

УДК 597.554.3:577.112/122

## РОЛЬ ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ В ПОДДЕРЖАНИИ ОСМОТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА У СЕРЕБРЯНОГО КАРАСЯ *CARASSIUS AURATUS* (Linnaeus, 1758) (CYPRINIDAE)

© 2020 г. А. М. Андреева<sup>1,\*</sup>, И. Ю. Торопыгин<sup>2</sup>, Д. В. Гарина<sup>1</sup>, Н. Е. Ламаш<sup>1,3</sup>, А. С. Васильев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, 152742, Борок, Россия

<sup>2</sup> Институт биомедицинской химии им. Ореховича, 119121, Москва, Россия

<sup>3</sup> Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (ННЦМБ ДВО РАН), 690041, Владивосток, Россия

\*e-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru

Поступила в редакцию 26.11.2018 г.

После доработки 05.06.2019 г.

Принята к публикации 10.10.2019 г.

Выдвинута гипотеза об участии липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в поддержании осмотического гомеостаза у рыб. Для ее проверки исследовали структурные перестройки ЛПВП в сыворотке крови серебряного карася *Carassius auratus* L. в ходе сезонной динамики и в эксперименте под влиянием критической солености. Выявлен единый алгоритм структурных реорганизаций ЛПВП у рыб в условиях естественной среды обитания и у рыб, акклиматизированных к критической солености. Этот алгоритм заключается в обратимой диссоциации-ассоциации липопротеиновых частиц. В естественной среде обитания этот алгоритм был согласован с динамикой распределения общего белка относительно капиллярной стенки, а в экспериментальных условиях — с изменениями солености воды. Результаты работы позволяют предположить возможность реализации разных стратегий поддержания осмотического гомеостаза с участием ЛПВП у высших костистых рыб, кровь которых, в отличие от млекопитающих, не содержит специализированного осмотически активного белка альбумина. Обсуждается роль липопротеинов высокой плотности как универсальных регуляторов и стабилизаторов обменных процессов.

**Ключевые слова:** серебряный карась, липопротеины высокой плотности, гомеостаз

**DOI:** 10.31857/S0044452920020023

### ВВЕДЕНИЕ

Рыбы относятся к неоднородной по своему составу группе водных низших позвоночных. Наибольшим многообразием экологических ниш среди них выделяются костистые рыбы. Широкий охват ими акваторий с различной, в том числе и колеблющейся, соленостью, косвенно указывает на наличие у Teleostei особых и эффективных механизмов осморегуляции, в том числе, механизмов поддержания баланса внеклеточной жидкости организма с участием белков плазмы. У млекопитающих эти белки создают коллоидно-осмотическое давление плазмы, причем ~80% ее осмотического эффекта обеспечивают альбумины [1].

В группе высших костистых рыб альбумин был утрачен в ходе предположительно третьей полнотной дубликации, из всех позвоночных затронувшей только Teleostei [2, 3]. Были высказаны предположения, что в поддержании онкотического давления плазмы в этой группе рыб могли бы участвовать витамин D-связывающий белок [4]

или сывороточные аполипопротеины (Apo) [5]. Однако содержание альбуминоидов (кроме сывороточного альбумина) в крови позвоночных незначительно и поэтому недостаточно для поддержания онкотического давления [6]. В то же время, содержание Apo в крови Teleostei достигает 30–36% [7], из которых более 20% приходится на ApoA в составе липопротеинов высокой плотности (HDL) [8].

У костистых рыб HDL участвуют не только в регуляции оттока холестерина от тканей к печени [7], но и в иммунитете [9] и процессах регенерации [10]. Кроме того, в эксперименте при смене солености, в крови рыб происходят реорганизации олигомеров ApoA (в составе HDL), что косвенно указывает на осмотические свойства липопротеинов [11]. Цель работы заключается в верификации данного предположения. Для изучения влияния солености на организацию сывороточных HDL был проведен анализ реорганизаций HDL серебряного карася в условиях природной среды и критической солености, величина которой для данного вида составляет 190 mmol L<sup>-1</sup> NaCl (~11.5 g kg<sup>-1</sup>) [12].

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1.1. Сведения о сборе материала

Для изучения сезонной динамики HDL использовали серебряных карасей *Carassius auratus* L. (Cypriniformes; Cyprinidae), отловленных весной (май), летом (июль) и осенью (сентябрь) в Рыбинском водохранилище (58.041083 N, 38.244356 E); соответствующие выборки из 10, 9 и 11 экземпляров были представлены преимущественно самками с гонадами III и IV (май), II–V (июль) и II и III (сентябрь) стадий зрелости. Показатели длины рыб *ad* и *ab* по Смиуту варьировали от 13.5 до 22.5 см и от 15.0 до 24.0 см соответственно; вес рыб варьировал от 60 до 310 г. Для эксперимента было отобрано 70 самок из осенней выборки с гонадами III стадии зрелости, весом от 60 до 160 г.

### 1.2. Эксперименты по акклимации рыб к соленой воде

70 самок карасей были размещены в шести аквариумах (I–VI). Плотность посадки составила 10 рыб на 100 л воды; температуру воды поддерживали на уровне 10.5–11.0°C; все аквариумы были снабжены системой продувки воздуха. На протяжении экспериментов рыб не кормили. В аквариуме I с пресной водой (FW) была размещена контрольная группа рыб, в аквариумах II–VI размещены караси, подвергнутые влиянию солености. Было поставлено два эксперимента: один с “плавным” (аквариумы II–V), другой с резким изменением солености воды (аквариум VI). Соленость воды выражали в соответствии с конвенцией Thermodynamic Equation Of Seawater (TEOS-10) в виде массовой доли NaCl в воде в  $\text{g kg}^{-1}$  [13]. В аквариумы II и III через три дня после посадки рыб начинали добавлять NaCl по  $1.0 \text{ g kg}^{-1}$  в сутки за два приема – утром и вечером; при достижении солености  $11.5 \text{ g kg}^{-1}$  “подсаливание” прекращали, и рыб выдерживали при данных условиях 20 дней. После этого у рыб из аквариума II (параллельно с контролем) отбирали образцы крови и интерстициальной жидкости белых мышц (ISF), а рыб из аквариума III подвергали постепенному “распреснению” (по  $1.0 \text{ g kg}^{-1}$  в сутки), выдерживали в пресной воде ( $\text{FW}_{\text{revert}}$ ) еще 20 дней, после чего отбирали кровь и ISF (также параллельно с контролем). В аквариуме IV рыб акклимировали к солености 40 дней, далее отбирали кровь и ISF, параллельно с контролем. В аквариуме V соленость воды плавно доводили до величины  $12.0 \text{ g kg}^{-1}$  NaCl, акклимировали 20 дней и отбирали образцы параллельно с контролем. В “остром” опыте рыб из контрольного аквариума переносили в аквариум VI ( $11.5 \text{ g kg}^{-1}$ ); выдерживали 3 сут и отбирали кровь и ISF.

