следует признать, что при включении резервных механизмов анаэробного пути вклад МДГ не является определяющим. С другой стороны, достоверное падение активности МДГ в ткани предсердия может детерминироваться более пассивной функцией этой камеры сердца в обеспечении кровотока.

Предполагают, что в направленности и “объеме” метаболической реакции миокарда рыб на воздействие гипоксии существенное значение отводится экспрессии изоформ ЛДГ [27]. Так, при снижении PO_2 в сердце *Astronotus ocellatus* происходит снижение экспрессии ЛДГ сердечного типа с сопутствующим замещением этого типа фермента на ЛДГ мышечного типа. Показано, что преобладание ЛДГ мышечного типа в миокарде *Astronotus crassipinnis* связано с активацией анаэробного гликолиза на фоне накопления пирувата, которое возникает при снижении окислительного метаболизма. Фактически, в условиях кислородного голодания в миокарде наблюдается увеличение активности ЛДГ одновременно со снижением активности катализирующей реакцию конденсации ацетата (ацетил-СoА) и оксалоацетата цитратсинтазы (CS, *citrate synthase*), лимитирующей первый этап цикла Кребса [27]. Таким образом, в сердце таких животных происходит подавление окислительного метаболизма с последующей активацией анаэробного гликолиза, что обычно наблюдается у так называемых “хороших анаэробов”, таких, как водные черепахи и некоторые виды рыб [28]. Очевидно, что при острой гипоксии миокард желудочка скорпены проявляет “хорошие” анаэробные качества с высокой активностью ЛДГ.

Анализ корреляционных связей между изучаемыми показателями сердца скорпены показывает наличие очень тесной взаимосвязи между активностью оксидоредуктаз энергетического метаболизма и продукцией макроэргов, которая максимально проявляется в его желудочке. При гипоксии уста-

новленные связи подобного рода усиливаются во всех камерах сердца, отражая высокую степень сопряжения и координации путей производства АТФ, которые обеспечивают устойчивость миокарда к дефициту O_2 . Следует отметить определенное постоянство проявления взаимосвязи активности ЛДГ и количества АТФ в камерах сердца при разных значениях PwO_2 , “гарантирующее” резервные возможности миокарда.

Аденилатная система миокарда при гипоксии. Экспозиция к гипоксии сопровождалась снижением содержания адениловых нуклеотидов в камерах сердца скорпены. Данный факт согласуется с перераспределением топографии аденилатов в сердце млекопитающих при снижении PO_2 в виде резкого уменьшения содержания АТФ в тканях желудочков [23], что перекликается с распределением аденилатов и АП *per se* в миокарде скорпены. По-видимому, выраженный характер изменения содержания АТФ, АДФ, АМФ на фоне убывания АЭЗ в миокарде желудочка служит признаком физиологического напряжения данной камеры, опирающегося на гликолиз в условиях гипоксии.

Вместе с тем при снижении PwO_2 изменения суммарного АП камер сердца сопровождались такими сдвигами АЭЗ, которые, не будучи статистически достоверными, предполагают либо слабую тенденцию к снижению АЭЗ, либо могут быть истолкованы как удержание данного показателя в определенных пределах (стационарное энергетическое состояние). Величина АЭЗ определяет скорости реакций цикла Кребса и других процессов, связанных с преобразованием энергии, поскольку заполнение системы АТФ—АДФ—АМФ высокоэнергетическими фосфатными связями лежит в основе аллостерической регуляции активности ферментов, которые контролируют скорость протекания упомянутых процессов. Уменьшение АЭЗ расценивается как явный маркер ухудшения энергообеспечения ткани. Поскольку в условиях гипоксии в камерах сердца скорпены удалось избежать критического падения относительной величины данного показателя, очевидно, что при сниженном производстве макроэргов такая условная стабилизация, в частности, может достигаться путем торможения потребления или потребности в АТФ.

Упомянутое снижение потребления/потребности в АТФ при гипоксии у рыб может быть связано с замедлением работы сердца (брадикардией) [29], приспособительным механизмом, обеспечивающим оптимальное перфузионно-вентиляционное соотношение для жаберного аппарата. Причем сердце рыб обладает способностью значительно увеличивать ударный объем крови, что позволяет поддерживать сердечный выброс при гипоксической брадикардии [30].

