

АКТИВНОСТЬ Na^+ , K^+ -АТФазы И БАЛАНС ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ В ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТАХ МОРСКИХ РЫБ В УСЛОВИЯХ ГИПООСМОТИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ (ЭКСПЕРИМЕНТЫ *IN VIVO*)

Солдатов А. А.

ФИЦ «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН»

просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

Поступила в редакцию: 30.07.2019

Аннотация. В условиях эксперимента *in vivo* исследовано влияние гипоосмотической нагрузки на кровь двух видов морских рыб, отличающихся толерантностью к фактору солености. Объектами исследования служили черноморские бычки: *Gobius cobitis* (Pallas, 1814) – обнаруживается в прибрежных акваториях, лагунах устьях рек и *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) – встречается в морских и пресных водоемах. Контрольные группы рыб содержали при 12-14 ‰. Опытные группы рыб находились в течение 44-45 суток при 4,8-5,6 ‰. Температура воды поддерживалась на уровне $15 \pm 1^\circ\text{C}$. Отбор проб крови осуществлялся на 1-5, 14-16 и 44-45 сутки эксперимента. Оценивали содержание воды в крови, эритроцитарные индексы, активность Na^+ , K^+ -АТФазы и баланс Na^+ и K^+ на мембране эритроцита. В условиях гипоосмотической нагрузки *G. cobitis* не проявлял признаков активной осморегуляции. Содержание воды в крови в ходе эксперимента повышалось на 9,5-14,2 % ($p < 0,001$) и сохранялось на данном уровне в течение всего периода наблюдений. Это происходило на фоне свеллинга и лизиса части эритроцитарной массы. Одновременно происходила диссипация ионных градиентов на уровне клеток красной крови и снижение активности Na^+ , K^+ -АТФазы. *N. melanostomus*, напротив, компенсировал начальное (1-5 сутки) повышение содержания воды в крови. У него не наблюдали признаков свеллинга и лизиса клеток красной крови. При этом эритроциты проявляли признаки активной осморегуляции. При гидратации плазмы крови у них отмечался направленный выход K^+ при сохранении содержания Na^+ в клетке. В сравнении с *G. cobitis* препараты эритроцитарных мембран *N. melanostomus* отличались повышенной активностью Na^+ , K^+ -АТФазы. Эти качества, по-видимому, позволяют данному виду переносить достаточно широкий диапазон колебания солености среды и лежат в основе его эвригалинности.

Ключевые слова: морские рыбы, гипоосмотическая нагрузка, кровь, эритроциты, баланс Na^+ и K^+ , активность Na^+ , K^+ -АТФазы.

ВВЕДЕНИЕ

Выделительная система костистых рыб представлена туловищными почками (мезонефрос), содержащих основную массу нефронов, и мочеточниками. Вместе с рядом других органов (жабры, кожа и кишечник) они обеспечивают коррекцию параметров водно-солевого обмена жидких сред организма рыб [1, 2]. В структуре почек рыб выделяют также головную почку (пронефрос). Она не участвует в поддержании осмотических характеристик крови и выполняет преимущественно гемопоэтическую функцию [3]. Выделительная система пресноводных видов направлена на удаление из организма избытка воды, а у морских рыб избытка солей [1].

Стеногалинные морские костистые рыбы являются узкоспециализированной группой организмов, адаптированной к постоянному существованию в гиперосмотических условиях среды. Они относятся к типичным осморегуляторам и имеют эффективные системы гуморального контроля водно-солевого баланса [4-6]. В сравнении с эвригалинными видами эта группа рыб выводит из организма в повышенном количестве Na^+ [7], а их клеточные системы отличаются пониженной устойчивостью к осмотическому шоку и имеют менее активную Na^+ , K^+ -АТФазу [8]. Адаптация стеногалинных морских рыб к гипоосмотической среде сопровождается гидратацией их тканей и внутренних сред, лизисом части циркулирующих эритроцитов [8], снижением содержания энергетических субстратов в тканях (глюкозы, триацилглицеридов, неэстерифицированных жирных кислот) повышением тканевого уровня лактата и т.д. [9, 10]. Последнее позволяет констатировать усиление анаэробных процессов.

