

## СОДЕРЖАНИЕ МЕТГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ КОСТИСТЫХ РЫБ: ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ СРЕДЫ И ЕСТЕСТВЕННЫХ ПРОЦЕССОВ В ОРГАНИЗМЕ (ОБЗОР)

© 2021 г. А. А. Солдатов\*

*Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского Российской академии наук, Севастополь, Россия*

\*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.02.2021 г.

После доработки 22.03.2021 г.

Принята к публикации 12.05.2021 г.

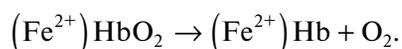
Обобщена информация о факторах, определяющих рост содержания метгемоглобина (MtHb) в крови костистых рыб. Показано, что переход гемоглобина в ферри-форму у рыб может быть обусловлен не только случаями токсической метгемоглобинемии. Значительный рост концентрации MtHb в крови у них наблюдается также в условиях внешней гипоксии и гипотермии. Это может быть обусловлено повышенным содержанием дезоксиформы пигмента (гипоксия) и снижением активности NADH-диафоразы (гипотермия). Также у рыб отмечено периодическое повышение содержания MtHb в крови на протяжении годового цикла. Такое состояние приурочено к преднерестовому и нерестовому периодам и связано с моноциклическостью функционирования кроветворной ткани. Активный эритропоэз у рыб происходит только в постнерестовый период в течение двух-трех месяцев. В остальное время в системе красной крови преобладают деструктивные процессы, которые отражаются на числе циркулирующих эритроцитов и уровне окислительных процессов в них. Гемоглобины рыб, в сравнении с таковыми млекопитающих, оказались менее стойкими к окислительной нагрузке, что, по-видимому, связано с нестабильностью и низкой эффективностью NADH-диафоразы в клетках красной крови данной группы организмов. При этом эритроциты рыб отличаются высоким содержанием глутатиона (GSH), особенно в пересчете на гемоглобин (индекс GSH/Hb), что обусловлено высокой эффективностью реакций пентозного шунта, позволяющей поддерживать высокий уровень NADPH в клетке. Данная особенность, вероятно, компенсирует низкую активность NADH-диафоразы. В случае нитритной интоксикации отмечено протекторное действие на гемоглобин со стороны  $\text{Cl}^-$  и адреналина. Оно в значительной степени понижало токсический эффект  $\text{NO}_2^-$ . Обсуждаются механизмы, ответственные за переход гемоглобина рыб в окисленное состояние.

*Ключевые слова:* метгемоглобин, NADH-диафораза, эритроциты, гипоксия, гипотермия, годовой цикл, морские рыбы

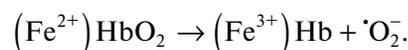
DOI: 10.31857/S0320965221060176

### ВВЕДЕНИЕ

Эритроциты находятся в среде с более высокой концентрацией кислорода, чем большинство клеток, и потенциально подвержены повреждающему действию окислителей. При этом гемоглобин может одновременно находиться в нескольких функциональных состояниях: оксиформа ( $\text{HbO}_2$ ), дезоксиформа (Hb), окисленная форма (MtHb). В норме комплекс его с кислородом ( $\text{HbO}_2$ ) диссоциирует с сохранением железа в геме в ферросостоянии ( $\text{Fe}^{2+}$ -Hb) (Schechter, 2008):

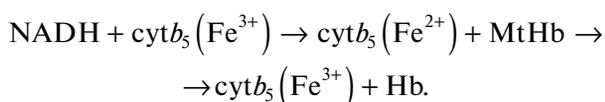


Однако в некоторых случаях деоксигенация сопровождается образованием супероксид аниона ( $\text{O}_2^-$ ) и переходом железа в геме в трехвалентное состояние ( $\text{Fe}^{3+}$ -Hb, мет-форма, MtHb) (Schechter, 2008):



Существует специфический ферментативный механизм восстановления метгемоглобина (MtHb). Ключевая роль в нем принадлежит NADH-диафоре (КФ 1.6.2.2), которая переносит электрон с NADH на цитохром  $b_5$ , а затем на MtHb (Percy, Lappin, 2008):

**Сокращения.** GSH – глутатион, MtHb – метгемоглобин; CAT – каталаза (КФ 1.11.1.6); SOD – супероксиддисмутаза.



В процессе восстановления MtHb принимают участие также GSH, аскорбиновая кислота, токоферол (Krishna, Venkataramana, 2007).

Ядерные эритроциты рыб имеют тот же антиоксидантный комплекс, что и безъядерные эритроциты высших позвоночных (Mather-Mihaich, Di-Giulio, 1991; Zikic et al., 1991). В них выявлена NADH-диафороза (Tucker, MacMillan, 1992; Schoore et al., 1995). Первые сведения о существовании данного фермента в эритроцитах рыб были получены в 1982 г. для кошачьего сомика (Huey, Beitingh, 1982). Несколько позже NADH-диафору обнаружили в эритроцитах угря и балтийской семги (Hardig, Hoglund, 1983; Kawatsu et al., 1987). Установлено, что в восстановлении MtHb у рыб может принимать участие также токоферол и аскорбиновая кислота (Wise, Tomasso, 1988; Sajiki, Takahashi, 1991). Однако действие их менее специфично, чем NADH-диафоразы. Показано, что активность некоторых ферментов (пероксидазы, КФ 1.11.1.1–1.11.1.10, супероксиддисмутазы, КФ 1.15.1.1) и концентрация восстановителей (GSH) превышает таковые у человека (Wdzieszak et al., 1982; Dafre, Reischl, 1997). Вместе с тем устойчивость респираторных пигментов рыб к окислению оказалась существенно ниже. В сравнении с млекопитающими переход гемоглобина в мет-форму и лизис эритроцитов у них происходит при более низких концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kawatsu et al., 1991; Alayash et al., 1993; Powell, Perry, 1997). Уровень MtHb в крови при этом может превышать 10% (Hardig, Hoglund, 1983; Sajiki, Takahashi, 1991). У человека в норме уровень данного соединения  $\leq 1\%$  (Schechter, 2008). Данный факт связывают с наличием у рыб нестабильных гемоглобинов (Blair et al., 2020). Особенно хорошо это заметно при изучении гетерогенных комплексов данного белка (Giles, 1991; Imsland et al., 1997; Soldatov et al., 2004). Исследования, проведенные на усаче (*Barbus holubi* Steindachner, 1894) и соме (*Clarius gariepinus* Burchell, 1822), показали существование различий в устойчивости к окислению отдельных компонентов гемоглобиновой системы у этих видов рыб (Hattingh, Du Toit, 1973). Так, у сома MtHb обнаружен в двух из шести фракций, причем, одна содержала его в большом количестве (~50%). У усача гемоглобин представлен тремя компонентами и во всех был обнаружен MtHb в количестве от 4.4 до 85.0%.

Особый интерес представляют случаи спонтанного роста уровня MtHb в крови рыб без видимых признаков токсической метгемоглобинемии. К ним можно отнести периодическое повышение уровня MtHb в крови некоторых видов на протяжении годового цикла (Hardig, Hoglund, 1983;

Soldatov, Maslova, 1989), нахождение рыб в условиях гипо- и гипертермии (30–40°C) (Koudela, Zitkova, 1991; Jensen et al., 1998; Andreeva, Ryabtseva, 2011), гипоксии (Affonso et al., 2002; Chen et al., 2017) и др.

В настоящем обзоре рассмотрены не только токсические варианты метгемоглобинемии. Особое внимание уделяется естественным состояниям, при которых происходит самопроизвольный рост концентрации MtHb в крови рыб.

