

УДК 597.556.331.1:591.111:577.15

АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ И СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В ЭРИТРОЦИТАХ И УРОВЕНЬ МЕТГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ МОРСКОГО ЕРША *SCORPAENA PORCUS LINNAEUS*, 1758 В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ

© 2021 г. А. А. Солдатов^{1,2,*}, Т. И. Андреенко^{1,2}, Т. А. Кухарева¹,
А. Ю. Андреева¹, Е. С. Кладченко¹

¹Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь 299011, Россия

²Севастопольский государственный университет, Севастополь 299053, Россия

*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.06.2020 г.

После доработки 12.10.2020 г.

Принята к публикации 15.02.2021 г.

В условиях эксперимента *in vivo* исследовали влияние острой гипоксии на уровень метгемоглобина (MtHb) в крови, а также на активность каталазы (CAT) и супероксиддисмутазы (SOD) в эритроцитах морского ерша *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758. Содержание O₂ в воде снижали прокачиванием N₂ в течение 1.5–2.0 ч с 8.5–8.7 мгO₂/л до требуемых значений. Анализировали диапазон концентраций 0.35–8.50 мгO₂/л. Экспозиция составляла 4 ч при температуре воды 14–16°C. Показано, что при концентрации кислорода в воде менее 2 мгO₂/л часть гемоглобина переходила в ферри-форму. Эффект был наиболее выражен при острых формах гипоксии (менее 1 мгO₂/л). Максимальный прирост уровня MtHb составлял 19% от общего содержания пигмента в крови. Это коррелировало с существенным увеличением активности SOD и CAT в эритроцитах (коэффициент детерминации превышал 0.750) и отражало усиление процесса дисмутации супероксиданион радикала в клетках красной крови.

Ключевые слова: гипоксия, метгемоглобин, каталаза, супероксиддисмутаза, эритроциты, кровь, рыбы

DOI: 10.31857/S0134347521040124

Низкая скорость диффузии кислорода в воде и ограничение процессов водообмена являются основными причинами формирования устойчивых во времени зон острой гипоксии (oxygen-minimum zones, или OMZ) в ряде акваторий шельфа Мирового океана (Jouze, 2000; Middelburg, Levin, 2009; Gewin, 2010). Концентрация кислорода в OMZ обычно не превышает 0.5 мгO₂/л (норма 7–8 мгO₂/л). Особый интерес представляют морские организмы, значительная часть жизненного цикла которых протекает в этих условиях (Stoeck et al., 2003; El Albani et al., 2010; Danovaro et al., 2010).

При изучении толерантных к гипоксии форм жизни основное внимание исследователей сосредоточено на изучении биоэнергетических процессов, которые существенно перестраиваются. Отмечено повышение содержания в тканях аланина и сукцината (Van Waarde, 1988) на фоне увеличения продукции NH₄⁺ (Chew et al., 2005). Одновременно повышалась активность аланин- и аспаратаминотрансфераз, а также активизиру-

вались процессы переаминирования аминокислот (Mommensen et al., 1980; Soldatov et al., 2009). Ферментативные системы цикла Кребса были задействованы в анаэробных процессах генерации энергии (Van Waarde, 1988), а дыхательная цепь митохондрий приобретала некомпенсированный тип организации (Савина, 1992).

Определенные закономерности выявлены и на уровне клеток красной крови. Так, эритроциты толерантных к гипоксии рыб в условиях дефицита кислорода способны к сбалансированному угнетению мембранных и метаболических функций (Soldatov et al., 2014), при этом повышается их деформируемость (Chiocchia, Motais, 1989). В ряде работ отмечено увеличение клеточного объема (swelling) (Jensen, 2004; Wells, 2009). Процесс контролируется катехоламинами (Perry et al., 1999), взаимодействующими с поверхностными β-адренорецепторами эритроцитов (Jahns et al., 1996), которые активизируют Na⁺/H⁺ и HCO₃/Cl⁻ антипорты клеток (Wood, Simmons, 1994; Jensen, 2004).