### 1.3. Отбор крови и интерстициальной жидкости белых мышц

Кровь отбирали из хвостовых сосудов и отстаивали при 4°C. Отстоявшуюся сыворотку (BS) осторожно собирали пипеткой. Образцы ISF отбирали в области белых мышц выше боковой линии между краем жаберной крышки и спинным плавником; с помощью глазных ножниц с длинными тонкими лезвиями осторожно делали кожный П-образный разрез, не задевая мышечные волокна. Ввиду отсутствия в данной анатомической области карася прочного сращения кожи и мышечных волокон этот метод сбора ISF считали нетравматичным. Поскольку белые мышцы карася отличались выраженной “сухостью”, то образцы ISF отбирали бумажными полосками  $3.0 \times 5.0 \text{ мм}$  (Whatman 3MM Chr, Biometra, Германия), которые с помощью пинцета подносили к поверхности мышц и напитывали ISF.

### 1.4. Определение концентрации белка в жидкостях организма и величины градиента концентрации белка относительно стенки капилляра мышечного типа

Концентрацию белка в сыворотке определяли микробиуретовым методом [14]. Для определения концентрации белка в ISF бумажные полоски (см. пункт 3) взвешивали до и после напитывания ISF, по разнице величин определяли вес ISF на каждой полоске. Учитывая величину плотности ISF рыб  $1.05$  [15], рассчитывали объем ISF в каждой полоске. Размер полосок (см. пункт 3) был подобран с учетом ширины лунок PAG. Полоски, напитанные ISF, вносили в лунки PAG пинцетом, следя за их плотным прилеганием ко дну лунок, и проводили электрофорез (см. пункт 5). Денситометрирование и расчет количества белка в каждой лунке геля проводили с помощью программы ONE-Dscan Ver 1.31 (Scananalytic Inc.), используя в качестве “количественного” стандарта бычий сывороточный альбумин BSA (Serva, Germany), внесенный в количестве  $10 \text{ мкг}$  в отдельную лунку. Далее рассчитывали “кажущуюся” концентрацию белка в ISF, в которую, помимо внеклеточных белков, входит белок мышечных волокон парвальбумин (Pav), идентифицированный с помощью MALDI (см. пункт 6); его присутствие в ISF, вероятно, отражает нормальный процесс деградации и обновления мышечных волокон. Вычитая из величины “кажущейся” концентрации ISF долю Pav, мы получали конечную величину концентрации белка в ISF ( $C_{\text{ISF}}$ ). Величину градиента концентрации белка ( $\Delta C$ ,  $\text{g\%}$ ) относительно стенки капилляра рассчитывали по формуле  $\Delta C = C_{\text{BS}} - C_{\text{IF}}$ , где  $C_{\text{BS}}$  – концентрация белка в BS, а  $C_{\text{ISF}}$  – концентрация белка в ISF [16].

### 1.5. Электрофорез. Определение области локализации ApoA и HDL на протеомных картах BS/ISF и структурной организации белков

Белки разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE). Для постановки электрофореза использовали электрофоретические камеры (Хеликон, Россия) на 10, 14 и 30 лунок, источник питания “Эльф-8” (ДНК-технология, Россия). Для приготовления разделяющего и концентрирующего PAG использовали трис-НСI буфер с pH 8.9 и 6.9 соответственно. В лунки концентрирующего PAG вносили 1.5–2 мкл исследуемой жидкости (~6–8 мкг белка), разведенной таким же количеством 40%-ного раствора сахарозы. В работе использовали одномерный и двумерный (2D-E) электрофорезы в неденатурирующих (диск-Е, электрофорез в градиенте концентраций 5–40% PAG) и денатурирующих (Ds-Na-PAG в среде восстановителя  $\beta$ -меркаптоэтанола) [17] условиях. При постановке 2D-E в первом направлении проводили диск-Е в 7.5% PAG; во втором направлении – электрофорез в 5–40% PAG и в 12.5% Ds-Na-PAG. После электрофореза в неденатурирующих условиях гели фиксировали 10%-ной ТХУ и после отмывания окрашивали 0.01%-ным раствором Coomassie R-250, приготовленным на смеси этанол–уксусная кислота–вода в соотношении 10:1:30. После Ds-Na-электрофореза гели фиксировали 70%-ным изопропиловым спиртом и далее окрашивали 0.04%-ным раствором Coomassie R-250, приготовленным на смеси изопропанол–этанол–уксусная кислота–вода в соотношении 2:1:1:6, согласно прописи [17].

В качестве маркеров молекулярной массы Mg использовали полимерные формы BSA (67, 134, 201, 268, 335 kDa), овальбумина OA (45, 90, 135 kDa) и миоглобина Mg (16, 32, 64 kDa) (Serva, Germany) и PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (11, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130, 250 kDa) (Fermentas, USA). HDL на протеомной карте идентифицировали в низкомолекулярной (НМ) анодной области относительно трансферрина Tf [18] и по наличию на его дорожке в денатурирующем 2D-E двух белков – ApoA-I (~27 kDa) и “14 kDa apolipoprotein” или Apo-14 (~14 kDa) [8]. Организацию белка по типу “мономер/олигомер” определяли по числу белковых “пятен” и их Mg в неденатурирующем и денатурирующем PAGE. Величины Mg белков и их электрофоретической подвижности Rf в PAGE определяли с помощью ПП ONE-Dscan Ver 1.31 (Scananalytic Inc.).

### 1.6. Идентификация белков с помощью масс-спектрометрии MALDI

Пробоподготовку белков для MALDI проводили по протоколу: кусочек геля, содержащего белок, дважды промывали путем инкубации в 100 мкл 40%

раствора ацетонитрила в 0.1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  в течение 20 мин при 37°C. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли по 100 мкл ацетонитрила. После его удаления и высушивания кусочка геля к нему добавляли 4 мкл раствора (15 мкг/мл) модифицированного трипсина (Promega) в 0.05 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Гидролиз проводили в течение 4 ч при 40°C, затем к раствору добавляли 7 мкл 0.5% трифторуксусной кислоты в 10%-ном растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения масс-спектров.

