Труды Зоологического института РАН
Том 327, № 1, 2023, с. 98–108
10.31610/trudyzin/2023.327.1.98

УДК 574.52

Влияние осмотического стресса на концентрацию белка и активность антиоксидантных ферментов в организме девятииглой колюшки *Pungitius pungitius* (Gasterosteidae) бассейна Белого моря

А.А. Кочнева[1], Л.П. Смирнов[1], Д.А. Ефремов[1] и И.В. Суховская[1]*

[1] *Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», ул. Пушкинская, 11, 185910 Петрозаводск, Россия; e-mail: kochnevaalbina@gmail.com; levps@rambler.ru; denisefremov@list.ru; sukhovskaya@inbox.ru*

Представлена 16 октября 2022; после доработки 11 января 2023; принята 13 февраля 2023.

РЕЗЮМЕ

Жизненный цикл девятииглой колюшки *Pungitius pungitius* (Linnaeus, 1758) включает миграции из открытого моря в прибрежные и пресноводные биотопы, в ходе которых рыбы испытывают осмотический шок, провоцирующий впоследствии развитие окислительного стресса. Функцию защиты клеток от избытка образующихся активных форм кислорода, перекиси водорода и гидропероксидов выполняет сложная многоуровневая антиоксидантная система (АОС), включающая низкомолекулярные соединения и специфические ферменты. В проведённом эксперименте молодь девятииглой колюшки из эстуария реки бассейна Белого моря попеременно экспонировали в гипо- и гиперосмотичной среде для изучения ответа компонентов АОС на окислительный стресс, вызванный резкой сменой солености. Показано, что перемещение рыбы из соленой воды в пресную на 1 час и 24 часа привело к снижению концентрации водорастворимого белка и активности каталазы в тканях колюшки. Активность гваякол-зависимой пероксидазы увеличилась после последовательного выдерживания рыб из эстуария в пресной и соленой воде по 24 часа. Не выявлены изменения в активности супероксиддисмутазы и глутатион S-трансферазы при изученных воздействиях. Участие ферментов АОС (в частности, усиление реакции обезвреживания перекиси водорода по пероксидаза-зависимому пути) в реакции на резкую смену солености окружающей среды *P. pungitius* из Белого моря описано впервые. Результаты нашего исследования дополняют немногочисленные сведения об ответе АОС эвригалинных видов рыб на гипо- и гиперосмотический стресс. Полученные данные могут быть использованы при прогнозировании возможности промышленного разведения рыб в Беломорско-Баренцевоморском бассейне.

Ключевые слова: антиоксидантная система, Белое море, девятииглая колюшка, *Pungitius pungitius*, соленость, осмотический стресс, эвригалинный вид

Effect of osmotic stress on protein concentration and antioxidant enzymes activity in the organism of nine-spined stickleback *Pungitius pungitius* (Gasterosteidae) from the White Sea Basin

A.A. Kochneva[1], L.P. Smirnov[1], D.A. Efremov[1] and I.V. Sukhovskaya[1]*

[1] *Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya str. 11, 185910 Petrozavodsk, Russia; e-mail: kochnevaalbina@gmail.com; levps@rambler.ru; denisefremov@list.ru; sukhovskaya@inbox.ru*

Submitted October 16, 2022; revised January 11, 2023; accepted February 13, 2023.

* Автор-корреспондент / Corresponding author.

ABSTRACT

The life cycle of *P. pungitius* (Linnaeus, 1758) includes migrations from the open sea to coastal and freshwater biotopes which are accompanied by osmotic shock and following oxidative stress in fish. The complex multilevel antioxidant system (AOS) includes low-molecular compounds and specific enzymes and protects cells from reactive oxygen species, hydrogen peroxide, and hydroperoxides generated in excess. To study the response of AOS components to oxidative stress caused by acute salinity changes, nine-spined stickleback juveniles from the White Sea estuary were alternately exposed to hypo- and hyperosmotic conditions. In the tissues of stickleback transferred from saltwater to freshwater for 1 and 24 hours a decrease in water-soluble protein concentration and catalase activity was shown. The increased guaiacol-dependent peroxidase activity in estuary fish successively exposed to fresh and saltwater for 24 hours was also observed. Under studied exposures, no changes in the activities of superoxide dismutase and glutathione S-transferase were detected. The involvement of AOS enzymes, particularly neutralizing hydrogen peroxide by the peroxidase-dependent pathway, in the response to acute changes in ambient salinity was described in White sea *P. pungitius* for the first time. The results of our study provide the new data on the AOS response to hypo- and hyperosmotic stress in euryhaline fish species. The obtained data could be used in predicting the possibility of industrial fish farming in the White Sea-Barents basin.

Key words: antioxidant system, White Sea, nine-spined stickleback, *Pungitius pungitius*, salinity, osmotic stress, euryhaline species