Кроме внутриклеточной роли макроэргического соединения, АТФ принимает участие в межкле-

точной передаче сигналов, где выступает в качестве трансмиттера или котрансмиттера [31]. Закономерный вопрос о возможном привлечении части аденилатов в механизмы регуляции функциональной активности миокарда при гипоксии требует дальнейшего изучения. В настоящее время известно, что анионные каналы могут позволить АТФ проходить через мембрану кардиомиоцитов; в частности, показано, что митохондриальные потенциал-зависимые анионные каналы [32] и хлоридные каналы 116-pS сердечного саркоплазматического ретикулума [33] способны проводить как АТФ, так и адениновые нуклеотиды. Существуют доказательства прямого действия АТФ на сократимость миокарда [34]. На поверхности кардиомиоцитов АТФ под действием эктонуклеотидаз быстро распадается до АДФ, АМФ и аденозина [31]. В свою очередь, АМФ и аденозин способны активировать пуриnergические P1-рецепторы, что сопровождается уменьшением частоты и силы сокращения миокарда. Аденозин, связываясь с P1-рецепторами клеток синусно-предсердного узла, подавляет его автоматию и вызывает отрицательный хронотропный эффект [35], проявляющийся урежением сердечного ритма.

Полученные результаты свидетельствуют, что реакция камер сердца скорпены на острую гипоксию, исходно имевших статистически незначительные различия в своем метаболизме, по-видимому, детерминирована широким спектром “стартовых” характеристик этих структур, включающих архитектуру миокарда, особенность его кровоснабжения, степень функциональной нагрузки, аэробную и анаэробную емкости, которые определяют манифестацию двух метаболических стратегий при снижении PwO_2 . Так, на недостаток кислорода предсердие реагирует резким уменьшением O_2 -зависимого производства макроэргов, в то время как желудочек активизирует гликолиз, позволяющий сохранить соответствующий моменту уровень рабочего потенциала данной камеры. Вероятно, подобные изменения энергетического метаболизма разворачиваются на фоне перехода к брадикардии и устранения необходимости активного расходования производимой/ресинтезируемой АТФ, что позволяет удержать энергетический статус (АЭЗ) миокарда в определенном диапазоне. Кроме того, очевидно, что в условиях снижения PO_2 сердце скорпены успешно разрешает основную парадигму современных сердечно-сосудистых заболеваний, безусловно включающих элемент гипоксических состояний как результат дефицита подаваемого и необходимого клеткам O_2 [11]. В частности, исходя из гомологичности сердца рыб и человека паттерны “поведения” оксидоредуктаз и аденилатной системы “венозного”/аваскулированного сердца скорпены при кислородном голодании могут представлять определенный интерес