Наряду с изменениями метаболизма и реакциями клеточных систем выявлено несколько парадоксальных событий. В условиях гипоксии, когда окислительная нагрузка снижена, наблюдался значительный рост активности каталазы (CAT) и супероксиддисмутазы (SOD) (Lushchak, Vagnuykova, 2006; Stara et al., 2012), отмечено также повышение содержания метгемоглобина (MtHb) в крови (Affonso et al., 2002; Chen et al., 2017). Поскольку большинство гидробионтов перманентно сталкиваются с условиями гипоксии, предложено рассматривать увеличение активности CAT и SOD как подготовку к последующему окислительному стрессу (Lushchak, Vagnuykova, 2006). Второе событие – увеличение содержания MtHb пока не находит достойного объяснения, при этом оно отмечено не только у рыб (Affonso et al., 2002; Chen et al., 2017), но и у высших позвоночных (Olander, Parr, 1977), в том числе у человека (Arnaud et al., 1979). Показано, что частично деоксигенированный гемоглобин легче подвергается окислению и переходит в мет-форму (Mansouri, 1981). Мы предполагаем, что данные процессы взаимосвязаны, так как увеличение содержания MtHb сопровождается освобождением супероксиданионрадикала (O_2^-), который последовательно нейтрализуется в реакции дисмутации при участии SOD и CAT.

В связи с этим цель настоящей работы – в условиях эксперимента *in vivo* исследовать влияние ранжированной гипоксии на уровень MtHb в крови и на активность CAT и SOD в эритроцитах толерантного к гипоксии морского ерша *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на взрослых особях морского ерша *Scorpaena porcus* в состоянии относительного физиологического покоя (III–IV стадия зрелости гонад): длина тела – 14–19 см, масса тела – 124–182 г. Данный вид отличается повышенной устойчивостью к гипоксии. Среди представителей донной ихтиофауны черноморского региона для него характерны наиболее низкие критические и пороговые концентрации кислорода (Парфенова, 2004). Рыб отлавливали ставным неводом и в течение 3 ч доставляли в лабораторию в пластиковых баках объемом 60 л с использованием принудительной аэрации, затем рассаживали в аквариумы с естественным протоком. В этих условиях морских ершей выдерживали в течение 1 нед. для снятия стресса; кормили фаршем из молоченных видов рыб. Суточный пищевой рацион рыб составлял 6–7% от массы тела. В работе использовали только подвижных активно питающихся рыб; при их отлове из аквариума применяли уретановый наркоз (Soldatov, 2005).

Экспериментальная часть работы выполнена с использованием специально разработанного экспериментального стенда, который позволяет поддерживать требуемые концентрацию O_2 в воде и температуру в течение неограниченного периода времени. Температура в рабочей камере (объем 13.5 л) составляла 14–16°C. В камере находилась одна особь морского ерша. Фотопериод: 12 ч день – 12 ч ночь. После адаптации к этим условиям (1 сут) содержание O_2 в воде снижали прокачиванием N_2 в течение 1.5–2.0 ч с 8.5–8.7 мг O_2 /л до требуемых значений. Исследовали диапазон концентраций 0.35–8.50 мг O_2 /л. Постоянство заданной концентрации O_2 в воде обеспечивалось воздушной аэрацией. Экспозиция составляла 4 ч. Содержание O_2 контролировали оксиметром DO Meter ST300D RU (“Ohaus”, USA).

Кровь брали шприцем (2 мл) из хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (“Рихтер”, Венгрия). Образцы помещали в пластиковую пробирку под слой вазелинового масла, что исключало контакт с воздухом.

Концентрацию MtHb в полученных образцах крови определяли спектрофотометрически по методике Н. Evelyn и Н. Malloy в модификации М.С. Кушаковского (с применением ацетонциангидрина) (см.: Кушаковский, 1970).

При определении активности CAT и SOD клетки крови предварительно осаждали центрифугированием (800 g, 15 мин, центрифуга Elmi CM-50). Плазму и поверхностный слой клеток (фракция лейкоцитов) удаляли. Эритроциты трижды отмывали от плазмы в среде следующего состава: 128 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 1.5 мМ CaCl₂, 1.5 мМ MgCl₂, 15 мМ трис и 2.2 мМ D-глюкозы (pH 7.8) (Tiihonen, Nikinmaa, 1991), используя эти же режимы центрифугирования. Концентрацию O_2 в инкубационной среде поддерживали на уровне экспериментальных значений (барботаж N_2), контролировали оксиметром DO Meter ST300D RU (“Ohaus”, USA). Полученную клеточную массу лизировали охлажденным дистиллятом. Строну разрушенных клеток осаждали центрифугированием (15294 g, 15 мин, Elmi CM-50). В полученных гемолизатах определяли активность CAT и SOD.