ВВЕДЕНИЕ

Соленость воды является важным абиотическим фактором, лимитирующим распространение гидробионтов. Резкая смена солености вызывает у водных организмов осмотический стресс, который может стать причиной нарушения физиологического и иммунного статуса организма (Merilä 2013; Kültz 2015; Xu et al. 2018). Однако эвригалинные виды рыб способны заселять биотопы различной солености, поскольку имеют биохимические и физиологические адаптационные механизмы обеспечения гомеостаза при осмотическом дисбалансе (Fiol and Kültz 2007; Gonzalez 2012). У пресноводных костистых рыб поддержание осмотического баланса осуществляется за счет сопротивления пассивной потере соли путем активного поглощения или пассивного накопления воды с последующим выделением разбавленной мочи. В свою очередь, у морских костистых рыб механизм сохранения осмотического гомеостаза заключается в активном выделении соли и задержании воды за счет увеличения количества питья, реабсорбции воды в кишечнике и снижения осмотической проницаемости жаберного эпителия (Laverty and Skadhauge 2012; Kültz 2015). В регуляции экспрессии генов, которые отвечают за адаптацию к осмотическому стрессу, принимают участие внутриклеточные осмосенсорные сигнальные пути, включающие различные осморецепторы и сигнальные молекулы (ионные каналы, кальций-чувствительный рецептор, фосфолипаза A2, рецепторы цитокинов, белки, непосредственно регулируемые неорганическими катионами, белки цитоскелета, митоген-активируемые протеинкиназы, белок 14-3-3 и другие), а также сигнальные пути, опосредованные гормонами и паракринными факторами (Fiol and Kültz 2007; Kültz 2015). Поддержание осмотического баланса в организме сопровождается ускорением энергетических процессов, что приводит к накоплению активных форм кислорода (АФК), вызывающих окислительный стресс и нарушение общих физиологических функций (Arun and Subramanian 1998; Shin et al. 2010; Gan et al. 2016; Bal et al. 2021; Shukry et al. 2021). Антиоксидантная система (АОС) нейтрализует избыток АФК, тем самым предотвращая повреждение макромолекул и структур организма результате окислительного стресса. АОС представляет собой сложную многоуровневую систему, которая состоит из низкомолекулярных антиоксидантов (витамины A, E, глутатион и др.) и комплекса специфических ферментов, таких как супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), группа пероксидаз (Px) и глутатион S-трансфераза (GST) и другие.

Девятииглая колюшка *Pungitius pungitius* Linnaeus, 1758 – циркумполярный эвригалинный вид, широко распространенный в арктическом регионе России. Жизненный цикл *P. pungitius* включает нерестовые миграции популяций

из открытого моря в прибрежные и пресноводные биотопы. Девятииглая колюшка, наряду с родственным видом – трехиглой колюшкой *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758, является модельным объектом для эволюционных, генетических, поведенческих и экологических исследований (Kuparinen et al. 2011; Aikio 2013; Merilä 2013; Bruneaux et al. 2014; Makaras and Stankevičiūtė 2022), включая механизмы приспособительных реакций, характеризующих развитие окислительного стресса, вызванного осмотическим шоком. У эвригалинных видов рыб, в том числе колюшек, ответ компонентов АОС на окислительный стресс, вызванный резкой сменой солености, имеет, по всей видимости, свои особенности, еще недостаточно изученные. Ранее показано, что при повышении солености воды в жабрах морских и пресноводных популяций трехиглой колюшки наблюдается изменение экспрессии трех осморегуляторных генов, таких как Na+/K+-АТРаза (ATPA13), трансмембранный регулятор муковисцидоза (CFTR) и ген потенциал-зависимого калиевого канала (KCNH4), и одного гена белка теплового шока (HSP70) (Taugbøl et al. 2014). Экспрессия гена ATP1A3 увеличивалась у пресноводной формы колюшки, адаптированной к морской воде, а экспрессия KCNH4 и HSP70 – у морских особей, помещенных в пресную воду. У молоди оливковой камбалы *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel, 1846), которая подвергалась воздействию различной солености (морская вода, 16, 8, 4, 2 и 0 ‰) в течение двух недель, выявлено изменение активности ферментов АОС, а именно – повышение активности SOD и GST. Также в печени рыб повышался уровень восстановленного глутатиона (GSH), тогда как в жабрах выявлено его снижение (Kim et al. 2021). У другого эвригалинного вида костистых рыб, желтопёрого морского леща *Acanthopagrus latus* (Houttuyn, 1782), был изучен ответ системы осморегуляции, иммунитета и АОС в жабрах, печени и мышцах на гипоосмотический стресс при экспонировании рыб в пресной (0 ppt), слабоминерализованной (3 ppt) и солоноватой воде (6 ppt) в течение 8 дней. Выявленные дифференциально экспрессирующиеся гены связаны с осморегуляцией и Т-клеточным иммунитетом. Из исследуемых тканей жабры оказались наиболее чувствительными к осмотическому шоку, что отражалось в повышении активности Na+K+-АТФазы; в печени по изменению активности ферментов SOD, CAT и содержанию малонового диальдегида отмечались признаки окислительного стресса (Lin et al. 2020). Путем осморегуляции поддерживается баланс воды и белка в тканях рыб, при нарушении которого развивается избыточная гидратация тканей, особенно мышечной, и, как следствие, снижение содержания белка. Осмотическое давление клеток у эвригалинных видов рыб стабилизируется, в том числе, путем гидролиза белков и генерации аминокислот-осмолитов. Таким образом, адаптационные биохимические механизмы ответа рыб на осмотический стресс и его влияние на другие защитные системы организма, в том числе на антиоксидантную, до конца не изучены.

Цель работы заключалась в изучении влияния гипо- и гиперосмотического стресса на активность ферментов АОС (SOD, CAT, Px и GST) и концентрацию водорастворимого белка в тканях молоди девятииглой колюшки *P. pungitius*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала и дизайн эксперимента

Объектом исследования служила молодь девятииглой колюшки *P. pungitius*. Сбор биологического материала проводили в июне 2021 г., в эстуарии р. Индёра бассейна Белого моря (66°14’29.42” N, 37°08’33.72” E), на участке реки с глубинами 15–25 см и скоростью течения 0.0–0.1 м/с. Визуально находили косяк колюшек и подхватывали рыбу сачком диаметром 30 см, с ячеей 5х5 мм. Выловленную рыбу помещали в емкость объемом 10 л, в которой транспортировали колюшку к месту проведения эксперимента. Перед началом эксперимента часть рыб была зафиксирована для использования в качестве контроля (Группа 1/Контроль (18–22 ‰)).