Масс-спектры зарегистрированы на MALDI-TOF масс-спектрометре Bruker Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics, ФРГ), оснащенном Nd:YAG УФ лазером ( $\lambda = 355$  нм), оборудованном системой задержки экстракции ионов Bruker PAN и аппаратурой для регистрации тандемных масс-спектров LIFT. Для обработки и анализа полученных спектров использовали пакет программ Bruker Flex-Analysis 2.4. Все спектры зарегистрированы в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона, при ускоряющем напряжении 25 кВ и напряжении рефлектрона 27 кВ. Внутреннюю калибровку спектров осуществляли по известным регистрируемым сигналам продуктов автолиза трипсина. Точность измерения молекулярных масс не хуже 70 миллионов долей (м.д., ppm). Масс-спектры фрагментации получены в тандемном режиме MALDI-масс-спектрометра Ultraflex с регистрацией положительных ионов, при первом ускоряющем напряжении 8 кВ, втором ускоряющем напряжении 19 кВ и отражающем напряжении на рефлектроне 29 кВ.

Идентификацию белков и пептидов по массам продуктов триптического гидролиза и по спектрам фрагментации отдельных пептидов проводили при помощи системы идентификации белков Mascot (MatrixScience, Великобритания) по базе данных NCBI.prot Национального центра биотехнологической информации США (NCBI). При поиске в базе данных кандидатного белка в качестве специфической протеазы указывали трипсин, также указывали возможность неполного гидролиза (до двух основных остатков в пептидах), точность определения масс не хуже 70 м.д. Ограничение по виду организма (таксону) не вводили. При необходимости получали и использовали для идентификации спектры фрагментации отдельных пептидов в тандемном режиме (ms/ms).

Ввиду ранее установленного единообразия положения белков НМ-фракции на протеомных картах BS разных видов карповых рыб [8] идентификацию ApoA-I и Apo-14 в некоторых случаях проводили по их положению и величине Rf в PAG и величинам Mg в неденатурирующем и денатурирующем PAGE, рассчитанным с помощью ПП OneDscan Ver 1.31 (Scananalytic Inc.); к этому способу

**Таблица 1.** Идентификация некоторых белков НМ-фракции BS и ISF серебряного карася

Candidate proteins	Protein view Mascot Search Results	MW calc/obs, Da	Score	Coverage, %
14 kDa apolipoprotein [Carassius gibelio] (~14 kDa)*	AAW82445.1	15771/14500	58	66
apolipoprotein A-I-1 [Hemibarbus mylodon] (~27 kDa)*	gi 206598060	29947/26700	93	6
warm temperature acclimation related 65 kDa protein-1 [Carassius carassius] (Wap65)*	BAP90357.1	50773/67500	145	42
serine proteinase inhibitor clade A, partial [Carassius auratus] (Spi)*	AGO58874.1	14176/53300	62	38
transferrin precursor [Carassius gibelio] (Tf1)*	AAK92216.1	73939/70200	203	37
transferrin precursor [Carassius gibelio] (Tf2)*	AAK92216.1	73939/55400	90	17
parvalbumin-7-like [Cyprinus carpio] (Parv <sub>4</sub> )*	XP_018969529.1	12093/11000	66	31
parvalbumin beta-2 [Cyprinus carpio] (Parv <sub>3</sub> )*	CBA35344.1	11502/11000	111	66
parvalbumin-7 isoform X3 [Cyprinus carpio] (Parv <sub>2</sub> )*	XP_018935756.1	10837/12000	85	12
parvalbumin-7 isoform X3 [Cyprinus carpio] (Parv <sub>2</sub> )*	XP_018935756.1	10837/12000	87	41

\* Обозначение белка на рис. 1.

прибегали, если Apo присутствовал в PAG в недостаточных для MALDI количествах.

### 1.7. Статистический анализ

Данные представлены в величинах  $M \pm SE$  для каждой группы рыб, рассчитанных с помощью программы Microsoft Office Excel. Для сравнения количественных признаков данных использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия между средними величинами считали достоверными при  $p < 0.05$ .

При идентификации белков в помощью MALDI кандидатные белки, имеющие параметр достоверности *score* > 83 в базе данных NCBI, считали определенными надежно ( $p < 0.05$ ).

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 2.1. Визуальная оценка состояния рыб в условиях акклимации к солёности

В ходе эксперимента не зарегистрировано ни одного случая гибели рыб. Начиная с солёности  $8.0 \text{ g kg}^{-1} \text{ NaCl}$  и выше (аквариум II), рыбы после добавления сухой навески соли замедляли движение и восстанавливали его через ~15 минут; при достижении солёности  $11.5 \text{ g kg}^{-1}$  рыбы прекращали движение и восстанавливали его через два дня. При достижении солёности  $12.0 \text{ g kg}^{-1} \text{ NaCl}$  у рыб были отмечены выраженные нарушения двигательных реакций, проявлявшиеся в их западании на бок, поэтому верхней границей переносимого карасем солёностного интервала считали солёность  $11.5 \text{ g kg}^{-1} \text{ NaCl}$ .