## ТОКСИЧЕСКАЯ МЕТГЕМОГЛОБИНЕМИЯ У РЫБ

Большое число публикаций посвящено токсическим вариантам метгемоглобинемии. Процесс перехода гемоглобина в мет-состояние может быть индуцирован рядом агентов: нитритом, нитратами, анилином, нитробензолом и рядом других соединений (Anuradha, Subburam, 1995; Schoore et al., 1995; Mathies, Mauldin, 2020). Особое внимание уделяется действию нитритов (Tucker, MacMillan 1992; Anuradha, Subburam, 1995; Schoore et al., 1995; Yavuzcan et al., 2006). В условиях искусственного выращивания рыб концентрация данных соединений в воде может существенно повышаться. Это приводит к значительному увеличению уровня MtHb, что снижает кислородную емкость крови и вызывает развитие состояния гипоксии у рыб (Tomasso, 1994; Bieniarz et al., 1995; Saoud et al., 2014). При этом содержание окисленного пигмента в крови может повышаться до  $\geq 50\%$  (Hofer, Gatumu, 1994; Yavuzcan et al., 2006). Рост концентрации MtHb обычно происходит на фоне развития выраженной анемии, число эритроцитов и концентрация гемоглобина в крови снижаются (Hilmy et al., 1987; Wang, Hu, 1989). Это еще более усугубляет развитие состояния гипоксии и сопровождается гибелью рыб. Сравнительная оценка чувствительности респираторных пигментов рыб к действию  $\text{NO}_2^-$  показала наличие существенных расхождений (Велдре, Роома, 1990). Так, если у радужной форели достоверный рост содержания MtHb отмечен при концентрации  $\text{NO}_2^-$  0.096 мг/л (Smith, Russo, 1975), то у сомика (*Ictalurus punctatus*) лишь при 1.31 мг/л (Urrutia, Tomasso, 1987).

Отмечено, что переход гемоглобина в MtHb в присутствии  $\text{NO}_2^-$  легче всего происходит в дезоксисостоянии, чем в оксигенированном пигменте (Jensen, 1990). Это связано с тем, что в неоксигенированном гемоглобине ферро-ион находится в высокоспиновом состоянии (Уайт и др., 1981). Четыре из пяти 3d-орбиталей валентной оболочки содержат по одному неспаренному электрону. Радиус высокоспинового железа велик, поэтому оно смещается относительно плоскости порфиринового кольца на 0.06 нм в сторону координационно связанной с ним имидазоль-

ной группы гистидина. Присоединение кислорода переводит железо в низкоспиновое состояние, в котором все электроны спарены. Радиус  $\text{Fe}^{2+}$  уменьшается, и оно входит в центр порфиринового кольца. Отсюда следует, что любые изменения, влекущие за собой изменение низкоспинового состояния  $\text{Fe}^{2+}$  в  $\text{HbO}_2$  комплексе, могут стать причиной отрыва электрона от железа и приводить к его окислению. Решающее значение при этом имеет взаимодействие между протекторным гистидином и  $\text{Fe}^{2+}$ .

### ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ХЛОРИДОВ И АДРЕНАЛИНА

В серии исследований отмечено, что хлориды обладают защитным действием, снижая или предотвращая развитие метгемоглобинемии в условиях нитритной интоксикации организма (Rodríguez-Moreno, Tarazona, 1994; Bowser et al., 2011). Предполагается, что протекторное действие  $\text{Cl}^-$  реализуется на уровне жабр. Доказательство этого – снижение концентрации  $\text{NO}_2^-$  в плазме крови у животных, находящихся в среде с повышенным содержанием  $\text{Cl}^-$  (Tomasso et al., 1979). У рыб с пониженным уровнем хлоридных клеток в жабрах рост  $\text{NO}_2^-$  в плазме более выражен (Williams, Eddy, 1988a). В то же время, ряд исследователей считают, что механизм защитного действия  $\text{Cl}^-$  на гемоглобин в условиях нитритного загрязнения до конца не выяснен (Tomasso, 1994). Не исключается также непосредственное влияние  $\text{Cl}^-$  на молекулу пигмента. Показано, что процесс образования  $\text{MtHb}$  в присутствии нитропроизводных бифенилэфирных гербицидов зависит от числа молекул  $\text{Cl}^-$  в данных соединениях: чем это число больше, тем ниже уровень окисленного пигмента (Miyachi et al., 1979). Вместе с тем на некоторые виды рыб (горбыль *Sciaenops ocellatus*)  $\text{Cl}^-$  не оказывает заметного влияния (Wise, Tomasso, 1988). Менее выраженное протекторное действие отмечено также со стороны  $\text{HCO}_3^-$  (Tomasso et al., 1979),  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  (Велдре, Роома, 1990).

Длительное содержание рыб в среде с высокой концентрацией  $\text{NO}_2^-$  в ряде случаев сопровождалось компенсацией отмеченных в начале негативных изменений. Содержание  $\text{NO}_2^-$  в плазме и концентрация  $\text{MtHb}$  снижались на фоне увеличения уровня адреналина и появления в крови новой популяции мелких эритроцитов (Williams, Eddy, 1988b). Введение в инкубационную среду амилорида (усиливает выведение  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  на уровне почечных канальцев) подавляло действие адреналина (Paajaste, Nikinmaa, 1991). Это указывает на то, что в основе, отмеченной выше реак-

ции, лежит  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмен на уровне мембран циркулирующих клеток красной крови. Вход  $\text{Na}^+$  в эритроциты и его выход должны сопровождаться соответственно увеличением и снижением внутриклеточного уровня  $\text{Cl}^-$ , который препятствует переходу гемоглобина в окисленное состояние. В этом, по-видимому, и следует усматривать механизм защитного действия адреналина.

### СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИИ МЕТГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ РЫБ

Как уже отмечали, респираторные пигменты у рыб отличаются низкой устойчивостью к окислению в сравнении с высшими позвоночными (Kawatsu et al., 1991; Alayash et al., 1993; Powell, Perry, 1997). Они могут периодически переходить в ферри-форму без видимых признаков токсической метгемоглобинемии. Такое состояние обнаружено у отдельных видов на протяжении годового цикла (Hardig, Hoglund, 1983; Дубинина и др., 1988; Soldatov, Maslova, 1989). Максимальная концентрация метгемоглобина выявлена у *Gadus morhua* – 27% (Graham, Fletcher, 1986). При этом сезонная динамика уровня  $\text{MtHb}$  в крови имеет явно выраженную видовую специфичность и обычно не отражает естественный ход изменения температуры и фотопериода (Graham, Fletcher, 1986; Soldatov, Maslova, 1989). Анализ причин роста доли окисленного пигмента в крови рыб в течение годового цикла показал, что он обусловлен особенностью течения эритропоэтических процессов в кроветворной ткани. Наиболее активная пролиферация и дифференцировка эритроидных элементов происходит в пронефросе и отчасти в мезонефросе (Флерова и др., 2020) в постнерестовый период и продолжается в течение двух-трех месяцев (Maslova et al., 1988; Andreeva et al., 2017a). В остальное время кроветворная ткань выключена из активного функционирования. Это приводит к постепенному старению циркулирующей эритроцитарной массы. Активность  $\text{NADH}$ -диафоразы в эритроцитах падает, что приводит к росту концентрации  $\text{MtHb}$  в крови (Soldatov, Maslova, 1989).

Для уточнения механизмов, определяющих изменение концентрации гемоглобина и метгемоглобина в течение года, исследована эритропоэтическая активность кроветворной ткани пронефроса у кефали и камбалы (Maslova et al., 1988). Показано, что активная пролиферация и дифференцировка эритроидных элементов в головной почке происходила только в постнерестовый период и наблюдалась в течение 1.5–2 мес. Об этом свидетельствовало значительное увеличение эритроидной популяции клеток в пронефросе, рост индекса импульсного мечения клеток  $^3\text{H}$ -тимидином, появление в периферическом русле пролиферирую-

щих базофильных нормобластов. В остальные периоды годового цикла происходило созревание и старение образованной эритроцитарной массы, что отражает снижение ее устойчивости к кислотному фактору. Кроветворная ткань при этом была выключена из активного функционирования. Именно кратковременность эритропоэтических процессов в течение года, по-видимому, — основная причина того, что спустя 8–10 мес, к началу следующего нерестового периода эритроцитарное равновесие смещено в пользу деструктивных процессов и сопровождалось снижением числа эритроцитов и концентрации гемоглобина в крови.