У эвригалинных видов процессы осморегуляции могут быть направлены как на удержание воды, так и удаление ее избытка в зависимости от условий водной среды обитания [1]. При этом непонятна степень участия в этом системных механизмов коррекции осмолярности внутренних сред и процессов, реализуемых на уровне клеточных систем.

В настоящей работе в условиях эксперимента сравнивается реакция на гипоосмотическую нагрузку двух видов донных рыб, обитающих в градиентных условиях соленостей морской среды. *Gobius cobitis* (Pallas, 1814) – обнаруживается в прибрежных акваториях, лагунах устьях рек [11]. *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) – встречается в морских и пресных водоемах. В обоих случаях образует устойчивые во времени скопления [11].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили черноморские бычки: *Gobius cobitis* Pallas, 1814 (далее *G.c.*) и *Neogobius melanostomus* Pallas, 1814 (далее *N.m.*), особенности биологии которых рассмотрены выше.

Контрольные группы рыб содержали при солености 12-14‰. Опытные группы рыб находились в течение 44-45 суток при 4,8-5,6‰ (37-40% от исходной). Соленость воды в аквариуме понижали в течение 36 часов путем периодического приливания дистиллированной воды. Температура составляла $15 \pm 1^\circ\text{C}$ в аквариумах контрольной и опытной групп рыб. Оценка состояния особей, отбор проб крови осуществлялся на 1-5, 14-16 и 44-45 сутки эксперимента.

За 40 минут до отбора проб крови рыб наркотизировали. В качестве анестезирующего препарата применяли уретан. Его растворяли в воде аквариума, где находились особи. Величины эффективных доз препарата определяли с учетом температуры, солености, концентрации кислорода в воде [12].

Пробы крови получали пункцией хвостовой вены (*vena caudalis*) в шприц. В качестве антикоагулянта применяли гепарин ("Richter", Венгрия). Концентрацию гемоглобина в крови определяли при помощи гемиглобинцианидного метода, используя стандартный набор реактивов (НПО "Биолар"). Количество эритроцитов в крови подсчитывали в камере Горяева [13]. Гематокрит определяли путем центрифугирования образцов крови в гепаринизированных капиллярах (750 г; 30 минут). Центрифугирование проводили в специальном гематокритном роторе (центрифуга MPW-310, Польша). На основании полученных значений рассчитывали среднеклеточный объем (*MCV*), и среднеклеточную концентрацию гемоглобина (*MCHC*) [13].

Расчеты выполняли по следующим формулам:

$$MCHC = \frac{Hb}{Ht} \cdot 10; MCV = \frac{Ht}{Er} \cdot 10,$$

где *Hb* – концентрация гемоглобина (г л^{-1}); *Er* – число эритроидных элементов (шт. мкл^{-1}); *Ht* – гематокрит (%).

Осмотическую резистентность эритроцитов оценивали при помощи микроскопического метода Яновского в концентрационном диапазоне 0.10-0.85 % NaCl [13]. Содержание воды в крови оценивали путем взвешивания на аналитических весах WP-11 (Польша) свежей и высушенной до постоянного веса при 105°C капли крови.

Плазму отделяли от форменных элементов посредством центрифугирования (750 г, 30 минут). В ней определяли концентрации Na^+ , K^+ . Эритроциты трижды отмывали от плазмы в изотонических растворах LiCl. Полученную эритроцитарную массу лизировали двумя объемами охлажденного бидистиллята. Эритроцитарную строму осаждали при 9000 г в течение 30 минут. Гемолизат использовали для последующей очистки, а также при определении внутриэритроцитарных концентраций Na^+ , K^+ . Хроматографическую очистку гемолизатов проводили на колонках с сефадексом G-75 [14]. Концентрирование образцов выполняли на мембранах фирмы "Amicon" (США) до уровня, совпадающего с таковым в цельной крови. Фрагменты эритроцитарных мембран трижды отмывали от гемоглобина в среде следующего состава: 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM гистидина (pH 7,4), и использовали при определении активности Na^+ , K^+ -АТФазы. Все операции проводили при 4°C .