Активность SOD (КФ 1.15.1.1) определяли по степени ингибирования восстановления нитросинего тетразолия в присутствии $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ и феназинметасульфата (Переслегина, 1989). Активность CAT (КФ 1.11.1.6) определяли по реакции H_2O_2 с молибдатом аммония и по образованию желтоокрашенного комплекса (Гирич, 1999). Содержание белка в пробе контролировали с помощью метода Лоури (Lowry et al., 1951). Более детально процедура определения активности CAT и SOD в тканях морских организмов описана ранее

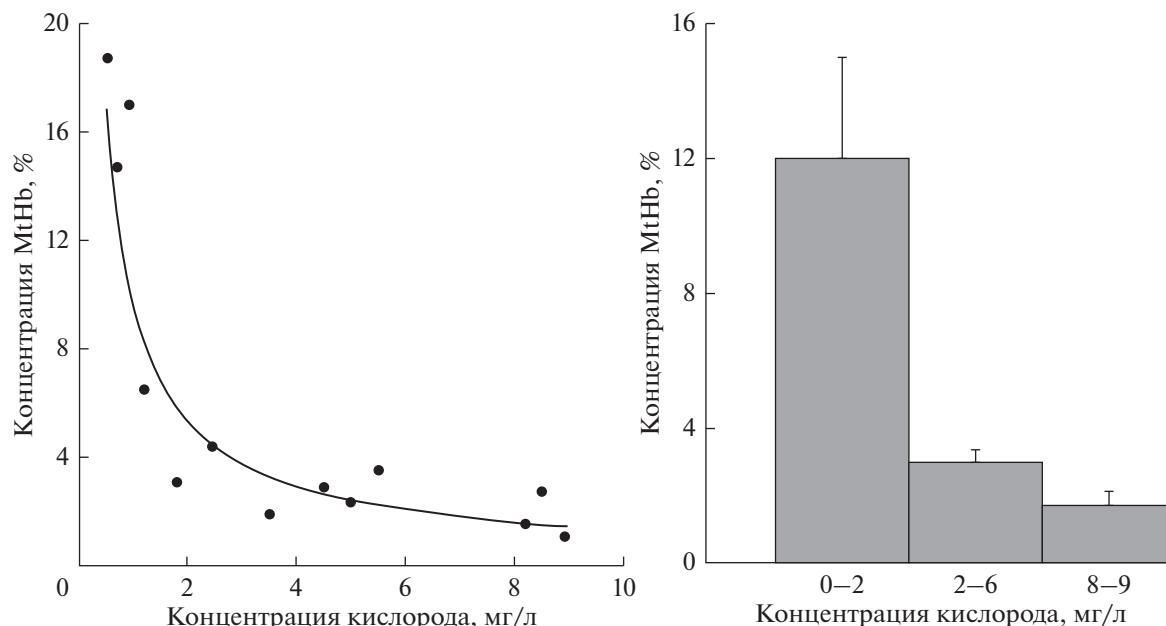


Рис. 1. Концентрация метгемоглобина (MtHb) в крови морского ерша при адаптации к среде с разной концентрацией кислорода ($R^2 = 0.849$ для системы “MtHb–O₂”).

(Солдатов и др., 2008). Все измерения проведены на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 (USA).

Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов выполнены с применением стандартного пакета, программа Grapher 7 (Golden Software, USA). Результаты представлены в виде $M \pm m$. Достоверность различий между выборочными совокупностями оценивали при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни. В работе использовано 22 экз. морского ерша.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрация метгемоглобина в крови

В условиях нормоксии (8.5–8.7 мгO₂/л) уровень MtHb не превышал 4% от общего содержания гемоглобина в крови морского ерша (рис. 1). Понижение концентрации O₂ в воде в диапазоне 2.0–8.7 мгO₂/л значимо не влияло на содержание ферри-формы в крови рыб. Фактически оно оставалось на уровне контрольных значений (нормоксия). Имеющиеся различия были статистически незначимы. Однако при более низких концентрациях O₂ (менее 2.0 мгO₂/л) отмечено существенное повышение уровня окисленного пигмента в крови морского ерша. По сравнению с условиями нормоксии различие составило около 6 раз ($p < 0.001$). Основное увеличение отмечено при концентрациях O₂ менее 1.0 мгO₂/л. У отдельных особей уровень мет-формы достигал 19% от общей концентрации гемоглобина в крови. Зави-

симость хорошо аппроксимировалась уравнением степенной функции ($R^2 = 0.849$).