Угнетение эритропоэза, снижение числа эритроцитов и концентрации гемоглобина в крови в период нереста отмечено в работах ряда авторов (Raizada, Singh, 1981; Маслова, Тавровская, 1991; Ranzani-Paiva, 1995). Наряду со смещением эритроцитарного равновесия, снижение кислородной емкости крови в преднерестовый период может быть связано и с белковой недостаточностью в организме рыб, развивающейся на основе активной генерации половых продуктов. Известно, что белковая недостаточность всегда сопряжена с более или менее выраженной анемией у рыб (Kokkidis et al., 2000). Анемия и гипоксия, в свою очередь, служат мощным фактором выработки эритропоэтинов и активизации эритропоэза у рыб (Weinberg et al., 1976; Marinsky et al., 1990; Murad et al., 1990; Houston et al., 1996; Rothmann et al., 2000). О возможности продукции данных соединений в организме рыб свидетельствуют работы, выполненные на радужной форели (Wickramasinghe, 1993). Иммунохимически эритропоэтины идентифицированы у этого вида в почках, селезенке, печени и плазме крови. Местом их образования, по-видимому, являются почки. Здесь обнаружена самая высокая концентрация эритропоэтинов. Отмечено также, что продукция эритропоэтинов в организме рыб положительно коррелирует с содержанием половых гормонов в крови (тестостерона), т.е. нерест и образование эритроцитов кроветворной тканью — сопряженные процессы (Pottinger, Pickering, 1987). В связи с этим, интенсификация процессов пролиферации и дифференцировки клеток эритроидного ряда в кроветворной ткани в постнерестовый период является вполне закономерным следствием анемичного состояния рыб в преднерестовый период.

Кратковременность функционирования кроветворной ткани в течение года, по-видимому, — основная причина того, что спустя 8–10 мес, к началу следующего нерестового периода эритроцитарное равновесие смещалось в пользу деструктивных процессов. Это сопровождалось снижением числа эритроцитов и концентрации гемоглобина в крови. Такая ситуация возможна только в случае, если циркулирующие клетки красной крови будут иметь высокую продолжительность жизни.

Исследования, выполненные на ряде пресноводных рыб с применением  $^3\text{H}$ -тимидина, показали, что средняя продолжительность жизни зрелого эритроцита у них составляет  $>315$  сут (Золотова, 1989), что согласуется с выявленной закономерностью.

Из представленной информации следует, что в течение 8–10 мес в году обновление циркулирующих эритроцитов у рыб не происходит и, соответственно, должно приводить к равномерному старению клеток и снижению их кислотной резистентности. Доказательство этого — анализ кислотных эритрограмм кефалей (Солдатов, 2005). От осени к лету устойчивость циркулирующих эритроцитов к кислотному воздействию равномерно снижается. Об этом свидетельствует значительный рост числа клеток красной крови, лизируемых в первые 2.5 мин, и снижение числа эритроцитов, лизируемых после 5.5 мин. Следует отметить, что нерест кефали-сингиля происходит в течение августа–сентября (Гриценко и др., 2006).

Известно, что активность ферментативных систем антиоксидантной защиты у старых эритроцитов снижена (Phillips et al., 2000; Lund et al., 2000). Это, как следствие, должно сопровождаться окислительной модификацией белков и гемоглобина, в частности. В исследованиях, выполненных на некоторых видах черноморских рыб, показано, что в преднерестовый период происходило снижение активности NADH-диафоразы эритроцитов (Soldatov, Maslova, 1989). По мнению Р.Е. Регана и Д.Г. Дреннана (Reagan, Drennan, 1993), данный фермент — ключевой в восстановлении метгемоглобина у рыб. Он играет роль специфического переносчика электронов от NADH через цитохром  $b_5$  на молекулу окисленного респираторного пигмента. Поэтому рост содержания метгемоглобина в крови рыб в преднерестовый период, очевидно, неслучайный.

#### УРОВЕНЬ МЕТГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ РЫБ И ТЕМПЕРАТУРА

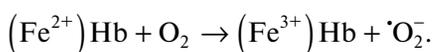
Температура — один из важнейших факторов водной среды. Обладающая высокой теплоемкостью и теплопроводностью вода не допускает существенных изменений значений этого фактора, поэтому большинство водных пойкилотермов обитает в относительно постоянных температурных условиях. Однако сезонные вариации температуры среды оказывают весьма существенное влияние на многие молекулярные системы организма рыб, и гемоглобин в этой связи не является исключением. Уровень окисленного пигмента в крови в течение годового цикла может превышать 10% (Hardig, Hoglund, 1983; Soldatov, Maslova, 1989). У некоторых видов рыб он достигает 31% (Черникова, 1974). Данное явление наблюдается

как при высоких, так и низких температурах среды и скорее отражает динамику естественных функциональных состояний организма рыб, нежели непосредственное влияние температурного фактора. Об этом свидетельствуют данные предыдущего раздела.

Вместе с тем исследования, выполненные в условиях эксперимента, показали существенное влияние температуры на уровень MtHb в крови рыб. При ее понижении доля окисленного пигмента в крови рыб повышалась (Солдатов, 1989; Koudela, Zitkova, 1991; Jensen, Nielsen, 2018). Рост концентрации MtHb коррелировал со снижением активности NADH-диафоразы (Солдатов, 1989; Schooge et al., 1995). Расхождение результатов натурных (сезонные изменения температуры) и экспериментальных исследований определялось, по-видимому, тем, что постановка срочного эксперимента приходилась на одно и то же естественное функциональное состояние организма. Это исключало многофакторность характерную для условий внешней среды, т.е. позволяло изучать влияние температуры как самостоятельного фактора.

#### ГИПОКСИЯ И УРОВЕНЬ МЕТГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ РЫБ

Случаи перехода гемоглобина в мет-форму в условиях гипоксии отмечены во многих работах, выполненных на низших и высших позвоночных (Affonso et al., 2002; Chen et al., 2017). Эта информация получена в основном в условиях *in situ* или экспериментов *in vivo*, которые не исключают влияние и других факторов. Недавно получены аналогичные результаты и для условий *in vitro* (Soldatov et al., 2020). Реакция достаточно парадоксальна, так как наблюдается при низком уровне окислительной нагрузки. При этом отмечено, что деоксигенированный гемоглобин легче подвергается окислению (Mansouri, 1981; Jensen et al., 1998), так как в дезоксиформе гемоглобина ферро-ион находится в высокоспиновом состоянии (четыре неспаренных электрона) (Уайт и др., 1981), как было сказано выше. Роль акцептора электрона при этом может выполнять молекула кислорода, что приводит к образованию  $\cdot\text{O}_2^-$ :



В условиях гипоксии доля дезоксиформы повышается, что должно усиливать процессы автоокисления гемоглобина. При этом в венозной крови достаточно свободного кислорода способного принять электроны от  $\text{Fe}^{2+}$ , так как диффузия его в ткани ограничивается из-за низких концентрационных градиентов в системе “кровь → ткани”.