Основным местом обитания исследуемой девятииглой колюшки является эстуарий реки, где активно выражены приливно-отливные процессы, в связи с чем суточная соленость воды колеблется от морской соленой до речной пресной. Для приведения рыб к единому стрессовому состоянию и снижению разнокачественности выборки провели последова-

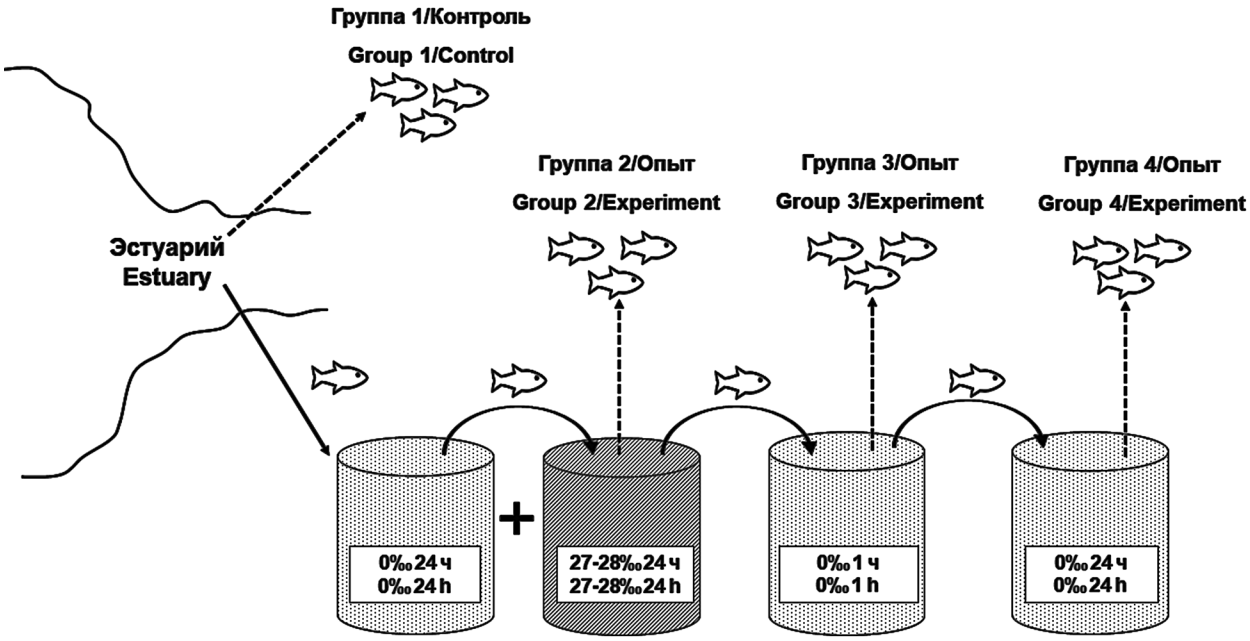

Рис. 1. Схема эксперимента.

Fig. 1. Scheme of the experiment.

тельную смену режима солености. Для этого колюшку, оставшуюся после отбора контроля, поместили в бочки с пресной водой (0‰) на 24 часа, а затем перенесли в бочки с морской водой (27–28‰) на 24 часа. По окончании данного этапа отобрали и зафиксировали часть образцов (Группа 2/Опыт).

Оставшуюся после предыдущего опыта рыбу (Группа 2), пересадили в емкости с пресной водой и провели фиксацию проб через 1 час (Группа 3/Опыт) и через 24 часа (Группа 4/Опыт). На Рис. 1 представлена схема проведенного эксперимента. Бочки, в которых содержалась рыба, в ходе экспонирования находились в реке для поддержания в них постоянной температуры воды (16–17° C). По окончании каждого из этапов эксперимента девятииглую колюшку (целиком) фиксировали в жидком азоте и доставляли в лабораторию, где хранили при температуре –80° C до дня проведения биохимического анализа.

Для анализа выборки колюшки были нормализованы по размерно-весовым характеристикам: среднее значение длины рыб (AB) составляло 2.44±0.07 см, среднее значение массы тела – 0.098±0.08 г.

Биохимический анализ

В день проведения анализа пробы колюшки (целый организм без разделения на органы) гомогенизировали с помощью Digital Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc., USA) в 50 мМ буферном растворе Трис-HCl pH 7.5 при 5-кратном разбавлении и центрифугировали при 45 000 g в течение 1 часа при 4° C на центрифуге Allegra 64R (Beckman Coulter Inc., США). Полученный супернатант использовали для дальнейшего биохимического анализа.

Концентрацию водорастворимого белка (мг белка/мл гомогената) определяли спектрофотометрическим методом по поглощению пептидной связи при длине волны 220 нм (Noble and Bailey 2009; Суховская и др. [Sukhovskaya et al.] 2010). Для построения калибровочного графика в день анализа готовили растворы бычьего сывороточного альбумина различной концентрации (0.02–0.1 мг/мл) в буферном растворе 50 мМ трис-HCl pH 7.5.

Активность супероксиддисмутазы (SOD) определяли спектрофотометрически по модифицированной методике, основанной на способности фермента тормозить аутоокисление адреналина в щелочной среде (Fridovich 1975). Для измерения активности фермента к супернатанту добавляли 0.3 М карбонатного буфера pH 10.6 и 0.022 М раствор адреналина в 0.1 Н HCl и регистрировали изменение оптической плотности раствора в течение 1 минуты при 480 нм. Единицы относительной активности SOD выражали в условных единицах, которые представляют 50% ингибирования скорости реакции при максимальном увеличении абсорбции за минуту на прямолинейном участке образования адренохрома, пересчитанной на концентрацию белка ткани (усл.ед./мг белка*мин$^{-1}$).