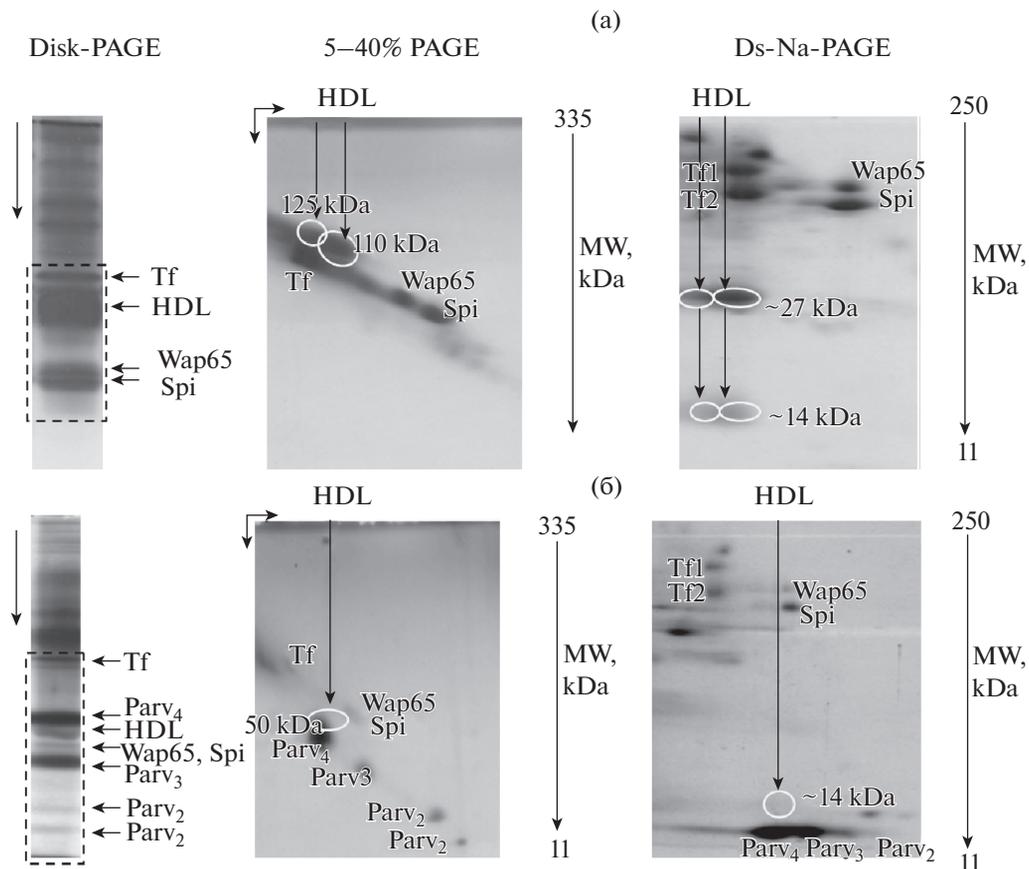
### 2.2. Организация HDL в составе НМ-фракций BS и ISF

Сывороточные HDL, локализованные на диск-электрофореграмме в области НМ-фракции, были представлены “наплывающими” на трансферрин “пятнами” с Rf 0.52–0.63 (рис. 1а). Нативные HDL были представлены ~110 и 125 kDa – частицами, каждая из которых распалась в денатурирующем 2D-E на два белка с Mг ~ 27 и 14 kDa (рис. 1а), идентифицированные как ApoA-I и Apo-14 соответственно (табл. 1). Кроме ApoA в составе НМ-фракции сыворотки идентифицированы ингибиторы сериновых протеиназ серпины (Spi) и 65 kDa белок тепловой акклимации (Wap65) (рис. 1, табл. 1).

Электрофореграммы интерстициальной жидкости были двух типов: одни визуально совпадали с сывороткой, другие отличались от нее (1) отсутствием доминирующих “пятен” HDL и (2) наличием парвальбуминов в виде тетрамеров (44 kDa), тримеров (38 kDa) и димеров (22 kDa), имеющих в денатурирующих условиях Mг ~ 11–13 kDa (рис. 1б, табл. 1). В ISF первого типа набор НМ-белков совпадал с сывороткой; в ISF второго типа доминировал парвальбумин, а в области HDL обнаружены перекрываемые тетрамерным парвальбумином белковые пятна с Mг 50 kDa, в составе которых в денатурирующем PAGE выявлены белки, по локализации на 2D-E и величине Mг соответствующие Apo-14 (рис. 1б).

### 2.3. Структурные реорганизации HDL в сыворотке рыб в условиях среды обитания и эксперимента

В ходе сезонной динамики для HDL отмечено обратимое изменение величин Rf в диск-E: “0.52–0.63 (май)” → “0.63–0.72 (июль)” → “0.52–0.63 (сентябрь)”. При плавном росте солёности (аква-



**Рис. 1.** Разделение белков сыворотки (а) и интерстициальной жидкости (б) в диск-электрофорезе (Disk-PAGE, левая колонка), неденатурирующем 2D-электрофорезе (5–40% PAGE, центральная колонка) и денатурирующем 2D-электрофорезе (Ds-Na-PAGE, правая колонка). На диск-электрофореграмме HM-фракция белков выделена пунктиром; на 2D-E представлен фрагмент протеома сыворотки/интерстициальной жидкости в виде HM-фракции. HDL – липопротеины высокой плотности; Tf, Tf1, Tf2 – изоформы трансферрина; Wap65 – “warm temperature acclimation 65 kDa protein”; Spi – серпин; Parv – парвальбумин, Parv<sub>n</sub> – олигомеры парвальбумина. 125, 110, 50 kDa – величины Мг для HDL; 27 и 14 kDa – величины Мг ApoA-I и Apo-14 соответственно. Справа от каждой протеомной карты дана шкала Мг (kDa) для маркерных белков. Белые овалы выделяют область нативных HDL и ApoA в их составе.

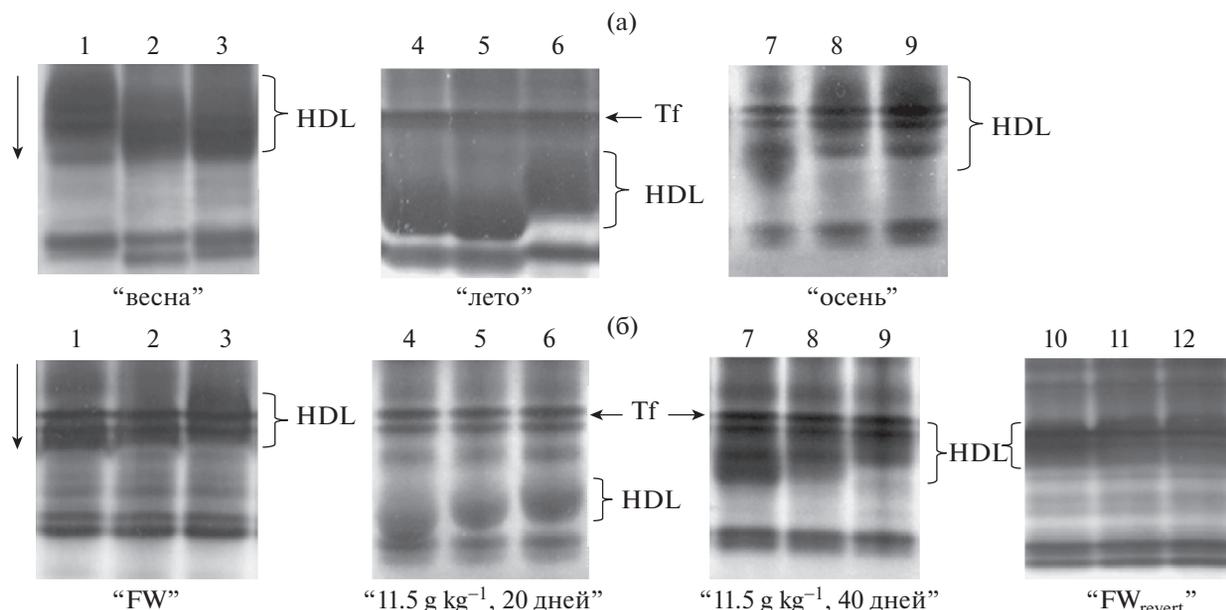
риум II) значение Rf увеличивалось с 0.52–0.63 до 0.63–0.72 у 86.1% рыб; при возвращении рыб в пресную воду ( $FW_{\text{revert}}$ ) Rf снижалось у всех рыб до исходных величин; продление экспозиции рыб в соленой воде до 40 дней приводило к восстановлению исходного значения Rf (0.52–0.63) (рис. 2а, 2б). В “остром” эксперименте помещение рыб в соленую воду также сопровождалось ростом Rf с 0.52–0.63 до 0.63–0.72.