Не следует исключать из внимания и тот факт, что в условиях нормоксии в ядерных эритроцитах рыб активно протекают аэробные процессы. Об этом свидетельствует наличие в них митохондрий (Boutilier, Ferguson, 1989; Phillips et al., 2000). При дефиците кислорода в клетках красной крови должна повышаться роль реакций гликолиза, которые могут иметь два следствия: снижение величины внутриклеточной pH и возникновение дефицита NADH. Это должно сопровождаться снижением активности NADH-диафоразы, которая выполняет роль специфического переносчика электрона с NADH на цитохром  $b_5$ , а затем на MtHb (Percy, Lappin, 2008). Действительно, при гипоксии наблюдается существенное закисление внутриклеточной среды эритроцита (Adragna et al., 2004). Это должно ограничивать активность NADH-диафоразы и способствовать переходу гемоглобина в окисленное состояние. Показано также, что значительное снижение pH ускоряет процесс автоокисления гемоглобина (Perutz, 1990).

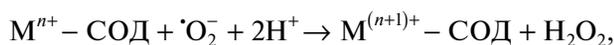
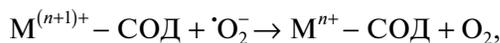
Переходу гемоглобина в окисленное состояние может способствовать еще один достаточно масштабный процесс, который развивается в эритроцитах при адаптации рыб к условиям гипоксии, — свеллинг (набухание) клеток красной крови. Он описан во многих работах (Holk, 1996; Jensen et al., 1998). Считается, что данная реакция направлена на коррекцию внутриклеточного pH и определяется работой  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -антипорта (Tufts, 1992). Она контролируется адреналином, норадреналином и реализуется через  $\beta$ -адренорецепторы клеток и cAMP (Salama, Nikinmaa, 1990; Val et al., 1997). Следует отметить, что свеллинг эритроцитов рыб наблюдался и у изолированных взвесей клеток (Andreeva et al., 2017b). Допускается, что данная реакция связана со значительным снижением pH цитоплазмы и, как следствие, ростом сродства внутренней стороны мембраны клеток к  $\text{H}^+$ , что активизирует  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -антипорт.

Работа  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -антипорта в условиях гипоксии предполагает вход в клетку  $\text{Na}^+$ . Это должно обеспечить оводнение цитоплазмы и рост ее диэлектрической проницаемости. Последнее облегчает проникновение воды в гидрофобную полость белков и гемоглобина в частности (Уайт и др., 1981). Вода встраивается на уровне имидазольной группы His, вызывая окисление как окси-, так и дезоксиформ пигмента, что должно сопровождаться освобождением  $\cdot\text{O}_2^-$ . Учитывая масштабность данного процесса, можно допустить, что он является основным в образовании мет-формы и  $\cdot\text{O}_2^-$  при экстремальных формах гипоксии.

Вместе с тем, необходимо отметить, что не во всех работах регистрируется рост содержания

метгемоглобина в крови при гипоксии (Soldatov, Parfenova, 2001), что, вероятно, связано с исследованием умеренных форм гипоксии ( $>2.5$  мг/л). В этом случае эти концентрации кислорода также не оказывали заметного влияния на функциональное состояние гемоглобина.

Гипоксия вызывает у рыб также еще ряд неоднозначных реакций: рост активности каталазы (CAT, КФ 1.11.1.6) и супероксиддисмутазы (SOD), что допускает дисмутацию  $\cdot\text{O}_2^-$ :



где М – переходный металл.

Это отмечается на уровне различных соматических тканей, включая эритроциты крови (Willmore, Storey, 1997; Lushchak, Bagnyukova, 2006; Stara et al., 2012). Поскольку большинство гидробионтов лишь перманентно сталкиваются с условиями внешней гипоксии, предложено рассматривать факт роста активности CAT и SOD, как подготовку к последующей реоксигенации (Lushchak, Bagnyukova, 2006). Можно также допустить наличие связи между ростом содержания МtHb в крови и увеличением активности CAT и SOD, поскольку повышение содержания ферри-формы в крови может сопровождаться освобождением  $\cdot\text{O}_2^-$ .

В экспериментах, выполненных на морском ерше, показано, что активность обоих ферментов повышалась и достигала максимальных значений при концентрациях кислорода в инкубационной среде  $<1$  мг  $\text{O}_2/\text{л}$  (Soldatov et al., 2020). Величина  $R^2$  для системы “SOD  $\leftrightarrow$  CAT” превышала 0.8. Одновременно обнаружена значимая связь между активностью SOD и CAT, с одной стороны, и содержанием мет-формы гемоглобина, с другой стороны ( $R^2 > 0.7$ ), т.е. в эритроцитах морского ерша в условиях гипоксии реализуется реакция дисмутации супероксида, продукция которого, с высокой долей вероятности, определяется переходом гемоглобина в ферри-форму.

Эффективность перехвата супероксида в реакциях дисмутации можно оценить по состоянию эритроцитов. В условиях гипоксии уровень активных форм кислорода (гидроперекисей) в клетках красной крови не повышался (Soldatov et al., 2020). Интенсивность флуоресценции DCF-AM, напротив, была ниже контрольных значений. Данные по флуоресценции SYBR Green I и PI не позволяют говорить о росте фракции мертвых клеток в суспензии эритроцитов. Это означает, что SOD и KAT полностью нейтрализовали обра-

зующийся  $\cdot\text{O}_2^-$ , т.е. контролируемая нами реакция находилась в пределах физиологической нормы.

Следует отметить, что рассмотренный выше порядок процессов имеет определенные функциональные следствия. Он позволяет проводить процесс деоксигенации венозной крови, которая содержит 40–60% связанного кислорода. Процесс не требует снижения тканевого  $\text{PO}_2$ , что особенно актуально в условиях гипоксии. Рост содержания метгемоглобина наблюдался при концентрации кислорода в инкубационной среде  $<2$  мг  $\text{O}_2/\text{л}$  (Soldatov et al., 2020). Этот процесс становится еще более выраженным в концентрационном диапазоне 0–1 мг  $\text{O}_2/\text{л}$ , что соответствует венозному насыщению кислорода. Отсюда следует, что переход гемоглобина в ферри-форму должен способствовать процессу деоксигенации пигмента при низком напряжении кислорода, что позволяет поддерживать окислительные процессы в тканях.

## ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ РЫБ И МЕТГЕМОГЛОБИН

По общему признанию, эритроциты рыб, в сравнении с млекопитающими, – менее зрелые клетки. В них постоянно присутствует ядро, а в цитоплазме методами электронной микроскопии выявляются немногочисленные митохондрии, полисомы и свободные рибосомы (Zapata, Carrato, 1981; Lane et al., 1982). В эритроцитах атлантической волосатки и микижи отмечено выраженное аэробное дыхание (Ferguson, Storey, 1991; Sephton et al., 1991). Лактат как конечный продукт гликолиза в них не накапливается, а в клетках выявляется высокая активность ряда митохондриальных маркеров: цитраткиназы и малатдегидрогеназы.

Вместе с тем подобная организация эритроцитарного метаболизма характерна не для всех видов рыб. Так, в клетках красной крови форели обнаруживаются значительные концентрации лактата и пирувата (Planus et al., 1989). Митохондрии у них малоактивны. Уровень образующегося  $\text{CO}_2$  в клетках невелик. В эритроцитах акул выявлены лишь дериваты митохондрий, т.е. аэробное окисление глюкозы с участием ферментов цикла Кребса в них не представлено (Stokes, Firkin, 1971). Весьма необычные результаты были получены для эритроцитов карпа. Показано, что глюкоза фактически не принимает участия в метаболизме клеток красной крови у данного вида. Основными субстратами у них служат лактат и пируват (Tiisonen, Nikinmaa, 1991).

Характерная особенность ядерных эритроцитов рыб – высокая активность ферментов пентозного

шунта, обеспечивающих ресинтез NADPH в клетке. По скорости утилизации глюкозы данный путь не уступает гликолизу (Bachand, Leray, 1975). Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) сопоставима с таковой у млекопитающих (Nobrega et al., 1970). Это должно обеспечивать достаточно высокий уровень NADPH и GSH в клетках, что немаловажно для процессов поддержания гемоглобина в восстановленной форме.