Активность каталазы (CAT) определяли спектрофотометрическим методом по изменению оптической плотности анализируемого раствора при распаде перекиси водорода (Beers and Sizer 1952). К супернатанту добавляли реакционную смесь (25 мМ перекиси водорода в 50 мМ буфере Трис-HCl pH 7.5) и измеряли изменение оптической плотности раствора при длине волны 240 нм. Относительную активность CAT выражали в μM H_2O_2, катаболизированной ферментом за минуту, пересчитанное на концентрацию белка в ткани (μM H_2O_2/мг белка*мин$^{-1}$).

Активность гваякол-зависимой пероксидазы (Px) определяли спектрофотометрическим методом (Chance and Maehly 1955). Измерение активности фермента проводили при длине волны 470 нм в течение 1 минуты после добавления к супернатанту реакционной смеси (10 мМ гваякола и 25 мМ перекиси водорода). Относительную активность Px выражали в μM продукта реакции, пересчитанного на концентрацию белка в ткани (μM продукта реакции/мг белка*мин$^{-1}$).

Активность глутатион S-трансферазы (GST) определяли по скорости связывания восстановленного глутатиона (GSH) с субстратом 1-хлор-2,4-динитробензолом (CDNB) (Habig 1974). Измерение проводили при длине волны 340 нм в течение минуты, после добавления к супернатанту реакционной смеси (1 мМ CDNB, 1 мМ GSH, 0.125 М фосфатный буфер pH 6.5). Относительную активность GST выражали в μM продукта реакции, пересчитанного на концентрацию белка в ткани (μM продукта реакции/мг белка*мин$^{-1}$).

Определение всех биохимических показателей проводили на планшетном ридере CLARIOstar Basic Unit (BMG Labtech, Germany) при 25° C.

Статистический анализ

Статистический анализ проведен с использованием программ R (R Core Team 2020) и RStudio (RStudio Team 2019). Сравнительный анализ биохимических показателей в тканях колюшки из анализируемых групп проводили с использованием попарного теста Вилкоксона с поправкой на множественное сравнение Бонферрони при p-value≤0.05 и q-value≤0.05 (пакет ‘stats’ для R (R Core Team 2020)).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспонирование рыб попеременно в пресной и соленой воде в течение двух суток (Группа 2/Опыт) не привело к значимому снижению концентрации растворимого белка по сравнению с контролем в тканях колюшки, хотя некоторая динамика (p-value =0.07) данного показателя отмечается у рыб этой группы. Последующее перемещение колюшек на 1 час в пресную воду вызвало достоверное снижение в 1.5 раза концентрации водорастворимого белка в тканях колюшки (Группа 3/Опыт) по сравнению с контролем (Табл. 1). Дальнейшее пребывание рыб в пресной воде не повлияло на этот показатель, он оставался стабильным в течение следующих 24 часов у молоди, находящейся в пресной воде (Группа 4/Опыт). Активность ферментов SOD и GST в тканях колюшки оставалась постоянной во всех исследованных группах. Наиболее лабильным ферментом в условиях смены режима солености оказалась CAT, активность которой уменьшилась в 2 раза у рыб 3 и 4 опытных групп по сравнению с контролем. Активность гваякол-зависимой пероксидазы увеличилась в 2 раза у *P. pungitius* из группы 2 по сравнению с контролем в ответ на перемещение рыбы из соленой в пресную воду. При последующем экспонировании рыб в пресной воде достоверно значимого изменения активности Px не обнаружено.

Таблица 1. Активность ферментов АОС и концентрация водорастворимого белка в тканях девятииглой колюшки при смене солености воды.

Table 1. AOS parameters and water-soluble protein concentration in the nine-spined stickleback tissues during changes in water salinity.

Показатель / Группа Parameter / Group	1 (Контроль) 1 (Control)	2 (Опыт) 2 (Experiment)	3 (Опыт) 3 (Experiment)	4 (Опыт) 4 (Experiment)
Концентрация белка (мг белка/мл гомогената) Protein concentration (mg protein/ml homogenate)	61.59±4.28 n=7	44.54±3.00 n=7	39.78±1.81[a] n=6	42.40±2.64[a] n=8
Активность SOD (усл.ед./мг белка*мин$^{-1}$) SOD activity (units/mg protein*min^{-1})	0.53±0.13 n=5	1.38±0.73 n=7	1.43±0.74 n=4	1.84±1.06 n=8
Активность CAT (μM H2O2/мг белка*мин$^{-1}$) CAT activity (μM H_2O_2/mg protein*min^{-1})	0.44±0.06 n=6	0.31±0.05 n=7	0.22±0.03[a] n=5	0.22±0.04[a] n=8
Активность Px (nM продукта реакции/мг белка*мин$^{-1}$) Px activity (nM reaction product/mg protein*min^{-1})	0.13±0.05 n=6	0.25±0.04[a] n=7	0.17±0.02 n=6	0.23±0.03 n=8
Активность GST (μM продукта реакции/мг белка*мин$^{-1}$) GST activity (μM reaction product/mg protein*min^{-1})	7.44±1.4 n=7	7.69±2.59 n=5	11.95±1.23 n=5	10.36±3.40 n=7

Данные в таблице представлены как медиана±межквартильный размах. Соленость воды в анализируемых группах: эстуарий – 18–22‰, пресная вода – 0‰, соленая вода – 27–28‰.
Группы образцов: 1 (Контроль) – рыбы из эстуария; 2 (Опыт) – рыбы из эстуария, помещенные сначала в пресную воду на 24 ч, затем в соленую воду на 24 ч; 3 (Опыт) – рыбы из группы 2, помещенные в пресную воду на 1 ч; 4 (Опыт) – рыбы группы 3, помещенные в пресную воду еще на 24 ч.
a – отличия значимы относительно контроля (Группа 1/Контроль) при p-value≤0.05; n – объем выборки.