Во всех случаях рост Rf HDL в диск-Е сопровождался следующими изменениями на 2D-электрофореграмме: 1) в неденатурирующих условиях исчезали HDL с Мг ~ 125 и 110 kDa и появлялись новые HDL с Мг ~ 85 и 60 kDa (рис. 3а, 2) а в денатурирующих условиях отмечалось смещение белковых “пятен” с Мг ~ 14 и 27 kDa справа относительно трансферрина (рис. 3б, табл. 1). При этом и 125/110 kDa- и 85/60 kDa-частицы HDL содержали одни и те же белки с Мг 14 и 27 kDa, идентифицированные как ApoA-I и Apo-14 (табл. 1). У самок и

самцов рыб различий по величинам Мг сывороточных HDL не выявлено.

#### 2.4. Структурные реорганизации HDL в ISF рыб в условиях среды обитания и эксперимента

В отличие от сыворотки крови, протеом интерстициальной жидкости был организован единообразно и в природных выборках рыб, и в эксперименте (в контрольной группе и в условиях солёности). Белки плазмы в составе ISF были представлены, в основном, минорными “пятнами” (рис. 2); и в подавляющем большинстве образцов доминировали олигомеры парвальбумина (рис. 2, табл. 1). В области HDL обнаружен ~50 kDa белок, часто “маскируемый” тетрамерным парвальбумином. В денатурирующем 2D-Е на его дорожке обнаружены “следы” 14 kDa-белка, по положению на протеомной карте и величине Мг соответствующе-



**Рис. 2.** Диск-электрофорез белков сыворотки крови карасей (фрагменты протеомов сыворотки в виде НМ-фракции) из групп “весна”, “лето”, “осень” (а) и рыб, акклимированных к пресной воде (“FW”), соленой воде (“11.5 g kg<sup>-1</sup>, 20 дней”, “11.5 g kg<sup>-1</sup>, 40 дней”) и пресной воде после 20 дней содержания в условиях критической солености (“FW<sub>revert</sub>”) (б).

го Apo-14 (рис. 2). Вероятно, нативный 50 kDa белок является олигомером (тримером) Apo-14.

### 2.5. Согласованность структурных реорганизаций HDL с распределением общего белка и HDL между BS и ISF

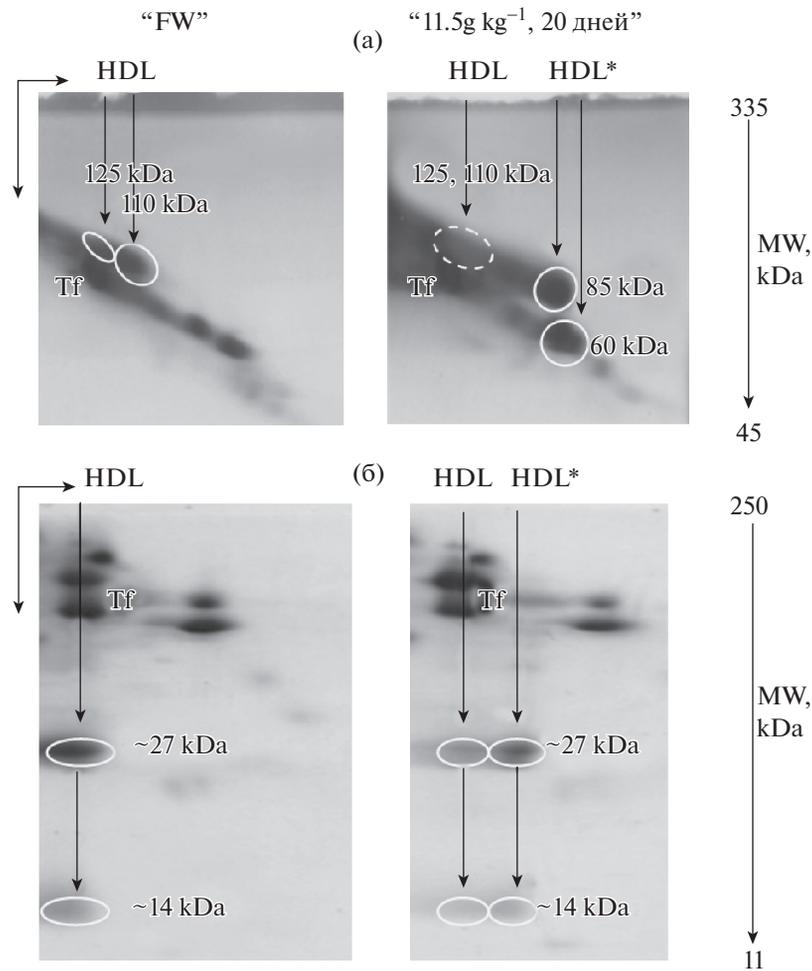
Весной и осенью величины концентраций белка в жидкостях организма были относительно стабильными, а концентрация белка в сыворотке превышала таковую в интерстициальной жидкости:  $4.44 \pm 0.32$  g% (BS) и  $2.91 \pm 0.22$  g% (ISF) весной и  $4.45 \pm 0.40$  g% (BS) и  $2.64 \pm 0.12$  g% (ISF) осенью. На фоне такого “типичного” распределения белка ( $\Delta C > 0$ ) в крови присутствовали только 125/110 kDa-формы HDL. Летом концентрация белка увеличивалась и в BS ( $5.92 \pm 0.30$  g%), и еще более существенно в ISF ( $12.99 \pm 4.44$  g%). На фоне “аномального” распределения белка ( $\Delta C < 0$ ) в крови доминировали 85/60 kDa-формы HDL (рис. 2). При этом относительное содержание HDL в BS оставалось стабильным:  $30.85 \pm 2.20\%$  (весна),  $28.40 \pm 6.09\%$  (лето) и  $26.03 \pm 3.55\%$  (осень) и не зависело от пола рыб. Так, летом относительное содержание HDL в сыворотке самок и самцов составило  $27.2 \pm 2.6\%$  и  $30.8 \pm 2.3\%$  соответственно. В интерстициальной жидкости относительное содержание HDL варьировало от “следов” (осень) до  $8.31 \pm 4.26\%$  (лето).