Ранее было показано, что роль специфического переносчика электронов от NADH через цитохром  $b_5$  на молекулу окисленного гемоглобина в эритроцитах млекопитающих выполняет NADH-диафораза. В настоящее время установлена прямая зависимость ее активности от температуры. При 10°C фермент малоактивен, что приводит к увеличению концентрации MtHb в крови (Солдатов, 1989; Tucker, MacMillan, 1992; Schoore et al., 1995). Однако в условиях длительной адаптации отмечено развитие компенсаторных реакций и частичное восстановление активности фермента. Показано, что в этом процессе принимает активное участие кроветворная ткань (Солдатов, 1989). Активизация эритропоэтических процессов в ней приводит к замене части циркулирующих эритроцитов на качественно новые клетки, NADH-диафораза которых приспособлена к функционированию в условиях низких температур. Отмечено также, что активность данного фермента изменяется в течение года и имеет выраженные межвидовые различия (Soldatov, Maslova, 1989; Reagan, Drennan, 1993).

#### АНТИОКСИДАНТНАЯ ФЕРМЕНТАТИВНАЯ СИСТЕМА ЭРИТРОЦИТОВ РЫБ

В эритроцитах рыб выявлен сходный с млекопитающими ферментный комплекс защиты клетки от перекисного окисления: супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9) (Mather-Mihaich, Di-Giulio, 1991; Zikic et al., 1991). При этом отмечаются значительные межвидовые различия в активности указанной группы ферментов (Rabie et al., 1972; Wdzieczak et al., 1982; Gabryelak, Peres, 1986). Она может быть, как высокой, так и чрезвычайно низкой, а в ряде случаев отсутствовать совсем. Особенно это касается каталазы (Rabie et al., 1972). Отмечено, что каталаза может подавлять как лизис клеток красной крови, так и образование MtHb, индуцированное  $H_2O_2$ . Однако она неактивна в присутствии супероксиддисмутаза (Kawatsu et al., 1991). При этом активность супероксиддисмутаза в эритроцитах многих видов рыб в течение года претерпевает выраженные изменения, которые тесно коррелируют с естественной динамикой MtHb

(Wdzieczak et al., 1982; Дубинина и др., 1988). По-видимому, изменение активности данного фермента в течение года определяет, в свою очередь, величину активности эритроцитарной каталазы. Закономерные изменения в течение годового цикла претерпевают также концентрации GSH и малонового альдегида в клетках красной крови (Wdzieczak et al., 1982; Hardig, Hoglund, 1983). Однако в отличие от супероксиддисмутаза изменение их концентрации фактически не отражалось на уровне окисленного пигмента в крови (Hardig, Hoglund, 1983).

Сравнительные исследования показали, что для эритроцитов рыб характерна высокая концентрация GSH. Отношение GSH/Hb было значительно выше, чем у млекопитающих (Dafre, Reischl, 1997). Уровень пероксидазной активности клеток красной крови также превосходил таковой у высших позвоночных (Wdzieczak et al., 1982). Пероксидаза при этом рассматривается как основной протектор полиненасыщенных жирных кислот цитоплазматических мембран эритроцитов от перекисного окисления (Gabryelak, Peres, 1986). Участие данного фермента в восстановлении MtHb не обсуждается. В отношении других ферментов (каталазы, супероксиддисмутаза) результаты были неоднозначны. В одних случаях активность была низкой (Wdzieczak et al., 1982), в других высокой (Соловьев и др., 1988).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В сравнении с млекопитающими гемоглобины рыб оказались менее стойкими к окислительной нагрузке, что, по-видимому, связано с их нестабильностью и низкой эффективностью NADH-диафоразы в клетках красной крови данной систематической группы организмов.

Эритроциты рыб отличаются высоким содержанием GSH, особенно в пересчете на гемоглобин (индекс GSH/Hb). Это обусловлено высокой эффективностью реакций пентозного шунта, которые позволяют поддерживать высокий уровень NADPH в клетке. Данная особенность, вероятно, компенсирует низкую активность NADH-диафоразы.

В случае нитритной интоксикации отмечено протекторное действие на гемоглобин со стороны  $Cl^-$  и адреналина. Они в значительной степени понижали токсический эффект  $NO_2^-$ .

Переход гемоглобина в ферри-форму у рыб может быть обусловлен не только случаями токсической метгемоглобинемии. Значительный рост концентрации MtHb в крови у них наблюдается в условиях внешней гипоксии и гипотермии. Это может

быть вызвано повышением содержания дезоксиформы пигмента (гипоксия) и снижением активности NADH-диафоразы (гипотермия).

У рыб отмечено периодическое повышение содержания MtHb в крови на протяжении годового цикла. Данное состояние приурочено к преднерестовому и нерестовому периодам. Оно связано с моноциклическостью функционирования кроветворной ткани. Активный эритропоэз у рыб происходит только в постнерестовый период в течение двух-трех месяцев. В остальное время в системе красной крови преобладают деструктивные процессы, которые отражаются как на числе циркулирующих эритроцитов, так и на уровне окислительных процессов в них.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Госзадания № АААА-А18-118021490093-4 и проекта Российского фонда фундаментальных исследований № 20-04-00037.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Велдре И.А., Роома М.Я. 1990. Токсическое воздействие нитритов на рыб // Экология. № 1. С. 71.
- Гриценко О.Ф., Котляр А.Н., Котенев Б.Н. 2006. Промысловые рыбы России. Т. 2. Москва: ВНИРО.
- Дубинина Е.Е., Данилова Л.А., Ефимова Л.Ф. и др. 1988. Активность супероксиддисмутазы и содержание метгемоглобина в эритроцитах человека и животных // Журн. эволюц. биохим. физиол. Т. 24. № 2. С. 17.
- Золотова Т.Е. 1989. Экспериментальное изучение гемопозеза у рыб: Автореф. канд. дис. Москва: Москов. гос. ун-т.
- Маслова М.Н., Тавровская Т.В. 1991. Динамика сезонных изменений в системе красной крови низших позвоночных: сезонная динамика эритропоэза у форели *Salmo gairdneri* // Журн. эволюц. биохим. физиол. Т. 27. С. 796.
- Солдатов А.А. 1989. Активность NADH-зависимой метгемоглобинредуктазы в эритроцитах бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* Р. при адаптации к низким температурам // Журн. эволюц. биохим. физиол. Т. 25. № 6. С. 772.
- Солдатов А.А. 2005. Эритропоэз и концентрация метгемоглобина в крови кефали-сингиля (*Liza aurata* Risso) на протяжении годового цикла // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Петрозаводск: Изд-во Ин-та биологии Карельск. науч. центра РАН. С. 182.
- Соловьев А.Л., Дубинина Е.Е., Данилова Л.А. и др. 1988. Состав гемоглобина и активность супероксиддисмутазы у рыб, обитающих в озере Байкал. Ленинград: Ленинград. педиатр. мед. ин-т. Деп. в ВНИИ-ТИ 27.05.1988, № 4214-В88. 12 с.
- Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. 1981. Основы биохимии. Москва: Мир. Т. 3. 1158 с.
- Флерова Е.А., Сендек Д.С., Юрченко В.В. 2020. Особенности ультраструктуры мезонефроса покатной молодки балтийского лосося *Salmo salar* и кумжи *Salmo trutta* // Биология внутр. вод. Т. 13. № 4. С. 393–403. <https://doi.org/10.31857/S0320965220040075>
- Черникова В.В. 1974. Гематологическая характеристика зимующего сеголетка карпа // Известия Всесоюзного института озерного и речного рыбного хозяйства. Т. 88. С. 109.
- Adragna N.C., Di Fulvio M., Lauf P.K. 2004. Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes // J. Membrane Biol. V. 201. P. 109. <https://doi.org/10.1007/s00232-006-1002-5>
- Affonso E.G., Polez V.L., Corrêa C.F. et al. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia // Comp. Biochem. Physiol. C. V. 133. P. 375. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00127-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00127-8)
- Alayash A.I., Brockner-Ryan B.A., Fratantoni J.C. 1993. Oxidation reactions of human, opossum (*Didelphis virginiana*) and spot (*Leiostomus xanthurus*) hemoglobins: A search for a correlation with some structural-functional properties // Comp. Biochem. Physiol. V. 106B. P. 427. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90324-x](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90324-x)
- Andreeva A.M., Ryabtseva I. Adaptation mechanisms of respiratory blood function in Teleostei // J. Ichthyol. 2011. V. 51. Iss. 9. P. 799. <https://doi.org/10.1134/S0032945211050018>
- Andreeva A.Y., Soldatov A.A., Kukhareva T.A. 2017a. Black Scorpionfish (*Scorpaena porcus*) Hemopoiesis: Analysis by Flow Cytometry and Light Microscopy // The Anatomical Record. V. 300. Iss. 11. P. 1993. <https://doi.org/10.1002/ar.23631/pdf>
- Andreeva A.Y., Soldatov A.A., Mukhanov V.S. 2017b. The influence of acute hypoxia on the functional and morphological state of the black scorpionfish red blood cell // In Vitro Cell. Develop. Biol.-Animal. V. 53. P. 312. <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0111-4>
- Anuradha S., Subburam V. 1995. Role of sewage bacteria in methemoglobin formation in *Cyprinus carpio* exposed to nitrate // J. Environ. Biol. V. 16. P. 175.
- Bachand L., Leray C. 1975. Erythrocyte metabolism in the yellow perch. I. Glycolytic enzymes // Comp. Biochem. Physiol. V. 50B. № 4. P. 567.
- Bieniarz K., Szymacha J., Epler P. 1995. Gonad development, ovulation and spermiation in carp under highly eutrophicated pond conditions // Aquaculture. V. 129. P. 133.
- Blair B., Barlow C., Martin E. et al. 2020. Methemoglobin determination by multi-component analysis in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) possessing unstable hemoglobin // Methods. V. 7. № 100836. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100836>
- Boutillier R.G., Ferguson R.A. 1989. Nucleated red cell function: metabolism and pH regulation // Can. J. Zool.