Концентрации Na^+ и K^+ в плазме крови и гемолизатах определяли на пламенном фотометре ПАЖ-3 в смеси пропан-воздух [15]. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы определяли в инкубационной среде следующего состава: 3 mM Na_2ATP , 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM гистидина (pH 7,4), 5 мкг белка клеточных мембран. Общий объем – 2 мл. Реакцию начинали, добавляя Na_2ATP , и прекращали через 15 минут, добавляя трихлоруксусную кислоту в конечной концентрации 5%. В качестве ингибитора Na^+ , K^+ -АТФазы применяли оуабайн. Освобожденный неорганический фосфат (P_i) в пробе определяли по методу Фиске, Суббароу [15]. Активность выражали в микромолях $\text{P}_i \text{ ч}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ белка. Белок в пробе контролировали по методу Бредфорда [16].

Статистическая обработка и графическое оформление полученной информации проводилась при помощи стандартного пакета «Grapher-7». Результаты в таблицах и на рисунках представлены как $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$. Сравнение выборочных совокупностей проводили на основе t-критерия Стьюдента. О нормальности распределения цифровых массивов судили по критерию Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперимент с G.c. Реакция клеточных систем на изменение солености была изучена на примере циркулирующих эритроцитов. Содержание воды в крови в ходе эксперимента повышалось на 9,5-14,2 % ($p < 0,001$) и сохранялось на данном уровне в течение всего периода наблюдений (табл. 1). Одновременно увеличивался среднеклеточный объем (*MCV*) на 10,6-18,1% ($p < 0,05-0,001$) и снижалась концентрация гемоглобина в эритроцитах (*MCHC*) на 5,3-12,8% ($p < 0,05-0,01$). Гематокрит, при этом, оставался на уровне контрольных значений.

Таблица 1. Содержание воды в крови и объемные характеристики циркулирующей эритроцитарной массы у *G.c.* в условиях экспериментальной гипосмии

Условия эксперимента	n	Вода %	Ht %	MCV мкм ³	MCHC %	Hb _p г л ⁻¹
15,0-17,0 ‰ 6,0-6,8 ‰	8	79,7±0,9	20,5±0,4	215,2±7,1	22,7±0,7	-
1-5 суток	6	87,3±1,4	18,3±0,8	254,2±5,2	19,9±0,6	2,27±0,31
14-16 суток	8	91,0±0,9	19,3±1,0	238,0±6,5	21,5±0,7	0,64±0,28
40-45 суток	7	89,0±0,9	21,9±1,0	243,9±8,7	19,8±0,9	0,24±0,17

Примечание: n – число особей; Ht – гематокрит; MCV – средний объем эритроцита; MCHC – среднечелочная концентрация гемоглобина; Hb_p – свободный гемоглобин плазмы крови

В начальный период эксперимента (1-5 сутки) отмечали усиление внутрисосудистого лизиса. Содержание свободного гемоглобина в плазме крови достигало $2,23 \pm 0,31$ г л⁻¹. К концу опыта (40-45 сутки) оно понижалось в 9,5 раз ($p < 0,001$) и составило $0,24 \pm 0,17$ г л⁻¹. Данные изменения происходили на фоне увеличения стойкости циркулирующей эритроцитарной массы к гипотоническому шоку. В сравнении с контрольной группой рыб значения минимальной и максимальной резистентности клеток красной крови понижались соответственно на 14,5 и 19,4% ($p < 0,05$) (табл. 2).