Активность SOD и CAT в эритроцитах

Изменение активности СОД и КАТ в целом совпадало с отмеченным ранее для MtHb (рис. 2). При концентрации O₂ в воде менее 2.0 мгO₂/л активность обоих ферментов существенно повышалась. По сравнению с результатами, полученными для условий нормоксии, она была в 5.0–5.5 и 2.0–2.5 раза выше ($p < 0.001$) соответственно для САТ и СОД. При этом более выраженную связь отмечали между активностью СОД и концентрацией O₂ в воде. Об этом свидетельствовали сравнительно более высокие значения коэффициента детерминации – 0.707 и 0.589 соответственно. Увеличение активности СОД наблюдали уже при концентрации O₂ в воде 2–6 мгO₂/л. Различия с условиями нормоксии составляли почти 50%, но не были статистически значимы.

Корреляционные отношения

Анализ корреляционных отношений для систем “SOD–MtHb”, “CAT–MtHb” и “SOD–CAT” показал (рис. 3), что между содержанием ферри-формы гемоглобина в крови и активностью СОД и САТ существует выраженная связь. Коэффициент детерминации составлял соответственно 0.776 и 0.817. Связь в системе “SOD–CAT” была менее выражена ($R^2 = 0.480$).

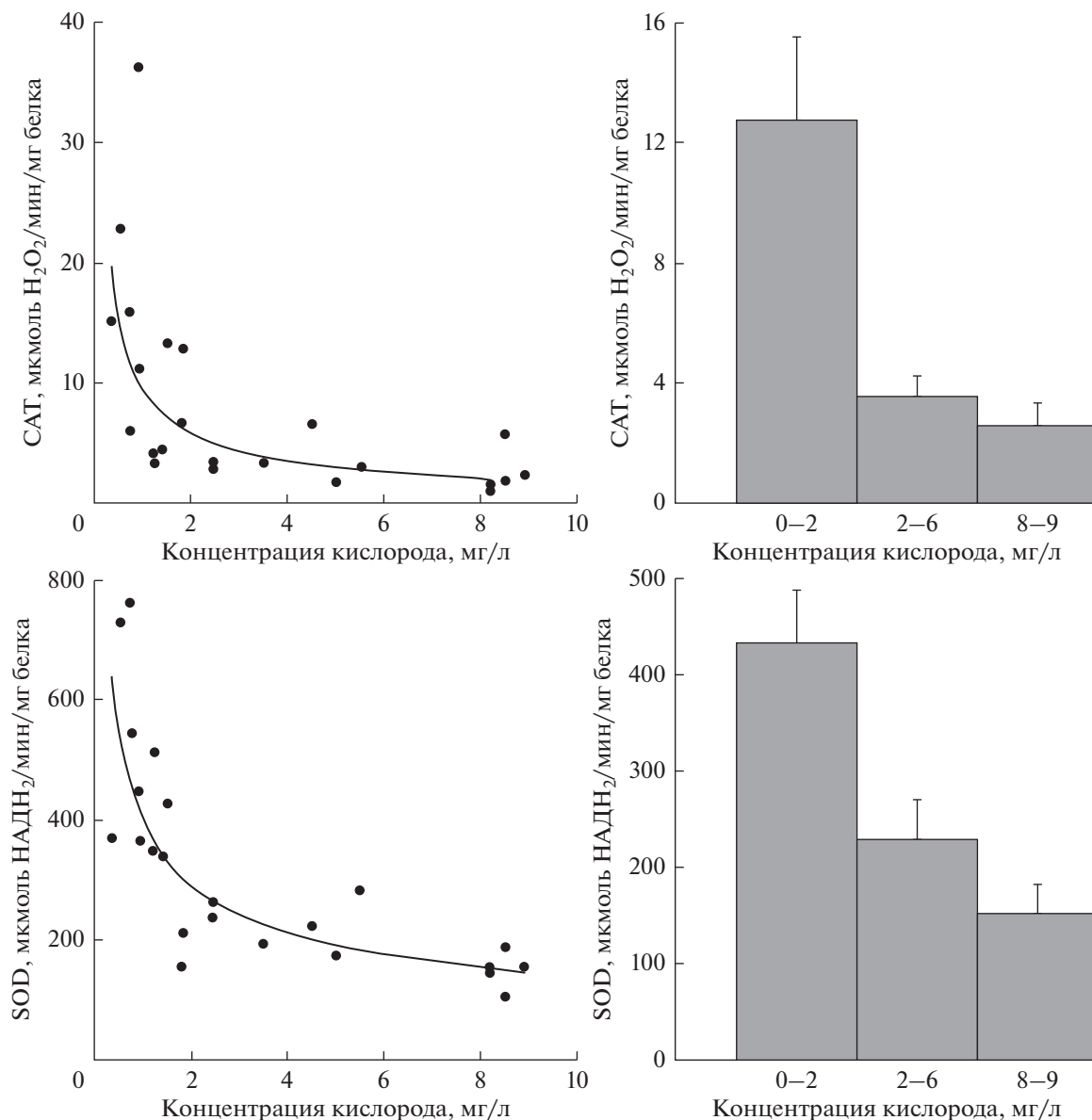


Рис. 2. Активность CAT и SOD в эритроцитах морского ерша при адаптации к среде с разной концентрацией кислорода ($R^2 = 0.589$ для системы “CAT–O₂”; $R^2 = 0.707$ для системы “SOD–O₂”).