- V. 67. P. 2986.  
<https://doi.org/10.1139/z89-421>
- Bowser P.R., Falls W.W., Vanzandt J. et al. 2011. Methemoglobinemia in Channel Catfish: Methods of Prevention // Prog. Fish-Cult. V. 45. Iss. 3. P. 154.  
[https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1983\)45\[154:MICC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1983)45[154:MICC]2.0.CO;2)
- Chen N., Wu M., Tang G.-P. et al. 2017. Effects of Acute Hypoxia and Reoxygenation on Physiological and Immune Responses and Redox Balance of Wuchang Bream (*Megalobrama amblycephala* Yih, 1955) // Frontiers in Physiol. V. 8. P. 1.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00375>
- Dafre A.L., Reischl E. 1997. Asymmetric hemoglobins, their thiol content, and blood glutathione of the scalloped hammerhead shark, *Sphyrna lewini* // Comp. Biochem. Physiol. V. 116B. № 3. P. 323.  
[https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(96\)00215-5](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(96)00215-5)
- Ferguson R.A., Storey K.B. 1991. Glycolytic and associated enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red cells: *in vitro* and *in vivo* studies // J. Exp. Biol. V. 155. P. 469.
- Gabryelak T., Peres G. 1986. Comparative antioxidant enzyme and lipid peroxidation study in erythrocytes and liver of some freshwater fish // Acta Biol. Hung. V. 37. № 3–4. P. 219.
- Giles M.A. 1991. Strain differences in hemoglobin polymorphism, oxygen consumption, and blood oxygen equilibria in three hatchery broodstocks of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* // Fish. Physiol. Biochem. V. 9. № 4. P. 291.
- Graham M.S., Fletcher G.L. 1986. High concentrations of methemoglobin in five species of temperate marine teleosts // J. Exp. Zool. V. 239. P. 139.  
<https://doi.org/10.1002/jez.1402390117>
- Hardig J., Hoglund L.B. 1983. Seasonal and ontogenetic effects on methaemoglobin and reduced glutathione contents in the blood of reared baltic salmon // Comp. Biochem. Physiol. V.76A. Iss. 1. P. 27.
- Hattingh J., Du Toit P.J. 1973. The haemoglobins of the yellowfish and barbel // S. Afr. J. Med. Sci. V. 38. № 1–2. P. 37.
- Hilmy A.M., El-Domiaty N.A., Wershana K. 1987. Acute and chronic toxicity of nitrite to *Clarias lazera* // Comp. Biochem. Physiol. V. 86C. P. 247.
- Hofer R., Gatumu E. 1994. Necrosis of trout retina (*Oncorhynchus mykiss*) after sublethal exposure to nitrite // Arch. Environ. Contam. Toxicol. V. 26. P. 119.
- Holk K. 1996. Effects of isotonic swelling on the intracellular Bohr factor and the oxygen affinity of trout and carp blood // Fish Physiol. Biochem. V. 15. P. 371.  
<https://doi.org/10.1007/BF01875579>
- Houston A.H., Roberts W.C., Kennington J.A. 1996. Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish // Fish Physiol. Biochem. V. 15. № 6. P. 481.  
<https://doi.org/10.1007/BF01874922>
- Huey D.W., Beitingh T.L. 1982. A methemoglobin reductase system in channel catfish, *Ictalurus punctatus* // Can. J. Zool. V. 60. № 6. P. 1511.
- Imslund A.K., Brix O., Naevdal G., Samuelsen E.N. 1997. Hemoglobin genotypes in turbot (*Scophthalmus maximus* R.), their oxygen affinity properties and relation with growth // Comp. Biochem. Physiol. V. 116A. № 2. P. 157.
- Jensen F.B. 1990. Nitrite and red cell function in carp: control factors for nitrite entry, membrane potassium ion permeation, oxygen affinity and methemoglobin formation // J. Exp. Biol. V.152. P.149.
- Jensen F.B., Fago A., Weber R.E. 1998. Hemoglobin structure and function // Fish Physiology. V. 17. San Diego: Acad. Press. P. 1.
- Jensen F.B., Nielsen K. 2018. Methemoglobin reductase activity in intact fish red blood cells // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. V. 216. P. 14.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.11.004>
- Kawatsu Y., Nakanishi Y., Takeda H. 1987. Methemoglobin determination in eel blood // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. V. 53. № 1. P. 9.  
<https://doi.org/10.2331/suisan.53.9>
- Kawatsu H., Yamazaki T., Miyamori E. 1991. *In vitro* hemolysis and methemoglobin formation in common carp erythrocytes induced by hydrogen peroxide and hypoxanthine-xanthine oxidase // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. V. 57. № 12. P. 2299.  
<https://doi.org/10.2331/suisan.57.2299>
- Kokkidis M.J., Goubier V., Martin M. et al. 2000. Haematological changes in the blood of cultured black-bass (*Microporus salmoides*) during an annual sexual reproductive cycle // Ichthyologie. V. 24. № 3S. P. 113.
- Koudela K., Zitkova V. 1991. Chronostabilita a termostabilita methemoglobinu y erythrocytech karpa obecneno // Sb. VSZ. Praze B. V. 53. P. 35.
- Krishna M.S., Venkataramana G. 2007. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with pregnancy-induced hypertension // Indian J. Physiol. Pharmacol. V. 51. P. 284.  
<https://doi.org/10.4103/0019-5359.29592>
- Lane H.C., Weaver J.W., Benson J.A., Nichols H.A. 1982. Some age-related changes of adult rainbow trout, *Salmo gairdneri* R., peripheral erythrocytes separated by velocity sedimentation at unit gravity // J. Fish Biol. V. 21. № 1. P. 1.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1982.tb02818.x>
- Lund S.G., Phillips M.C.L., Moyes C.D. Tufts B.L. 2000. The effects of cell ageing on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells // J. Exp. Biol. V. 203. P. 2219.
- Lushchak V.I., Bagnyukova T.V. 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish // Comp. Biochem. Physiol. B. V. 144. P. 283.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.02.014>
- Mansouri A. 1981. Methemoglobin formation and reduction in relation to hemoglobin oxygen affinity // Experien-