При 6,0-6,8 ‰ отмечали устойчивое снижение активности Na⁺, K⁺-АТФазы эритроцитарных мембран (табл. 2). Различия составили 15,2-21,7% ($p < 0,05-0,01$). Клетки красной крови были не способны удерживать исходный градиент концентраций по Na⁺ и K⁺ между плазмой крови и внутриэритроцитарной средой. Концентрация Na⁺ в эритроцитах увеличивалась на 19,4-30,2 % ($p < 0,05-0,001$), а K⁺ уменьшалась на 9,0-10,8 % ($p < 0,05-0,01$). Каких-либо компенсационных реакций, направленных на восстановление активности Na⁺, K⁺-АТФазы и баланса Na⁺ и K⁺ на плазматической мембране клеток красной крови в ходе эксперимента не отмечали.

Эксперимент с N.m. Уровень воды в крови *N.m.* в начале эксперимента повышался на 8,8 % ($p < 0,001$). Однако в течение 45 суток эта величина возвращалась практически к исходным значениям ($p > 0,05$) (табл. 3). Изменение содержания воды в крови на протяжении эксперимента не оказывало заметного влияния на объемные характеристики циркулирующей эритроцитарной массы. Гематокрит, MCV и MCHC в течение опыта не претерпевали статистически значимых изменений.

Эритроциты мартовика, в сравнении с кругляшом отличались повышенной устойчивостью к гипотоническому шоку. Лизис клеток красной крови у него начинался (*min*) и заканчивался (*max*) при более низких концентрациях хлористого натрия (табл. 1 и 3). Признаков внутрисосудистого гемолиза у данного вида не наблюдали.

Препараты эритроцитарных мембран мартовика отличались также более высокой АТФазной активностью. В сравнении с кругляшом различие в активности фермента составило 18,8 % ($p < 0,001$) (табл. 2 и 4). Активность Na⁺, K⁺-АТФазы у мартовика при 6,0-6,8‰ в сравнении с контролем не изменялась. Увеличение содержания воды в начале эксперимента (1-5 суток) вызывало понижение концентрации Na⁺ в плазме на 21,6 % ($p < 0,001$) и изменение ионного состава эритроцитов: концентрация K⁺ понижалась на 18,2 % ($p < 0,001$), а концентрация Na⁺ оставалась на уровне контрольных величин. К концу эксперимента (40-45 суток) эти величины практически возвращались к исходным значениям ($p > 0,05$).

Таблица 2. Баланс одновалентных катионов, АТФ-азная активность эритроцитарных мембран и осмотическая резистентность клеток красной крови у *G.c.* в условиях экспериментальной гипосмии

Условия эксперимента	n	АТФ-аза мкМ Р _i ч ⁻¹ мг ⁻¹	Na ⁺ mM		K ⁺ mM		Осмотическая резистентность % NaCl			
			с	р	с	р	n	min	max	lim
15,0-17,0 ‰ 6,0-6,8 ‰	8	13,8±0,6	23,2±0,9	168,7±2,3	117,3±2,3	2,83±0,05	5	0,62±0,03	0,36±0,02	0,26±0,02
1-5 суток	6	11,7±0,6	28,4±1,5	141,0±3,4	105,3±3,0	2,71±0,07	5	0,61±0,02	0,38±0,01	0,23±0,01
14-16 суток	8	10,8±0,7	30,2±1,2	135,3±3,2	104,6±2,3	2,85±0,04	5	0,54±0,02	0,31±0,02	0,23±0,01
40-45 суток	7	11,2±0,7	27,7±1,3	134,7±1,8	106,8±2,9	2,73±0,04	5	0,53±0,02	0,29±0,02	0,24±0,01

Примечание: n – число особей; с – эритроцит; р – плазма; lim – амплитуда резистентности эритроцитов

Таблица 3. Влияние экспериментальной гипоосмии на содержание воды в крови и объемные характеристики циркулирующей эритроцитарной массы у *N.m.*

Условия эксперимента	n	Вода %	Ht %	MCV мкм ³	MCHC %
15,0-17,0 ‰ 6,0-6,8 ‰	10	81,1±0,8	26,5±1,0	242,0±10,8	21,1±0,8
1-5 суток	6	88,2±1,4	26,9±1,2	255,1±13,7	20,2±0,8
14-16 суток	7	84,3±1,5	26,6±1,0	252,6±7,6	20,5±0,8
40-45 суток	8	83,7±1,2	28,8±0,8	250,4±12,4	19,9±0,9