при разработке терапии окклюзии коронарных артерий у людей с сопутствующей заболеванию ишемией, что может сочетаться с необходимостью обеспечения трансмиокардиального кровотока из полости левого желудочка подобно лакунарному кровоснабжению миокарда “венозного” сердца рыб.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках госзадания № 0556-2021-0003 “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” и при поддержке проекта РФФИ № 20-44-920001.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.Э. Колесникова – постановка задач, препарирование камер сердца, написание текста статьи и его редактирование. А.А. Солдатов – идея работы, постановка задач, планирование эксперимента, написание текста статьи и его редактирование. И.В. Головина – определение активности ферментов и статистическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи и его редактирование. И.В. Сысоева и А.А. Сысоев – определение содержания адениловых нуклеотидов и статистическая обработка данных. Т.А. Кухарева – участие в проведении эксперимента.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Driedzic WR* (1992) Cardiac energy metabolism. *Fish Physiology* 12:219–266. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60335-0](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60335-0)
2. *Hochachka PW, Somero GN* (2002) *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford: Oxford University Press. 356 p.
3. *Волосовец АП* (2012) Оптимизация фармакотерапии астении в практике современной педиатрии. *Практика педиатра* 2: 23–28. [*Volosovets AP* (2012) Optimization of astenia pharmacotherapy in the practice of modern pediatricians. *The pediatrician practice*. 2: 23–28 (in Russ.)]
4. *Soldatov AA, Golovina IV, Kolesnikova EE, Sysoeva IV, Sysoev AA, Kukhareva TA, Kladchenko ES* (2020) Activity of Energy Metabolism Enzymes and ATP Content in the Brain and Gills of the Black Sea Scorpionfish *Scorpaena porcus* under Short-Term Hypoxia. *J Evol Biochem Physiol* 56(3):224–234. <https://doi.org/10.31857/S0044452920010143>
5. *Kolesnikova EE, Golovina IV* (2020) Oxidoreductase Activities in Oxyphilic Tissues of the Black Sea Ruff *Scorpaena porcus* under Short-term Hydrogen Sulfide Loading. *J Evol Biochem Physiol* 56(5):459–470. <https://doi.org/10.1134/S0022093020050099>
6. *Yamauchi A* (1980) *Fine Structure of Fish Heart. The Hearts and Heart-like Organs/ eds. G.H. Bourne*. New York: Academic Press. 119–148.
7. *Grimes AC, Kirby ML* (2009) The outflow tract of the heart in fishes: anatomy, genes and evolution. *Fish Biol* 74(5): 983–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02125.x>
8. *Garofalo F, Imbrogno S, Tota B, Amelio D* (2012) Morpho-functional characterization of the goldfish (*Carassius auratus* L.) heart. *Comp Biochem Physiol* 163(2): 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.05.206>
9. *Holm-Hansen O, Booth CR* (1966) The measurement of adenosine triphosphate in the Ocean and its ecological significance. *Limnol Oceanogr* 11(4):510–519. <https://doi.org/10.4319/lo.1966.11.4.0510>
10. *Atkinson DE* (1968) The energy charge of the adenylate pools as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7(11):4030–4034. <https://doi.org/10.1021/bi00851a033>
11. *Ostadal B* (2014) Hypoxia and the heart of poikilotherms. *Curr Res Cardiol* 1(1): 28–32.
12. *Farrell AP, Jones DR* (1992) *The heart. Fish Physiology. XIIA/ eds. W.S. Hoar, D.J. Randall, A.P. Farrell*. Academic Press: San Diego. 1–73.
13. *Tota B, Cerra MC, Gattuso A* (2010) Catecholamines, cardiac natriuretic peptides and chromogranin A: evolution and physiopathology of a “whip-brake” system of the endocrine heart. *J Exp Biol* 213: 3081–3103. <https://doi.org/10.1242/jeb.027391>
14. *Tota B, Cimini V, Salvatore G, Zummo G* (1983) Comparative study of the arterial and lacunary systems of the ventricular myocardium of elasmobranchs and teleost fishes. *Am J Anat* 167(1):15–32. <https://doi.org/10.1002/aja.1001670103>
15. *Childress JJ, Somero GN* (1979) Depth-Related Enzymic Activities in Muscle, Brain and Heart of Deep-Living Pelagic Marine Teleosts. *Mar Biol* 52:273–283.
16. *Eddy FB* (1974) Blood gases of the tench (*Tinca tinca*) in well aerated and oxygen-deficient waters. *J Exp Biol* 60:71–83.
17. *Tessadori F, van Weerd JH, Burkhard SB, Verkerk AO, de Pater E, Boukens BJ, Vink A, Christoffels VM, Bakkens J* (2012) Identification and functional characterization of cardiac pacemaker cells in zebrafish. *PLoS One* 7(10): e47644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047644>
18. *Almeida-Val VMF, Hochachka PW* (1995) Air-breathing fishes: metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. *Biochemistry and Molecular Biology of*