- tia. V. 37. P. 95.  
<https://doi.org/10.1007/bf01965591>
- Marinsky C.A., Houston A.H., Murad A.* 1990. Effect of hypoxia on hemoglobin isomorph abundance in rainbow trout, *Salmo gairdneri* // Can J. Zool. V. 68. № 5. P. 884.  
<https://doi.org/10.1139/z90-128>
- Maslova M.N., Soldatov A.A., Tavrovskaya T.V.* 1988. Seasonal dynamics in the state of the red blood system of several Black Sea fish // J. Evolutionary Biochem. Physiol. V. 24. № 4. P. 398.
- Mather-Mihaich E., Di-Giulio R.T.* 1991. Oxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a bleached kraft mill effluent // Arch. Environ. Contam. Toxicol. V. 20. Iss. 3 P. 391.  
<https://doi.org/10.1007/bf01064409>
- Mathies T., Mauldin R.E.* 2020. Lethal methemoglobinemia in the invasive brown treesnake after acetaminophen ingestion // Scientific Reports. V. 10. № 845.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-56216-1>
- Miyauchi M., Takagi M., Uematsu T.* 1979. Studies on toxicities of biphenyl ether herbicides and their Analogues to fish. I. The methemoglobin-formation by the nitroso-derivatives in white spotted char, *Salvelinus leucomaenis*, erythrocytes // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. V. 45. № 12. P. 1563.
- Murad A., Houston A.H., Samson L.* 1990. Haematological response to reduced oxygen-carrying capacity, increased temperature and hypoxia in goldfish // J. Fish Biol. V. 36. № 3. P. 289.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1990.tb05610.x>
- Nobrega F.G., Maia J.C.C., Colli W., Saldanha P.H.* 1970. Heterogeneity of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and electrophoretic patterns among representatives of different classes of vertebrates // Comp. Biochem. Physiol. V. 33. № 1. P. 191.  
[https://doi.org/10.1016/0010-406x\(70\)90494-9](https://doi.org/10.1016/0010-406x(70)90494-9)
- Paajaste M.N., Nikinmaa M.* 1991. Effect of noradrenaline on the methemoglobin concentration of rainbow trout red cells // J. Exp. Zool. V. 260. № 1. P. 28.  
<https://doi.org/10.1002/JEZ.1402600104>
- Percy M.J., Lappin T.R.* 2008. Recessive congenital methaemoglobinemia: cytochrome b(5) reductase deficiency // Br. J. Haematol. V. 141. Iss. 3. P. 298.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07017.x>
- Perutz M.F.* 1990. Mechanisms regulating the reactions of human haemoglobin with oxygen and carbon monoxide // Ann. Rev. Physiol. V. 52. P. 1.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ph.52.030190.000245>
- Phillips M.C.L., Moyes C.D., Tufts B.L.* 2000. The effects of cell ageing on metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells // J. Exp. Biol. V. 203. P. 1039.
- Planus J., Albi J.L., Pesquero J., Sanchez J.* 1989. Glucose metabolism in brown trout erythrocytes // Arch. Int. Physiol. Biochim. V. 97. № 5. C. 41.
- Pottinger T.G., Pickering A.D.* 1987. Androgen levels and erythrocytosis in maturing brown trout, *Salmo trutta* L. // Fish Physiol. Biochem. V. 3. P. 121.
- Powell M.D., Perry S.F.* 1997. Respiratory and acid-base pathophysiology of hydrogen peroxide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Aquat. Toxicol. V. 37. P. 99.
- Rabie F., Magid A.M., Abdel G.K., Karrar O.* 1972. Evolution of catalase in fish // Comp. Biochem. Physiol. V. 43A. № 4. P. 1053.  
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(72\)90177-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(72)90177-6)
- Raizada M.N., Singh C.P.* 1981. Seasonal variations in the erythrocyte counts and haemoglobin content of *Cirrhinus mrigala* (Ham.) // Proc. Indian Nat. Sci. Acad. V. 47. № 5. P. 656.
- Ranzani-Paiva M.J.T.* 1995. Hematological characteristics of the mullet, *Mugil platanus* G. from Cananea lagoon-estuarine region // Bol. Inst. Pesca-Sao-Paulo. V. 22. P. 1.
- Reagan R.E., Drennan D.G.* 1993. Enzymatic reduction of methemoglobin to hemoglobin in blue catfish, *Ictalurus furcatus*, and channel catfish, *I. punctatus*, [male] × blue catfish [female] hybrids // J. Appl. Aquacult. V. 3. № 3–4. P. 223.  
[https://doi.org/10.1300/J028v03n03\\_02](https://doi.org/10.1300/J028v03n03_02)
- Rodriguez-Moreno P.A., Tarazona J.V.* 1994. Nitrite-induced methemoglobin formation and recovery in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at high chloride concentrations // Bull. Environ. Contam. Toxicol. V. 53. № 1. P. 113.
- Rothmann C., Levinshal T., Timan B. et al.* 2000. Spectral imaging of red blood cells in experimental anemia of *Cyprinus carpio* // Comp. Biochem. Physiol. V. 125A. P. 75.  
[https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(99\)00157-9](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(99)00157-9)
- Sajiki J., Takahashi K.* 1991. *In vitro* Formation of Methemoglobin by Lipophilic Fractions in Fishes and the Causative Substance // Eisei-Kagaku. V. 37. № 6. P. 467.  
<https://doi.org/10.1248/jhs1956.37.467>
- Salama A., Nikinmaa M.* 1990. Effect of oxygen tension on catecholamine-induced formation of cAMP and on swelling of carp red blood cells // Amer. J. Physiol. Cell Physiol. V. 259. Iss. 5. P. C723.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1990.259.5.C723>
- Saoud P.I., Naamani S., Ghanawi J., Nasser N.* 2014. Effects of Acute and Chronic Nitrite Exposure on Rabbitfish *Siganus rivulatus* Growth, Hematological Parameters, and Gill Histology // J. Aquac. Res. V. 5. Iss. 6. P. 275.  
<https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000263>
- Schechter A.N.* 2008. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine // Blood. V. 112. Iss. 10. P. 3927.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-078188>
- Schoore E.J., Simco B.A., Davis K.B.* 1995. Responses of blue catfish and channel catfish to environmental nitrite // J. Aquat. Anim. Health. V. 7. № 4. P. 304.  
[https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1995\)007<0304:RO-BCAC>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1995)007<0304:RO-BCAC>2.3.CO;2)