Примечание: n – число особей; Ht – гематокрит; MCV – средний объем эритроцита; MCHC – средноклеточная концентрация гемоглобина;

Таблица 4. Баланс одновалентных катионов, активность Na⁺, K⁺-АТФазы эритроцитарных мембран и осмотическая резистентность клеток красной крови у *N.m.* в условиях экспериментальной гипоосмии

Условия эксперимента	n	АТФ-аза мкМ P _i ч ⁻¹ мг ⁻¹	Na ⁺ mM		K ⁺ mM		Осмотическая резистентность % NaCl			
			с	р	с	р	n	min	max	lim
15,0-17,0 ‰ 6,0-6,8 ‰	10	16,4±0,4	21,4±1,0	153,2±2,4	120,3±2,9	2,78±0,08	5	0,38±0,02	0,22±0,01	0,16±0,02
1-5 суток	7	15,6±0,4	19,6±0,9	120,4±2,4	98,4±2,9	3,01±0,10	5	0,39±0,02	0,21±0,02	0,18±0,01
14-16 суток	6	17,0±0,7	19,2±1,1	133,4±3,0	110,7±2,4	2,84±0,05	5	0,40±0,02	0,22±0,01	0,18±0,01
40-45 суток	8	16,2±0,5	20,4±0,8	145,0±2,1	116,8±2,0	2,75±0,06	5	0,39±0,02	0,20±0,02	0,19±0,01

Примечание: n – число особей; с – эритроцит; р – плазма; lim – амплитуда резистентности эритроцитов

ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент с G.c. Как показали результаты экспериментов, *G.c.* в условиях низкой солености (40% от исходной) не проявлял признаков активной осморегуляции. Содержание воды в его крови повышалось, а концентрация Na⁺ падала. Известно, что животные допускающие значительные изменения осмолярности внутренней среды (осмоконформеры) обычно обладают эффективными механизмами клеточной осморегуляции [17, 18]. Они позволяют им существовать в достаточно широком диапазоне соленостей. Поэтому многие типичные осмоконформеры являются эвригалинными видами [17].

Из результатов собственных исследований следует, что осморегуляторные способности клеточных систем кругляша были ограничены. Об этом свидетельствовал ряд фактов:

- низкая стойкость эритроцитов к осмотическому шоку;
- значительный лизис циркулирующей эритроцитарной массы в начальный период адаптации к низкой солености (1-5 сутки);
- высокие значения средноклеточного объема эритроцитов на протяжении опыта;
- низкая активность Na⁺, K⁺-АТФазы эритроцитарных мембран;
- снижение ионных градиентов в течение эксперимента: увеличение внутриклеточной концентрации Na⁺ и уменьшение концентрации K⁺ (на примере циркулирующих эритроцитов и клеток красных и белых мышц).

В организме *G.c.* был зарегистрирован ряд изменений компенсационной направленности. Изначально низкая стойкость его эритроцитов к осмотическому шоку приводила к лизису части циркулирующей эритроцитарной массы (1-5 сутки). Однако к концу эксперимента (40-45 сутки) число эритроцитов в крови полностью восстанавливалось, а их осмотическая стойкость повышалась. Данная реакция, по-видимому, развивалась при участии кроветворной ткани и была связана с продукцией осмотически стойких эритроцитов. Вместе с тем, это никак не сказывалось на процессах осморегуляции клеток. Средноклеточный объем оставался выше контрольных значений, а внутриклеточные концентрации Na⁺, K⁺ и активность Na⁺, K⁺-АТФазы эритроцитарных мембран совпадали с таковыми, отмеченными в начале эксперимента (1-5 сутки).

Таким образом, организм *G.c.* не способен к активной осморегуляции на клеточном и организменном уровнях. В этом следует усматривать основную причину его неспособности колонизировать пресноводные акватории.