20-дневная экспозиция рыб в соленой воде ( $11.5$  g kg<sup>-1</sup> NaCl) практически не влияла на содержание общего белка в сыворотке и интерстициаль-

ной жидкости:  $5.10 \pm 1.60$  g% (BS) и  $0.90 \pm 0.15$  g% (ISF) в пресной воде и  $7.05 \pm 1.23$  g% (BS) и  $0.87 \pm 0.20$  g% (ISF) в соленой воде. Распределение белка на протяжении всего эксперимента оставалось “типичным” ( $\Delta C > 0$ ) и стабильным. Реорганизации HDL в сыворотке были согласованы с соленостью воды: связь проявлялась в виде перестроек HDL по типу “125/110 → 85/60 kDa” при критической солености в условиях “плавного” роста солености при 20-дневной экспозиции; последующее “распреснение” и продление экспозиции до 40 дней приводило к восстановлению “исходной” 125/110 kDa-формы HDL (рис. 2); в “остром” опыте HDL также диссоциировали по типу “125/110 → 85/60 kDa”.

После выдерживания рыб в пресной воде в течение 20 и 40 дней относительное содержание HDL в сыворотке снижалось с  $26.03 \pm 3.55\%$  до  $12.40 \pm 2.20\%$  и  $7.33 \pm 4.46\%$  соответственно; при этом снижения концентрации общего белка в сыворотке рыб не отмечалось. В условиях солености содержание HDL в сыворотке не менялось (различия недостоверны) по сравнению с соответствующими контрольными величинами, составляя  $17.65 \pm 5.32\%$  (в контроле  $12.40 \pm 2.20\%$ ) и  $9.27 \pm 9.04\%$  (в контроле  $7.33 \pm 4.46\%$ ) соответственно. В интерстициальной жидкости содержание HDL варьировало от 0.9 до 3.5%.

В интерстициальной жидкости реорганизации HDL во всех группах рыб – природных и экспериментальных – происходили единообразно по типу “125/110, 85/60 → 50 kDa”.



**Рис. 3.** Структурные реорганизации сывороточных HDL у карасей в условиях критической солёности ("11.5 g kg<sup>-1</sup>, 20 дней"): в 5–40% PAGE (a) и Ds-Na-PAGE (б) (фрагменты протеомных карт сыворотки в виде НМ-фракций). HDL\* – 85/60 kDa липопротеиновые частицы, образующиеся в ходе реорганизации исходных 125/110 kDa HDL-частиц. Пунктирным белым овалом выделена область "остаточных" 125/110 kDa HDL. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

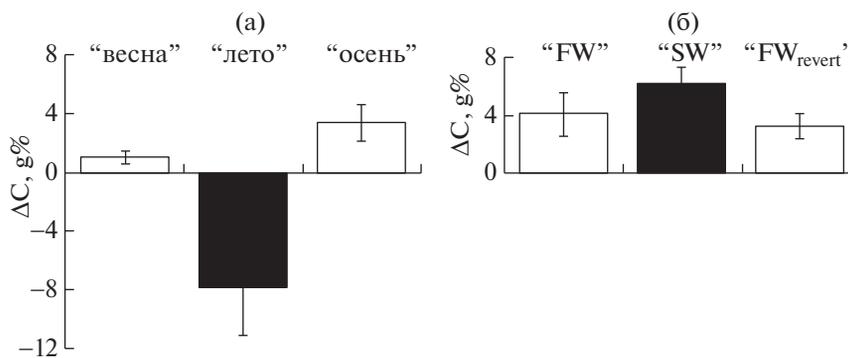
## ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружение у серебряного карася перестроек сывороточных HDL в ходе сезонной динамики и в ответ на изменение солёности среды позволяет предположить участие *ApoA* в адаптивных реакциях рыб, связанных не только с липидным обменом, но и с осморегуляцией. Данный факт отмечают и другие авторы, например, у корюшкообразной рыбы айю *Plecoglossus altivelis* при описании дифференциальной тканевой экспрессии гена *ApoA-I* в пресной и солёной воде [19].

Фактором, позволяющим рассматривать HDL-частицы в качестве участника системы поддержания осмотического гомеостаза, являются их гидрофильность, а также небольшие размеры и обилие в плазме в соответствии с уравнением Вант-Гоффа для коллоидных растворов [20]. Согласно уравнению, создаваемое белковой частицей осмотическое давление нарастает по мере снижения *Mg* и

увеличения концентрации в растворе. HDL карася удовлетворяют всем этим критериям: их гидрофильность обусловлена консервативной для всех позвоночных структурой частиц, белки на поверхности которых обращены гидрофильной областью к водной фазе [7]; их содержание в плазме стабильно высоко, а величины *Mg* и степень олигомеризации не противоречат структурным моделям HDL человека [21], размеры которых не превышают таковые у альбумина [22]. В крови других Teleostei концентрация HDL столь же высока и почти в 10 раз превышает их содержание у Mammalia [7].