- Sephton D.H., Macphee W.L., Driedzic W.R. 1991. Metabolic enzyme activities, oxygen consumption and glucose utilization in sea raven (*Hemitripterus americanus*) erythrocytes // J. Exp. Biol. 1991. V. 159. P. 407.
- Smith C.E., Russo R.C. 1975. Nitrite-induced methemoglobinemia in rainbow trout // Progr. Fish-Cult. V. 37. № 3. P. 150.
- Soldatov A.A., Maslova M.N. 1989. Concentration of methemoglobin in blood of fish in the course of the annual cycle // J. Evolutionary Biochem. Physiol. V. 25. № 4. P. 317.
- Soldatov A.A., Parfenova I.A. 2001. The methemoglobin blood level and stability of circulating erythrocytes of the rockfish *Scorpaena porcus* to osmotic shock under conditions of experimental hypoxia // J. Evolutionary Biochem. Physiol. V. 37. P. 622.  
<https://doi.org/10.1023/A:1014470311122>
- Soldatov A.A., Parfyonova I.A., Konoshenko S.V. 2004. Haemoglobin system of black sea round goby under experimental hypoxia conditions // Ukrain'skyi Biokhimichnyi Zhurnal. V. 76. № 3. P. 85.
- Soldatov A.A., Andreeva A.Y., Kukhareva T.A., Andreyenko T.I. 2020. Methemoglobin and the Activities of Catalase and Superoxide Dismutase in Nucleated Erythrocytes of *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) under Experimental Hypoxia (*in vitro*) // Biophysics (Russian Federation). V. 65. Iss. 3. P. 452.  
<https://doi.org/10.31857/S0006302920030138>
- Stara A., Machova J., Velisek J. 2012. Effect of chronic exposure to prometryn on oxidative stress and antioxidant response in early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.) // Neuro Endocrinol. Lett. V. 33. P. 130.  
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.019>
- Stokes E.E., Firkin B.G. 1971. Studies of the peripheral blood of the Port Jackson shark (*Heterodontus portusjacksoni*) with particular reference to the thrombocyte // Brit. J. Haematol. V. 20. № 4. P. 427.
- Tiihonen K., Nikinmaa M. 1991. Substrate utilization by carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes // J. Exp. Biol. V. 161. P. 509.
- Tomasso J.R. 1994. Comparative inhibition of nitrite toxicity by chloride in temperate freshwater and euryhaline fishes // Inter. Fish Physiol. Symp., Vancouver, BC (Canada), 16–21 July 1994. P. 239.
- Tomasso J.R., Simco B.L., Davis K.B. 1979. Chloride inhibition of nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) // J. Fish. Res. Board Can. V. 36. № 9. P. 1141.  
<https://doi.org/10.1139/f79-160>
- Tucker C.S., MacMillan J.R. 1992. Effect of short-term starvation on methemoglobin levels in nitrite-exposed channel catfish // J. Appl. Aquacult. V. 1. Iss. 4. P. 21.  
[https://doi.org/10.1300/J028v01n04\\_03](https://doi.org/10.1300/J028v01n04_03)
- Tufts B. 1992. *In vitro* evidence for sodium-dependent pH regulation in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) red blood cells // Can. J. Zool. V. 70. P. 411.
- Urrutia M.L., Tomasso J.R. 1987. Acclimation of channel catfish to environmental nitrite // J. World-Aquacult. Soc. V. 18. № 3. P. 175.
- Val A.L., De Menezes G.C., Wood C.M. 1997. Red blood cell adrenergic responses in Amazonian teleosts // J. Fish Biol. V. 52. P. 83.
- Wang H., Hu D. 1989. Toxicity of nitrite to grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in ponds and its way of prevention // J. Fish. China Shuichan Xuebao. V. 13. P. 207.
- Wdzieczak J., Zalesna G., Bartkowiak A. et al. 1982. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase level in erythrocytes and livers of different fresh water and marine fish species // Comp. Biochem. Physiol. V. 73B. Iss. 2. P. 361.  
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90298-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90298-X)
- Weinberg S.R., Lobue J., Siegel C.D., Gordon A.S. 1976. Hematopoiesis of the kissing gourami. Effects of starvation, bleeding and plasma-stimulating factors and its erythropoiesis // Can. J. Zool. V. 54. P. 1115.  
<https://doi.org/10.1139/z76-127>
- Wickramasinghe S.N. 1993. Erythropoietin and the human kidney: evidence for an evolutionary link from studies of salmo gairdneri (*Onchorhynchus mykiss*) // Comp. Biochem. Physiol. V. 104A. P. 63.  
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90009-S](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90009-S)
- Williams E.M., Eddy F.B. 1988a. Regulation of blood haemoglobin and electrolytes in rainbow trout, *Salmo gairdneri* R. // Aquat. Toxicol. V. 13. № 1. P. 13.  
[https://doi.org/10.1016/0166-445X\(88\)90069-0](https://doi.org/10.1016/0166-445X(88)90069-0)
- Williams E.M., Eddy F.B. 1988b. Anion transport, chloride cell number and nitrite-induced methemoglobinaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*) // Aquat. Toxicol. V. 13. № 1. P. 29.  
[https://doi.org/10.1016/0166-445X\(88\)90070-7](https://doi.org/10.1016/0166-445X(88)90070-7)
- Willmore W.G., Storey K.B. 1997. Antioxidant systems and anoxia tolerance in a freshwater turtle, *Trachemys scripta elegans* // Mol. Cell. Biochem. V. 170. P. 177.  
<https://doi.org/10.1023/a:1006817806010>
- Wise D.J., Tomasso J.R. 1988. Ascorbic acid inhibition of nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish // Prog. Fish Cult. V. 50. № 2. P. 77.  
[https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1988\)050<0077:AA-IONI>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1988)050<0077:AA-IONI>2.3.CO;2)
- Yavuzcan H., Köksal G., Borazan G., Gunal A.C. 2006. Nitrite-induced methemoglobinemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* // J. Applied. Ichthyol. V. 22. Iss. 5. P. 427.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00761.x>
- Zapata A., Carrato A. 1981. Ultrastructure of elasmobranch and teleost erythrocytes // Acta zool. V. 62. № 2. P. 129.  
<https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.1981.tb00621.x>
- Zikic R.V., Stajin A., Petrovic V.M. 1991. Effect of dexamethasone on the activity of superoxide dismutase and catalase in the tissue and erythrocytes of goldfish // Acta Biol. Jugosl. C. V. 27. Iss. 1. P. 45.

## The Content of Methemoglobin in the Blood of Teleostean Fish with Account the Environmental Conditions and Natural States of the Organism (Review)

A. A. Soldatov\*

*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia*

*\*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru*

Summarized information on the factors determining the increase in the content of methemoglobin (MtHb) in the blood of teleostean fish is presented. It is shown that the transition of hemoglobin to the ferry form in fish can be caused not only by cases of toxic methemoglobinemia. A significant increase in the concentration of MtHb in their blood is also observed under the conditions of external hypoxia and hypothermia. This may be due to an increase in the content of the deox-form of the pigment (hypoxia) and a decrease in the activity of NADH-diaphorase (hypothermia). In fish there was also a periodic increase in the content of MtHb in the blood during the annual cycle. This state coincides with the pre-spawning and spawning periods. It is associated with the monocyclic functioning of the hematopoietic tissue. Active erythropoiesis in fish occurs only in the post-spawning period for 2–3 months. During the rest of the time, the destructive processes dominate in the red blood system that affects both the number of circulating red blood cells and the level of oxidative processes in them. In comparison with mammals, fish hemoglobins turn out to be less resistant to oxidative stress, which is probably due to their instability and low efficiency of NADH-diaphorase in red blood cells of this systematic group of organisms. At the same time, fish red blood cells are characterized by a high content of glutathione (GSH), especially in terms of hemoglobin (GSH/Hb index). This is due to the high efficiency of the pentose shunt reactions, which allows maintaining a high level of NADPH in the cell. This feature probably compensates the low activity of NADH diaphorase. In the case of nitrite intoxication, a protective effect of  $\text{Cl}^-$  and epinephrine on hemoglobin was noted. They significantly reduced the toxic effect of  $\text{NO}_2^-$ . The mechanisms responsible for the transition of fish hemoglobin to the oxidized state are discussed.

*Keywords:* methemoglobin, HADH-diaphorase, erythrocytes, hypoxia, hypothermia, annual cycle, marine fish