Эксперимент с N.m. В отличие от *G.c.*, в организме *N.m.* в условиях низкой солености протекали активные процессы осморегуляции, направленные на поддержание исходного уровня гидратации крови.

Осморегуляторные процессы на уровне периферической крови были достаточно эффективны. Содержание воды в плазме повышалось, а концентрация Na^+ падала только в начале эксперимента (1-5 сутки) и в дальнейшем практически полностью компенсировались. При этом увеличения объема циркулирующих эритроцитов у *N.m.*, при этом, не наблюдали. Признаки внутрисосудистого лизиса клеток красной крови отсутствовали. Сравнительные исследования показали, что эритроциты *N.m.* отличались повышенной осмотической стойкостью. По-видимому, эта особенность позволяет предотвращать их лизис в момент набухания, что особенно важно в начальный период адаптации к гипоосмотической среде, когда осморегуляторные возможности организма не реализованы в полном объеме.

Известно несколько механизмов регуляции клеточного объема, которые используют морские рыбы при адаптации к гипер- или гипоосмотической среде. Один из них основан на изменении внутриклеточной концентрации Na^+ [19, 20], другой на основе изменения концентрации K^+ [21]. В ряде случаев, происходит коррекция внутриклеточной концентрации аминокислот [18]. Причины, определяющие выбор того или иного механизма клеточной осморегуляции, до конца не ясны.

Результаты настоящих исследований показали, что сохранение объема циркулирующих эритроцитов в гипотоничной среде у *N.m.* сопровождалось понижением концентрации K^+ в клетке. Уровень Na^+ оставался без изменений. Выбор данной адаптационной стратегии, по-видимому, был обусловлен ее экономичностью. Выход K^+ из клетки происходил по градиенту концентрации и не был сопряжен со значительными энерготратами.

Осморегуляция на основе уменьшения концентрации Na^+ маловероятна по двум причинам. Во-первых, концентрация данного иона в клетке невелика, а, во-вторых, выведение его за пределы эритроцита должно происходить против концентрационного градиента, то есть сопровождаться распадом АТФ.

Механизм регуляции клеточного объема на основе изменения концентрации свободных аминокислот в клетке в данном случае также маловероятен. Следует принять во внимание тот факт, что интенсивность внутриклеточного метаболизма в зрелом эритроците крайне низкая [22, 23]. Поэтому ожидать значительной активизации биосинтетических процессов, которые привели бы к снижению концентрации аминокислот в клетке не приходится. Выход аминокислот из клеток в начальный момент растяжения цитоплазматической мембраны не подкреплялся конкретными экспериментальными данными. Изменения средноклеточного объема в 1-5 сутки действия гипоосмотического шока не наблюдали.

Следует обратить внимание на исходно более высокую активность Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитарных мембран *N.m.* В условиях нормальной солености (15-17‰) различия составляли 18,8% ($p < 0,01$). Данный фермент определяет активный трансмембранный перенос Na^+ и K^+ . В условиях гипоосмотической регуляции клеточного объема, когда перенос K^+ через мембрану осуществляется по градиенту концентраций, это не должно иметь особого значения. Однако при возвращении в гиперосмотические условия среды транспорт K^+ в клетки будет происходить против концентрационного градиента и высокая активность Na^+ , K^+ -АТФазы сыграет свою роль.

Таким образом, эффективные механизмы осморегуляции на клеточном и системном уровнях позволяют организму *N.m.* активно регулировать объемные характеристики клеток и степень гидратации тканей. Это позволяет данному виду переносить достаточно широкий диапазон колебания солености среды и лежит в основе его эвригалинности.