Результаты работы выявили динамичные единые обратимые перестройки сывороточных HDL в ходе сезонной динамики и при адаптациях к критической солёности. Было установлено, что во всех исследованных случаях диссоциация HDL происходила при понижении, а ассоциация – при повышении концентрации общего белка во



**Рис. 4.** Согласованность структурных реорганизаций HDL с величиной градиента концентрации общего белка относительно капиллярной стенки мышечного типа ( $\Delta C$ ) в природных и экспериментальных группах карасей. Черной заливкой отмечены группы рыб, чья кровь содержит 85/60 kDa-варианты HDL; без заливки – группы рыб, кровь которых содержит 125/110 kDa – варианты HDL. “Весна”, “лето”, “осень” – природные группы рыб; “FW”, “SW” ( $11.5 \text{ g kg}^{-1} \text{ NaCl}$ ) и “FW<sub>revert</sub>” – экспериментальные группы рыб.

внечелочной жидкости относительно компартамента по другую сторону капиллярной стенки. Эти процессы, несомненно, оказывали влияние на количество осмотически активных частиц в плазме или интерстициальной жидкости. Выявленный характер связи способа перестройки HDL (диссоциация/ассоциация) с распределением общего белка относительно капиллярной стенки ( $\Delta C > 0$ ,  $\Delta C < 0$ ) свидетельствует о стратегии реорганизаций HDL на “выравнивание” осмоляльностей внечелочных жидкостей и, следовательно, на поддержание осмотического гомеостаза. Поэтому мы предполагаем, что реорганизации HDL в крови высших Teleostei можно рассматривать как альтернативный “безальбуминовый” способ стабилизации капиллярной фильтрации в организме пойкилотермных с нестабильным градиентом белка относительно капиллярной стенки. У Mammalia доминирующий в крови сывороточный альбумин реализует осмотическую активность другим способом: в условиях высокого стабильного градиента белка относительно капиллярной стенки за счет высокой плотности отрицательного заряда на поверхности глобулы он связывает неорганические катионы, удерживает воду и вследствие этого поддерживает некоторое превышение осмоляльности плазмы над интерстициальной жидкостью в соответствии с эффектом Гиббса–Доннана [23].

В эксперименте наблюдаемое во времени снижение относительного содержания HDL в крови всех рыб вне связи с соленостью (при стабильной концентрации белка в сыворотке крови), вероятно, связано с голоданием и снижением интенсивности липидного обмена. Диссоциация HDL в условиях критической солености может быть связана с влиянием повышенного содержания  $\text{Na}^+$  во внешней среде и, как следствие, в жидкой среде организма, вследствие гиперационного типа осмотического равновесия со средой у пресноводных Teleostei [24].

Распад HDL на фоне стабильного содержания белка в сыворотке рыб в условиях как пресной, так и соленой воды, несомненно, должен способствовать росту осмоляльности плазмы, что, в свою очередь, способствует поддержанию гиперосмотического типа равновесия жидкой среды организма с внешней средой, характерного для пресноводных Teleostei в переносимом ими интервале солености [24].

В природных условиях (весна, осень) распад HDL в интерстициальной жидкости на более мелкие частицы, содержащие 50 kDa-тримеры ApoA, также способствует росту осмоляльности ISF, концентрация общего белка в которой ниже, чем в плазме. Летом распад сывороточных HDL на более мелкие частицы происходит на фоне активации биосинтетических процессов под влиянием роста температуры воды в водоеме. Неблагоприятных осмотических эффектов в этом случае, вероятно, можно избежать путем “сброса” избытка белка плазмы в интерстициальную жидкость, что мы и наблюдали в июльской группе карасей. Такой “сброс”, как оказалось, не влияет на эффективность капиллярной фильтрации жидкости [25], однако, с учетом тотальной диссоциации HDL в крови, вероятно, способствует росту осмоляльности плазмы и поддержанию ее изотоничности с ISF. Данный способ стабилизации жидкой среды организма, возможно, имеет место и у низших Teleostei, сохранивших Alb в крови в концентрации, уступающей HDL. Отметим, что у некоторых их представителей альбумин ковалентно связан с углеводами [26]. Не исключено, что данное обстоятельство затрагивает поверхностные свойства глобулы Alb и, как следствие, эффективность связывания неорганических катионов, что, в конечном счете, отражается на эффекте Гиббса–Доннана [15].

Единый алгоритм реорганизаций HDL карася на верхней границе переносимого им соленостного

интервала и в период активации обменных процессов указывает, с одной стороны, на универсальный характер перестроек HDL, а с другой стороны, на их проявление в “особых” случаях отклонения обменных процессов от “средних” показателей. Так, несмотря на поддержание жизненных функций организма в условиях критической солёности, общее состояние рыб в этих условиях все-таки оценивается как несбалансированное: падение осмотического градиента между организмом и средой до минимального уровня приводит к снижению скорости диуреза, увеличению скорости питья воды и эндокринным изменениям [12]. У неполовозрелых и нерестящихся карасей диссоциация HDL происходит на фоне дисбаланса в распределении белка относительно капиллярной стенки ( $\Delta C < 0$ ). С учетом этих фактов реорганизации HDL “125/110 → 85/60 kDa” можно отнести к разряду стратегий, “запускающихся” для поддержания осмотического гомеостаза в критических или пограничных для данного вида условиях.