The data are presented as median±interquartile range. Water salinity in the analyzed groups: estuary – 18–22‰, freshwater – 0‰, salt water – 27–28‰.
Sample groups: 1 (Control) – fish from the estuary; 2 (Experiment) – fish from the estuary, placed first in fresh water for 24 hours, and then in salt water for 24 hours; 3 (Experiment) – fish from group 2, placed in fresh water for 1 hour; 4 (Experiment) – fish of group 3, placed in fresh water for another 24 hours.
a – differences are significant compared to the control (Group 1/Control) at p-value≤0.05; n – sample size.

ОБСУЖДЕНИЕ

Абиотические и биотические факторы водной среды, такие как загрязнители, гидрохимический состав, температура воды, болезни, алиментарные нарушения, могут оказывать влияние на биохимические системы в организме рыб (Lohner et al. 2001; Francis and Nagarajan 2013). В частности, изменение физических или химических параметров среды их обитания приводит к развитию стресса, в том числе оксидативного, нарушающего ферментативные и иммунные процессы (Sinha et al. 2018). Для оценки стресс-индуцированных перестроек, помимо гормональных, иммунных и метаболических маркеров, используют показатели АОС (Kavitha et al. 2010).

В нашем исследовании снижение концентрации белка в тканях молоди колюшки отмечено уже через 1 час после пересадки рыб из соленой (Группа 2/Опыт) в пресную воду, и она оставалась неизменной в следующие 24 часа (Группа 3/Опыт и Группа 4/Опыт). Основной причиной снижения концентрации белка может являться увеличение количества воды в организме рыб при снижении солености, что необходимо для поддержания осмотического баланса. Интересно, что эта реакция проявляется достаточно быстро, уже в течение 1 часа обнаруживаются изменения, которые сохраняются на протяжении последующих 24 часов. Ранее показано, что при окислительном стрессе, вызванном нарушением осмотического баланса, происходит накопление избыточного количества АФК, что приводит к деградации пептидных связей в белках, окислению различных макромолекул, и в итоге является причиной метаболической дисфункции и даже гибели клеток (Lushchak 2011; Shakir et al. 2014; Giang et al. 2018). Осмотический стресс вызывает быстрые изменения размера клетки в зависимости от типа стрессового воздействия (гипо- или гиперосмотического) и нарушает взаимодействие белков цитоскелета с мембранами, что может отражаться на концентрации белка (Nepal and Fabrizio, 2020). Например, уменьшение концентрации белка в плазме

крови при осмотическом шоке, вызванном перемещением рыб из пресной воды в соленую (10‰), выявлено у стеногалинного сома *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Mattioli et al. 2020). Снижение соотношения количества белка к содержанию воды и липидов наблюдалось у пресноводного голубого сома *Ictalurus furcatus* Valenciennes, 1840 при выдерживании его в воде с соленостью 10‰ (Nepal and Fabrizio, 2020). Распад белка также может быть обусловлен отсутствием питания колюшки при проведении эксперимента, так как молодь рыб более чувствительна к голоданию по сравнению со взрослыми особями (Jafari et al. 2018).

В тканях молоди колюшки не отмечено значимых различий в активности SOD между вариантами эксперимента, хотя этот фермент играет решающую роль в снижении уровня окислительного стресса, превращая супероксид (один из основных прооксидантов в клетке) в молекулу кислорода и пероксида водорода. Большое количество литературных источников утверждает, что повышение активности SOD является индикатором окислительного стресса (Chen et al. 2007). Увеличение активности данного фермента наблюдали в тканях молоди пятнистого угря *Anguilla marmorata* Quoy, Gaimard, 1824 в процессе адаптации рыб к смене солености воды при перемещении из пресной в солоноватую воду (10‰) и снижение при перемещении из пресной в соленую воду (25‰), что указывает на снижение адаптивных способностей организма во втором случае (Wang et al. 2016). Несмотря на то, что нами не было выявлено достоверных различий в активности SOD между анализируемыми группами колюшки в связи с высокими значениями вариации данных в выборках, можно отметить рост данного показателя в ходе эксперимента.

Активность каталазы снижалась у особей колюшки, экспонированных в пресной воде, относительно контроля (Группа 3/Опыт и Группа 4/Опыт). При этом уменьшение активности произошло уже через 1 час экспозиции, что является достаточно быстрым ответом. Предположительно, причины таких изменений могут быть связаны с переключением системы утилизации H_2O_2 на другие ферменты, а также с замедлением белкового обмена, возникающего при осмотическом стрессе (Lesser 2006). Известно, что ответная реакция каталазы на осмотический стресс у различных видов рыб отличается. Так, при выдерживании молоди серебристого пампа *Pampus argenteus* Euphrasén, 1788 в соленой воде (25‰), которая соответствует условиям естественного обитания данного вида, активность CAT в мышцах рыб была стабильна на протяжении 120 часов, но при экспонировании рыб в воде с соленостью 10‰ активность каталазы повышалась с увеличением длительности экспозиции (Yin et al. 2011). У проходного эвригалинного вида осетра *Acipenser naccarii* Bonaparte, 1836 наблюдалось снижение активности каталазы в печени при постепенном увеличении солености воды от 15‰ до 35‰ (Martínez-Alvarez et al. 2002). Недостаток корма также может вызывать прооксидантные эффекты и истощать запасы антиоксидантов в организме рыб (Guderley et al. 2003; Pascual et al. 2003). При окислительном стрессе повышается концентрация АФК, что приводит к нарушению функционирования белков, в том числе к ингибированию антиоксидантных ферментов, что может быть причиной снижения активности каталазы (Valko et al. 2006; Heink et al. 2013).