Работа выполнена в рамках госзадания (№ гос. регистрации АААА-А18-118021490093-4)

Список литературы / References:

1. Evans D.H. A Brief History of the Study of Fish Osmoregulation: The Central Role of the Mt. Desert Island Biological Laboratory. *Frontiers of Physiology*, 2010, vol. 1, pp. 13-32.
2. Maetz J. Fish Gills: Mechanisms of Salt Transfer in Fresh Water and Sea Water. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 1971, vol. 262, no. 842, pp. 209-249.
3. Soldatov A.A. Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system (review). *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 2005, vol. 41, no 3, pp. 272-281.
4. Eckert S.M., Yada T., Shepherd B.S., Stetson M.H., Hirano T., Grau E.G. Hormonal control of osmoregulation in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2001, vol. 122, pp. 270-286.
5. Perrott M.N. The renin-angiotensin system and osmoregulation in fish. *Diss. Abst. Int. Pt. B Sci. Eng.*, 1989, vol. 50, p. 280.
6. Wong K.Sh. Characterization of the renin-angiotensin system in silver seabream (*Sparus sarba*): Perspective in salinity adaptation. *Diss. Abstr. Int.*, 2006, vol. 67, p. 147.
7. Avella M., Berhaut J., Bornancin M. Salinity tolerance of two tropical fishes, *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. I. Biochemical and morphological changes in the gill epithelium. *J. Fish Biol.*, 1993, vol. 42, pp. 243-254.
8. Soldatov A.A. Peculiarities of osmoregulation of the circulating red blood cells in steno- and euryhaline marine fish species under hypoosmotic conditions. *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 2000, vol. 36, no 1, pp. 52-58.
9. Arjona F.J., Vargas-Chacoff L., Ruiz-Jarabo I., Goncalves O., Pascoa I., Martin del Rio M.P., Mancera J.M. Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) to osmotic challenge: Implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. *Aquaculture*, 2009, vol. 287, pp. 419-426.

10. Mylonas C.C., Pavlidis M., Papandroulakis N., Zaiss M.M., Tsafarakis D., Papadakis I.E., Varsamos S. Growth performance and osmoregulation in the shi drum (*Umbrina cirrosa*) adapted to different environmental salinities. *Aquaculture*, 2009, vol. 287, pp. 203-210.
11. Световидов А.Н. *Рыбы Черного моря*. М.: Наука, 1964, 552 с. [Svetovidov A.N. *Black Sea Fish*. М.: Nauka, 1964, 552 p. (In Russ.)]
12. Soldatov A.A. Physiological Aspects of Effects of Urethane Anesthesia on the Organism of Marine Fishes. *Hydrobiol. J.*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 113-126.
13. Стенко М.И. *Кровь. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования*. М.: Медицина, 1975, с. 5-135. [Stenko M.I. *Blood. Handbook of clinical laboratory methods*. М.: Medicine, 1975, pp. 5-135. (In Russ.)]
14. Стародуб Н.Ф. *Методы исследования структурной гетерогенности гемоглобинов млекопитающих. Методы молекулярной биологии*. Киев: Наук. думка, 1979, с. 176-191. [Starodub N.F. *Methods of investigation of structural heterogeneity of mammalian hemoglobins. Methods of molecular biology*. Kiev: Naukova Dumka, 1979, pp. 176-191. (In Russ.)]
15. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. *Биохимические исследования в клинике*. Л.: Медицина, 1976, 384 с. [Komarov F.I., Korovkin B.F., Menshikov V.V. *Biochemical studies in the clinic*. Leningrad: Medicine, 1976, 384 p. (In Russ.)]
16. Sedmak F.F., Grossberg S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G-250. *Anat. Biochem.*, 1977, vol. 79, pp. 544-552.
17. Наточин Ю.В. *Эволюция водно-солевого обмена и почки. Эволюционная физиология (руководство по физиологии). Ч. I*. Л.: Наука, 1983, с. 371-426. [Natochin Yu.V. *Evolution of water-salt metabolism and kidneys. Evolutionary physiology (guide to physiology). Part I*. Leningrad: Nauka, 1983, pp. 371-426. (In Russ.)]
18. Fugelli K., Zachariassen K.E. The distribution of tarine, gamma-amino-butyric acid and inorganic ions between plasma and erythrocytes in flounder (*Platichthys flesus*) at different plasma osmolarities. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1976, vol. 55A, pp. 173-177.
19. Наточин Ю.В., Шахматова Е.И., Лаврова Е.А., Максимович А.А., Карпенко Л.А., Мартемьянов В.И. Волюмрегуляция клеток некоторых органов и тканей у пресноводных и проходных рыб при изменении осмолярности и ионного состава сыворотки крови. *Ж. эволюц. биох. физиол.*, 1991, т. 27, № 2, с. 159-166. [Natochin Yu.V., Shakhmatova E.I., Lavrova E.A., Maksimovic A.A., Karpenko L.A., Martemyanov V.I. Volumerelative cells of some organs and tissues from freshwater and anadromous fish when you change the osmolarity and ionic composition of blood serum. *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 1991, vol. 27, no. 2, pp. 159-166. (In Russ.)]
20. Hebab S.A., Hanke W. Electrolyte changes and volume regulatory processes in the carp (*Cyprinus carpio*) during osmotic stresses. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1982, vol. 71A, no 2, pp. 157-164.
21. Лаврова Е.А., Наточин Ю.В., Шахматова Е.И. Электролиты в тканях осетровых и костистых рыб в пресной и морской воде. *Вопр. ихтиол.*, 1984, т. 24, № 5, с. 867-871. [Lavrov E.A., Natochin Y.V., Shakhmatova E.I. Electrolytes in the tissues of sturgeon and bony fish in fresh and sea water. *J. Ichthyology*, 1984, vol. 24, no. 5, pp. 867-871. (In Russ.)]
22. Bachand L., Leray C. Erythrocyte metabolism in the yellow perch. I. Glycolytic enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1975, vol. 50 B, pp. 567-570.
23. Leray C. Patterns of purine nucleotides in some North sea fish erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1982, vol. 71B, no 1, pp. 77-81.