В последнее время отмечается повышенный интерес к HDL в связи с обнаружением в их составе более сотни белков (помимо ApoA), что позволило рассматривать HDL в качестве “платформы” для сборки белковых комплексов с новыми функциями [21]. Полученные нами сведения об HDL рыб вписываются в данную концепцию, способствуя расширению представлений о функциональных свойствах белков пойкилотермных организмов, однако, требуют, помимо описания качественного аспекта белковых перестроек, последующей количественной оценки вклада структурных преобразований липопротеинов высокой плотности в онкотическое и общее осмотическое давление плазмы. Тем не менее полученные на данном этапе работы данные позволяют рассматривать HDL в качестве универсальных регуляторов и стабилизаторов обменных процессов в организме рыб.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания АААА-А19-119102890013-3 при поддержке гранта РФФИ № 16-04-00120-а.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Levitt D., Levitt M.* Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *Int. J. Gen. Med.* 9: 229–255. 2016.
2. *Braasch I., Gehrke A.R., Smith J.J. et al.* The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparison. *Nat. Genet.* 48 (4): 427–437. 2016.
3. *Pasquier J., Cabau C., Nguyen T. et al.* Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the PhyloFish database. *BMC Genomics.* 17 (368): 1–10. 2016.
4. *Noel E.S., Reis M., Arain Z., Ober E.A.* Analysis of the Albumin/alpha-Fetoprotein/Afamin/Group specific component gene family in the context of zebrafish liver differentiation. *Gene Expr. Patterns.* 10 (6): 237–243. 2010.
5. *Metcalf V.J., Brennan S.O., George P.M.* The Antarctic toothfish (*Dissostichus mawsoni*) lacks plasma albumin and utilises high density lipoprotein as its major palmitate binding protein. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 124 (2): 147–155. 1999.
6. *Jerkovic L., Voegelé A.F., Chwatal S. et al.* Afamin is a novel human vitamin E-binding glycoprotein characterization and in vitro expression. *J. Proteome Res.* 4 (3): 889–899. 2005.
7. *Babin P.J., Vernier J.M.* Plasma lipoproteins in fish. *J. Lip. Res.* 30: 467–489. 1989.
8. *Andreeva A.M., Lamash N.E., Serebryakova M.V. et al.* Reorganization of low-molecular-weight fraction of plasma proteins in the annual cycle of cyprinidae. *Biochemistry (Moscow).* 80: 208–218. 2015.
9. *Concha M.I., Smith V.J., Castro K. et al.* Apolipoproteins A-I and A-II are potentially important effectors of innate immunity in the teleost fish *Cyprinus carpio*. *Eur. J. Biochem.* 271 (14): 2984–2990. 2004.
10. *Harel A., Fainaru M., Rubinstein M. et al.* Fish apolipoprotein-A-I has heparin binding activity: implication for nerve regeneration. *J. Neurochem.* 55 (4): 1237–1243. 1990.
11. *Andreeva A.M.* The role of structural organization of blood plasma proteins in the stabilization of water metabolism in bony fish (Teleostei). *Journal of Ichthyology.* 50 (7): 552–558. 2010.
12. *Lahlou B., Henderson I.W., Sawyer W.H.* Sodium exchanges in goldfish (*Carassius auratus* L.) adapted to a hypertonic saline solution. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 28: 1427–1433. 1969.
13. IOC, SCOR and IAPSO. The International Thermodynamic Equation of Seawater – 2010: Calculation and Use of Thermodynamic Properties. Intergovernmental Oceanographic Commission, Manuals and Guides No. 56, UNESCO, 2010.
14. *Itzhaki R.F., Gill D.M.* A micro-biuret method for estimating protein. *Anal. Biochem.* 9 (4): 401–410. 1964.
15. *Olson K.R.* Blood and extracellular fluid volume regulation: role of the renin-angiotensin system, kallikrein-kinin system, and atrial natriuretic peptides. *Fish Physiology, Part B. The Cardiovascular System / Eds. W.S. Hoar, D. J. Randall, Farrell.* San Diego (Academic Press Inc., 1992: 136–254.
16. *Andreeva A.M., Serebryakova M.V., Lamash N.E.* Oligomeric protein complexes of apolipoproteins stabilize the internal fluid environment of organism in redfish of the *Tribolodon* genus [Pisces; Cypriniformes, Cyprinidae].

- Comp. Biochem. Physiol. Part D: Genomics and Proteomics. 22: 90–97. 2017.
17. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*. 227: 680–685. 1970.
  18. *Gaal O., Medgyesi G.A., Vereczkey L.* Electrophoresis in the Separation of Biological Macromolecules. Budapest (Akadémia Kiadó), 1980.
  19. *Chen J., Shi H., Hai Q. Hu. et al.* Apolipoprotein A-I, a hyperosmotic adaptation-related protein in ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B*. 152: 196–201. 2009.
  20. *Детлаф А.А., Яворский Б.М.* Курс физики: Учебное пособие для вузов. М.: Высшая школа, 1989. [Detlaf A.A., Yavorskij B.M. Kurs fiziki: Uchebnoe posobie dlya vuzov. M.: Vysshaya shkola, 1989. (in Russ)]
  21. *Vaisar T.* Proteomics investigations of HDL: challenges and promise. *Current vascular pharmacology*. 10: 410–421. 2012.
  22. *Borhani D.W., Rogers D.P., Engler J.A., Brouillette C.G.* Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 94 (23): 12291–12296. 1997.
  23. *Nguyen M., Kurtz I.* Quantitative interrelationship between Gibbs-Donnan equilibrium, osmolality of body fluid compartments, and plasma water sodium concentration. *J. Appl. Physiol*. 100: 1293–1300. 2006.
  24. *Мартемьянов В.И.* Оценка статуса рыб по отношению к солёности среды на основе типов осмотической ионной регуляции. Труды Зоологического института РАН. Приложение № 3: 175–181. 2013. [Mar-tem'yanov V.I. Ocenka statusa ryb po otnosheniyu k solenosti sredy na osnove tipov osmoticheskoy ionnoj regul'yacii. Trudy Zoologicheskogo instituta RAN. Prilozhenie № 3: 175–181. 2013. (in Russ)]
  25. *Sarin H.* Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J. Angiogenesis Res*. 2: 1–19. 2010.
  26. *Metcalf V.J., Brennan S.O., Chambers G.K., George P.M.* The albumin of the brown trout (*Salmo trutta*) is a glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*. 1386 (1): 90–96. 1998.

## The Role of High-Density Lipoproteins in Maintaining Osmotic Homeostasis in the Goldfish *Carassius Auratus* L. (Cyprinidae)

A. M. Andreeva<sup>a, #</sup>, I. Yu. Toropygin<sup>b</sup>, D. V. Garina<sup>a</sup>, N. E. Lamash<sup>a, c</sup>, and A. S. Vasiliev<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Russia

<sup>b</sup> Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>c</sup> National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok Russia

<sup>#</sup>e-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru

A hypothesis on the involvement of high-density lipoproteins (HDL) in maintaining osmotic homeostasis in fish was proposed. For its verification, structural reorganizations of serum HDL in the goldfish *Carassius auratus* L. were investigated under natural conditions (during the seasonal dynamics) and in experiments on the effect of critical salinity. A common algorithm of HDL rearrangements in wild freshwater fish and those acclimated experimentally to critical salinity was revealed. It consists in reversible dissociation and association of HDL particles. Under natural (freshwater) conditions, this algorithm matches to the dynamics of total protein distribution relative to the capillary wall, under experimental conditions to changes in water salinity. This finding implies the possibility of implementing multiple strategies of maintaining osmotic homeostasis with the involvement of HDL in higher teleosts whose blood, in contrast to mammals, lacks a specialized osmotically active protein albumin. The role of HDL as universal metabolic regulators and stabilizers is discussed.

*Keywords:* goldfish, high-density lipoproteins, osmotic homeostasis