Для оценки состояния антиоксидантной системы важно учитывать взаимосвязь работы CAT и SOD, для которых характерно явление перекрестной регуляции ферментативной активности. На фоне статистически значимого снижения активности каталазы наблюдалось повышение активности SOD, которое не было достоверным из-за высокой вариации данных в выборках. Супероксидный радикал ингибирует каталазу, а перекись водорода – активирует, в отношении SOD описан обратный эффект, а именно – перекись водорода ингибирует, а супероксидный радикал активирует этот фермент (Pigeolet et al. 1990). Для стабильного функционирования компонентов АОС важен баланс между активностью SOD и CAT, поскольку снижение активности CAT приводит к накоплению перекиси водорода. H_2O_2 является сильным окислителем, который дает начало очень активному OH-радикалу, и при дефиците CAT высокая активность SOD может привести к деструктивным процессам (Меньшикова и др. [Men'shikova et al.] 2006).

Гваякол-зависимая пероксидаза в нашем эксперименте проявила себя как более лабильный

показатель, который быстро реагирует на изменения окружающей среды. Более низкие значения активности Px в первой точке сбора проб, возможно, являются реакцией на хендлинг. Интересно отметить, что для девятииглой и трехиглой колюшек показан сходный ответ компонентов АОС на изменение условий окружающей среды, выражающийся в увеличении активности Px при снижении активности CAT, либо отсутствии реакции последней (Смирнов и др. [Smirnov et al.] 2019). Пероксидаза, как и каталаза, катализирует расщепление H_2O_2, но в меньшей степени. При этом перекись водорода может ингибировать пероксидазу, а для ее обратной активации необходимы восстановители, которые защищают фермент от инактивации (Arnao et al. 1990).

GST принимает участие во II фазе биотрансформации ксенобиотиков, а также в процессах детоксикации перекиси водорода, которая накапливается в организме в результате ее преобразования из АФК под действием SOD (Strange et al. 2001). Таким образом, можно говорить об антиоксидантных свойствах этого фермента. Ранее отмечалось, что в жабрах и печени тиляпии *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 экспрессия гена GST увеличивалась при повышении солености от 6 до 16‰ и снижалась при солености 20 ‰ по сравнению с 16‰ (El-Leithy et al. 2019). У креветок *Crangon crangon* Linnaeus, 1758 ни температура, ни соленость не оказывали влияния на активность фермента (Menezes et al. 2006).

Полученный нами результат согласуется с исследованием Менезес и коллег (Menezes et al. 2006). Несмотря на то, что медиана активности GST у рыб, помещенных в пресную воду, была в 1.6 раза выше, чем у колюшек, содержавшихся в соленой воде, различия статистически недостоверны из-за высокой вариабельности этого показателя у отдельных особей, что свидетельствует об отсутствии выраженной реакции GST колюшки на изменение солености водной среды.

Также необходимо отметить, что, несмотря на действие сопутствующих эксперименту факторов (отсутствия питания, хендлинга), особи колюшки не погибли при резкой смене солености – определяющей гидрохимической характеристики. Этот факт может свидетельствовать о широком диапазоне адаптивных возможностей девятииглой колюшки к осмотическому стрессу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено влияние гипо- и гиперосмотического стресса на активность ферментов АОС (супероксиддисмутазы, каталазы, гваякол-зависимой пероксидазы, глутатион S-трансферазы) и концентрацию водорастворимого белка в тканях молоди девятииглой колюшки *P. pungitius* с целью выявления биохимических механизмов адаптационных реакций эвригалинных рыб на резкую смену солености воды. Обнаружено изменение концентрации водорастворимого белка, активности каталазы и гваякол-зависимой пероксидазы в тканях молоди девятииглой колюшки при последовательном экспонировании рыб в пресной и соленой воде в течение двух и трех суток. Наблюдаемые реакции колюшки на осмотический стресс – усиление деградации тканевых белков и изменение ферментативных реакций обезвреживания перекиси водорода, способствующие выживанию особей – описаны у колюшки *P. pungitius* Белого моря впервые. Результаты исследования дополняют имеющиеся знания об адаптации АОС эвригалинных видов рыб к условиям осмотического стресса, который они испытывают в ходе жизненного цикла. Полученные данные могут быть использованы для оценки возможности промышленного разведения рыб в Беломорско-Баренцевоморском бассейне.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (ЦКП КарНЦ РАН) при финансовой поддержке ГЗ КарНЦ РАН FMEN-2022-0006 (№ г.р.122032100052-8).