THE ACTIVITY OF Na⁺, K⁺-ATPase AND THE BALANCE OF MONOVALENT CATIONS IN NUCLEAR ERYTHROCYTES OF MARINE FISH UNDER HYPOOSMOTIC LOAD (EXPERIMENTS *IN VIVO*)

Soldatov A. A.

FRC "A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas RAN»

Nakhimov Ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia, E-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Abstract. The effect of hypoosmotic load on the blood of two species of marine fish, characterized by tolerance to the salinity factor, was studied *in vivo* experiment. The objects of study were the Black Sea gobies: *Gobius cobitis* (Pallas, 1814) – found in coastal waters, lagoons, estuaries and *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) – found in marine and fresh water. The control group of fish was kept at 12-14‰. Experimental groups of fish were within 44-45 days at 4,8-5,6‰. The water temperature was maintained at 15 ± 1°C. Blood samples were taken at 1-5, 14-16 and 44-45 days of the experiment. Estimated water content in the blood, erythrocyte indices, the activity of Na⁺, K⁺-ATPase and the balance of Na⁺ and K⁺ on the membrane of the erythrocyte. Under hypoosmotic load *G. cobitis* showed no signs of active osmoregulation. The water content in the blood during the experiment increased by 9.5-14.2% ($p < 0.001$) and remained at this level throughout the observation period. This has resulted to swelling and lysis of the red blood cell mass. Simultaneously there was a dissipation of ionic gradients at the level of red blood cells and a decrease in the activity of Na⁺, K⁺-ATPase. *N. melanostomus*, on the contrary, compensated for the initial (1-5 days) increase in blood water content. It showed no signs of swelling or lysis of red blood cells. In this case, red blood cells showed signs of active osmoregulation. At hydration of blood plasma, they had a directed yield of K⁺ while maintaining the Na⁺ content in the cell. In comparison with *G. cobitis*, preparations of erythrocyte membranes *N. melanostomus* differed increased activity of Na⁺, K⁺-ATPase. These qualities apparently to allow were tolerate *N. melanostomus* to wide range of salinity fluctuations and are the basis of its euryhalinity.

Key words: marine fish, hypoosmotic load, blood, red blood cells, the balance of Na⁺ and K⁺, activity of Na⁺, K⁺-ATPase.