- Fishes 5:45–55.
[https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(06\)80029-9](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(06)80029-9)
19. Ewart HS, Driedzic WR (1987) Enzymes of energy metabolism in salmonid hearts: spongy versus cortical myocardia. *Can J Zool* 65(3):623–627.
<https://doi.org/10.1139/z87-097>
 20. Filho DW (2007) Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Fish Mitochondria. *Front Biosci* 12:1229–37.
<https://doi.org/10.2741/2141>
 21. Bailey JR, Sephton DH, Driedzic WR (1990) Oxygen uptake by isolated perfused fish hearts with differing myoglobin concentrations under hypoxic conditions. *J Mol Cell Cardiol* 22(10):1125–34.
[https://doi.org/10.1016/0022-2828\(90\)90076-e](https://doi.org/10.1016/0022-2828(90)90076-e)
 22. Bailey JR, Driedzic WR (1988) Perfusion-independent oxygen extraction in myoglobin-rich hearts. *J Exp Biol* 135(1):301–315.
 23. Лызлова СН, Пантелеева НС, Южакова ГА (1967) Биохимическая топография адениновых нуклеотидов в сердце. Украинский биохим журн 39(2):156–161. [Lyzlova SN, Panteleeva NS, Yuzhakova GA (1967) Biochemical topography of adenine nucleotides in the heart. *Ukrainian Biochem J* 39(2):156–161 (in Russ)].
 24. Лав РМ (1976) Химическая биология рыб. М: Пищевая промышленность. 349с. [Love RM (1976) *Chemical Biology of Fish*. М: Food industry. 349с. (in Russ.)]
 25. Christensen M, Hartmund T, Gesser H (1994) Creatine kinase, energy-rich phosphates and energy metabolism in heart muscle of different vertebrates. *J Comp Physiol* 164:118–23.
<https://doi.org/10.1007/bf00301652>
 26. Kumar A, Gopesh A (2015) Effect of Hypoxia and Energy Conservation Strategies in the Air-Breathing Indian Catfish, *Clarias batrachus*. *Natl Acad Sci Lett* 38(2):135–137.
<https://doi.org/10.1007/s40009-014-0332-6>
 27. Chippari-Gomes AR, Gomes LC, Lopes NP, Val AL, Almeida-Val VMF (2005) Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comp Biochem Physiol* 141:347–355.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.04.006>
 28. Hochachka PW, Somero GN (1984) *Biochemical Adaptation*. New Jersey: Princeton Univ. Press, 560 P.
 29. Sollid J, Nilsson GE (2006) Plasticity of respiratory structures—adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. *Resp Physiol Neurobiol* 154:241–251.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2006.02.006>
 30. Farrell AP (2007) Tribute to P.L. Lutz: A Message From the Heart - Why Hypoxic Bradycardia in Fishes? *J Exp Biol* 210(Pt 10):1715–25.
<https://doi.org/10.1242/jeb.0278>
 31. Зверев АА, Аникина ТА, Исаков НГ, Леонов НВ, Зефиоров ТЛ (2018) АТФ ингибирует спонтанную сократимость предсердий крыс Ученые записки Казанского университета 160(4):558–567 [Zverev AA, Anikina TA, Isakov NG, Leonov NV, Zefirov TL (2018) ATF inhibits spontaneous atrial contraction in rats. *Scientific notes of Kazan University*. 160(4):558–567 (in Russ.)]
 32. Rostovtseva TK, Bezrukov SM (1998) ATP transport through a single mitochondrial channel, VDAC, studied by current fluctuation analysis. *Biophys J* 74:2365–2373.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77945-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77945-7)
 33. Kawano S, Kuruma A, Hirayama Y, Hiraoka M (1999) Anion permeability and conduction of adenine nucleotides through a chloride channel in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 274:2085–2092.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.2085>
 34. Anikina TA, Bilalova GA, Zverev AA, Sitdikov FG (2007) Effect of ATP and its analogs on contractility of rat myocardium during ontogeny. *Bull Exp Biol Med* 144(1):4–7.
<https://doi.org/10.1007/s10517-007-0239-z>
 35. Gessi S, Merighi S, Varani K, Borea PA (2011) Adenosine receptors in health and disease. *Adv Pharmacol* 61:41–75.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00002-3>

ACTIVITY OF ENERGY METABOLISM ENZYMES AND THE ADENYLATE SYSTEM IN HEART CHAMBERS OF A BLACK SEA (*SCORPAENA PORCUS* L.) UNDER ACUTE HYPOXIA

E. E. Kolesnikova^{a, #}, A. A. Soldatov^a, I. V. Golovina^a, I. V. Sysoeva^a,
 A. A. Sysoev^a, and T. A. Kukhareva^a

^a A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia

[#] e-mail: dr-kolesnikova@mail.ru

The fish heart is a unique model to compare the resistance to hypoxia of its two chambers (atrium and ventricle), which are different in the structure and functional loading. The activity of oxydoreductases malate dehydrogenase (MDH, 1.1.1.37) and lactate dehydrogenase (LDH, 1.1.1.27), as well as the parameters of the adenylate system in the heart chambers of a Black Sea scorpaena, were studied under acute hypoxia (0.9–1.2 mg O₂ L⁻¹, 90 min). Despite the leading functional role of the ventricle, MDH activity in this heart compartment tended to decrease compared to the atrium in the absence of differences in LDH activity. At the same time, the difference in the level of adenylates (ATP, ADP, AMP), total adenylate pool (AP), and adenylate energy charge (AEC) between the atrium and ventricle was statistically nonsignificant, although the absolute value of the ventricular AP was almost twice as large as the atrial AP. The AEC values of the atrium and ventricle perfused only with venous blood did not exceed ~0.7 (vs. the maximum of this parameter ~0.9–1.0), apparently reflecting the energy status of tissues initially adapted to hypoxia. Under acute hypoxia, there were found two strategies for energy metabo-

lism transformation in the heart chambers in the form of a 2.4-fold drop in MDH activity ($p < 0.05$) in the atrium and a 2.2-fold increment in LDH activity ($p < 0.05$) in the ventricle. Probably, the decline in MDH activity in the atrial tissue was determined by a more passive function of this heart chamber in providing the blood flow. The exposure to acute hypoxia led to a decrease in the level of adenylate nucleotides and an AEC decline in the heart chambers, as pronounced most distinctly in the ventricular myocardium. When decreasing PO_2 , the AEC in the heart chambers shifted within quite a narrow range (from 0.7 to 0.6), indicating the retention of a certain stationary energy status achieved by inhibition of ATP consumption or demand. The putative mechanism for retaining the AEC may be based on the negative chronotropic effect of hypoxia.

Keywords: fish, hypoxia, heart chambers, malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, adenylate system