ЛИТЕРАТУРА

Aikio S., Herczeg G., Kuparinen A. and Merilä J. 2013. Optimal growth strategies under divergent predation pressure. *Journal of fish biology*, **82**(1): 318–331. https://doi.org/10.1111/jfb.12006

Arnao M.B., Acosta M., del Río J.A. and **García-Cánovas F. 1990.** Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1038**(1): 85–9. https://doi.org/10.1016/0167-4838(90)90014-7

Arun S. and Subramanian P. 1998. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **121**(3): 273–277. https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10100-1

Bal A., Panda F., Pati S.G., Das K., Agrawal P.K. and Paital B. 2021. Modulation of physiological oxidative stress and antioxidant status by abiotic factors especially salinity in aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **241**: 108971. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108971

Beers R.F. and Sizer I.W. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of biological chemistry*, **195**: 133–140. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)50881-x

Bruneaux M., Nikinmaa M., Laine V.N., Lindström K., Primmer C.R. and Vasemägi A. 2014. Differences in the metabolic response to temperature acclimation in nine-spined stickleback (*Pungitius pungitius*) populations from contrasting thermal environments. *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology*, **321**(10): 550–565. https://doi.org/10.1002/jez.1889

Chance B. and Maehly A.C. 1955. Assay of Catalase and Peroxidase. *Methods in Enzymology*, **2**: 764–775. http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8

Chen J., Mai K., Ma H., Wang X., Deng D., Liu X. and Tan B. 2007. Effects of dissolved oxygen on survival and immune responses of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston). *Fish & Shellfish Immunology*, **22**(3): 272–281. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.06.003

El-Leithy A.A.A., Hemeda S.A., El Naby W.S.H.A., El Nahas A.F., Hassan S.A.H., Awad S.T., El-Deeb S.I. and Helmy Z.A. 2019. Optimum salinity for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and mRNA transcripts of ion-regulation, inflammatory, stress- and immune-related genes. *Fish Physiology and Biochemistry*, **45**(4): 1217–1232. https://doi.org/10.1007/s10695-019-00640-7

Fiol D.F. and Kültz D. 2007. Osmotic stress sensing and signaling in fishes. *The FEBS journal*, **274**(22): 5790–5798. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06099.x

Francis R. and Nagarajan K. 2013. Histopathological changes in the muscle tissue of the fish *Clarias Batrachus* exposed to untreated and treated sago effluent. *Advances in Bioscience and Bioengineering*, **1**(2): 74–80.

Fridovich I. 1975. Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, **44**: 147–159. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.44.070175.001051

Gan L., Xu Z.X., Ma J.J., Xu C., Wang X.D., Chen K. and Li E.C. 2016. Effects of salinity on growth, body composition, muscle fatty acid composition, and antioxidant status of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, **32**(2): 372–374. https://doi.org/10.1111/jai.12997

Giang P.T., Sakalli S., Fedorova G., Tilami S.K., Bakal T. and Najmanova L. 2018. Biomarker response, health indicators, and intestinal microbiome composition in wild brown trout (*Salmo trutta m. fario* L.) exposed to a sewage treatment plant effluent dominated stream. *Science of The Total Environment*, **625**: 1494–1509. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.020

Gonzalez R.J. 2012. The physiology of hyper-salinity tolerance in teleost fish: a review. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, **182**(3): 321–329. https://doi.org/10.1007/s00360-011-0624-9

Guderley H., Lapointe D., Bedard M. and Dutil J.D. 2003. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **135**(2): 347–356. https://doi.org/10.1016/s1095-6433(03)00089-8

Habig W.H., Pabst M.J. and Jakoby W.B. 1974. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of biological chemistry*, **249**: 7130–7139. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8

Heink A.E., Parrish A.N., Thorgaard G.H. and Carter P.A. 2013. Oxidative stress among SOD-1 genotypes in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Aquatic Toxicology*, **144-145**: 75–82. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.032

Jafari N., Falahatkar B. and Sajjadi M.M. 2018. Growth performance and plasma metabolites in juvenile Siberian sturgeon *Acipenser baerii* (Brandt, 1869) subjected to various feeding strategies at different sizes. *Fish Physiology and Biochemistry*, **44**: 1363–1374. https://doi.org/10.1007/s10695-018-0527-8

Kavitha C., Malarvizhi A., Kumaran S.S. and Ramesh M. 2010. Toxicological effects of arsenate exposure on hematological, biochemical and liver transaminases activity in an Indian major carp, *Catla catla. Food and Chemical Toxicology*, **48**: 2848–2854. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.017

Kim J.H., Jeong E.H., Jeon Y.H., Kim S.K. and Hur Y.B. 2021. Salinity-mediated changes in hematological parameters, stress, antioxidant responses, and acetylcholinesterase of juvenile olive flounders (Paralichthys olivaceus). *Environmental Toxicology and*

Pharmacology, **83**: 103597. https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103597

Kültz D. 2015. Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress. *Journal of Experimental Biology*, **218**: 1907–1914. https://doi.org/10.1242/jeb.118695

Kuparinen A., Cano J. M., Loehr J., Herczeg G., Gonda A. and Merilä J. 2011. Fish age at maturation is influenced by temperature independently of growth. *Oecologia*, **167**(2), 435–443. https://doi.org/10.1007/s00442-011-1989-x

Laverty G. and Skadhauge E. 2012. Adaptation of teleosts to very high salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. **163**: 1–6. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.05.203

Lesser M.P. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology*, **68**: 253–78. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001

Lin G., Zheng M., Gao D., Li S., Fang W., Huang J., Xie J., Liu J., Liu Y., Li Z. and Lu J. 2020. Hypoosmotic stress induced tissue-specific immune responses of yellowfin seabream (Acanthopagrus latus) revealed by transcriptomic analysis. *Fish & Shellfish Immunology*, **99**: 473–482. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.028

Lohner T.W., Reash R.J. and Williams M. 2001. Assessment of tolerant sunfish populations (Lepomis sps.) inhabiting selenium-laden coal ash effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **50**: 217–224. https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2098

Lushchak V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, **101**(1): 13–30. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006

Makaras T. and Stankevic˘iu¯te˙ M. 2022. Swimming behaviour in two ecologically similar three-spined (*Gasterosteus aculeatus* L.) and nine-spined sticklebacks (*Pungitius pungitius* L.): a comparative approach for modelling the toxicity of metal mixtures. *Environmental science and pollution research international*, **29**(10): 14479–14496. https://doi.org/10.1007/s11356-021-16783-1

Martínez-Alvarez R.M., Hidalgo M.C., Domezain A., Morales A.E., García-Gallego M. and Sanz A. 2002. Physiological changes of sturgeon Acipenser naccarii caused by increasing environmental salinity. *The Journal of experimental biology*, **205**(Pt 23): 3699–3706. https://doi.org/10.1242/jeb.205.23.3699

Mattioli C.C., Takata R., de Oliveira Paes Leme F., Costa D.C. and Luz R.K. 2020. Response of juvenile *Lophiosilurus alexandri* to osmotic and thermic shock. *Fish Physiology and Biochemistry*, **46**: 51–61. https://doi.org/10.1007/s10695-019-00696-5

Menezes S., Soares A.M.V.M., Guilhermino L. and Peck M.R. 2006. Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: Temperature, salinity and handling stress effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **335**: 114–122. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.03.009

Men'shikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., Bondar' I.A., Krugovyh N.F. and Trufakin V.A. 2006. Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants. Slovo, Moskow, 556 p. [In Russian].

Merilä J. 2013. Nine-spined stickleback (*Pungitius pungitius*): an emerging model for evolutionary biology research. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1289**: 18–35. https://doi.org/10.1111/nyas.12089

Nepal V. and Fabrizio M.C. 2020. Sublethal effects of salinity and temperature on non-native blue catfish: Implications for establishment in Atlantic slope drainages. *PLoS ONE*, **15**(12): e0244392. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244392

Noble J.E. and Bailey M.J. 2009. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, **463**: 73–95. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1

Pascual P., Pedrajas J.R., Toribio F., Lopez-Barea J. and Peinado J. 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chemico-Biological Interactions*, **145**(2): 191–199. https://doi.org/10.1016/s0009-2797(03)00002-4

Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., Lambert D., Michiels C., Raes M., Zachary M.D. and Remacle J. 1990. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanisms of Ageing and Development*, **51**(3): 283-97. https://doi.org/10.1016/0047-6374(90)90078-t

R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: https://www.R-project.org/

RStudio Team. 2019. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA Available from: http://www.rstudio.com/

Shakir H.A., Qazi J.I. and Chaudhry A.S. 2014. Examining muscles of *Cirrhinus mrigala* for biochemical parameters as a bio-indicator of water pollution by municipal and industrial effluents into River Ravi Pakistan. *International Aquatic Research*, **6**: 221–228. https://doi.org/10.1007/s40071-014-0082-6

Shin H.S., An K.W., Kim N.N. and Choi C.Y. 2010. Antioxidant defenses and physiological changes in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in response to oxidative stress induced by elevated water temperature. *Korean Journal of Ichthyology*, **22**(1): 1–8.

Shukry M., Abd El-Kader M.F., Hendam B.M., Dawood M., Farrag F.A., Aboelenin S.M., Soliman M.M. and Abdel-Latif H. 2021. Dietary *Aspergillus oryzae* modulates serum biochemical indices, immune responses, oxidative stress, and transcription of HSP70 and cytokine genes in Nile Tilapia exposed

to salinity stress. *Animals: an open access journal from MDPI*, **11**(6): 1621. https://doi.org/10.3390/ani11061621

Sinha P., Annamalai S.K. and Arunachalam K.D. 2018. A wee study on behavioural, organ somatic index and histological alterations of the fresh water fish *Pangasius sutchi* in response to protection studies, exposed to gamma radiation perceived by genotoxic assays. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **50**(2): 18–30.

Smirnov L., Sukhovskaya I. and Kochneva A. 2019. Variability of some antioxidant defense parameters and concentration of protein in the larvae of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in White Sea in the summer. *Principles of the Ecology*, **2**: 98-109. [In Russian]. https://doi.org/10.15393/j1.art.2019.8542

Strange R.C., Spiteri M.A., Ramachandran S. and Fryer A.A. 2001. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research*, **482**(1–2): 21–26. https://doi.org/10.1016/s0027-5107(01)00206-8

Sukhovskaya I., Borvinskaya E., Smirnov L. and Nemova N. 2010. Comparative analysis of the methods for determination of protein concentration – spectrophotometry in the 200–220 nm range and the bradford protein assay. *Transactions of KarRC RAS. The "Experimental Biology" series*, **2**: 68–71. [In Russian].

Taugbøl A., Arntsen T., Ostbye K. and Vøllestad L.A. 2014. Small changes in gene expression of targeted osmoregulatory genes when exposing marine and freshwater threespine stickleback (Gasterosteus aculeatus) to abrupt salinity transfers. *PLoS One*, **9**(9): e106894. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106894

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. and Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **160**(1): 1–40. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009

Wang L., Wang X. and Yin S. 2016. Effects of salinity change on two superoxide dismutases (SODs) in juvenile marbled eel *Anguilla marmorata.Peer J*, **4**: e2149. https://doi.org/10.7717/peerj.2149

Xu C., Li E., Suo Y., Su Y., Lu M., Zhao Q., Qin J.G. and Chen L. 2018. Histological and transcriptomic responses of two immune organs, the spleen and head kidney, in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to long-term hypersaline stress. *Fish & shellfish immunology*, **76**: 48–57. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.041

Yin F., Peng S., Sun P. and Shi Z. 2011. Effects of low salinity on antioxidant enzymes activities in kidney and muscle of juvenile silver pomfret *Pampus argenteus*. *Acta Ecologica Sinica*, **31**(1): 55–60. https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2010.11.009