ОБСУЖДЕНИЕ

Из представленной информации необходимо обратить внимание на следующие моменты: в условиях острой гипоксии (менее 1.0 мгO₂/л) часть гемоглобина переходит в окисленное состояние (ферри-форму); одновременно повышается активность SOD и CAT в эритроцитах; между содержанием MtHb в крови и активностью SOD и CAT существует выраженная связь.

Концентрация метгемоглобина в крови

Переход гемоглобина в мет-форму при гипоксии был показан для многих групп организмов,

включая рыб (Olander, Parr, 1977; Arnaud et al., 1979; Affonso et al., 2002; Chen et al., 2017). Это может быть обусловлено тем, что в условиях острой гипоксии существенно увеличивается доля дезоксигенированного гемоглобина, который легче подвергается окислению (Mansouri, 1981). Его ферро-ион находится в высокоспиновом состоянии (4 неспаренных электрона), что облегчает отрыв электрона от железа (автоокисление). В данном случае кислород венозной крови может выполнять роль акцептора электрона, что должно приводить к образованию $\cdot O_2^-$. Это наиболее вероятный процесс, объясняющий увеличение содержания MtHb в крови в условиях острой гипоксии.

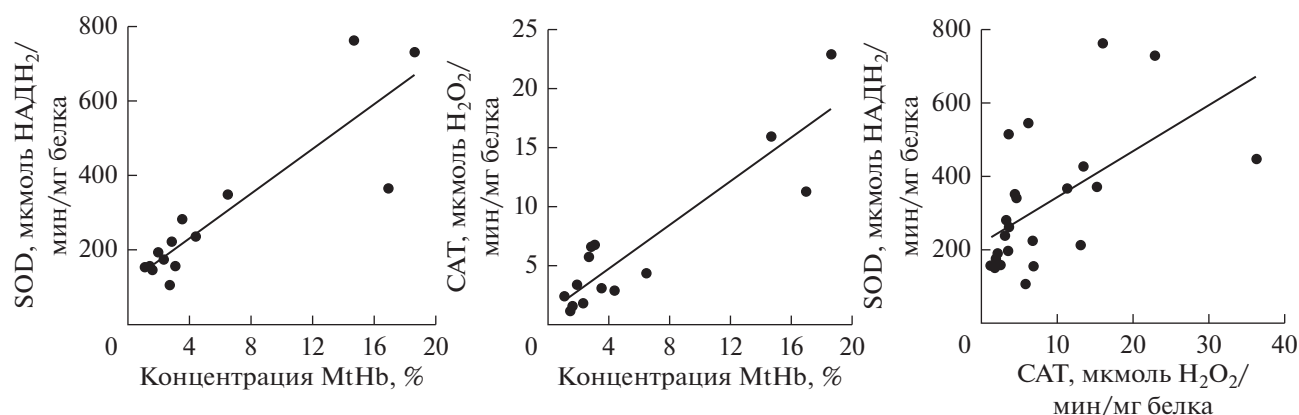
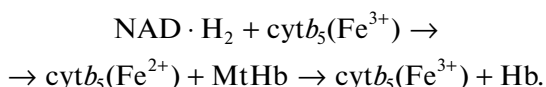


Рис. 3. Корреляционные отношения для систем “SOD–MtHb” ($R^2 = 0.769$), “CAT–MtHb” ($R^2 = 0.817$) и “SOD–CAT” ($R^2 = 0.480$).

Ядерные эритроциты рыб в отличие от таких высших позвоночных содержат митохондрии (Boutillier, Ferguson, 1989; Phillips et al., 2000). В митохондриях сравнительно активно протекают аэробные процессы ресинтеза АТФ. В условиях острой гипоксии они должны подавляться на фоне повышения роли реакций гликолиза. Последнее должно приводить к снижению внутриклеточного рН и возникновению дефицита $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$. Известно, что роль специфического переносчика электрона с $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ на цитохром b_5 , а затем на MtHb в эритроцитах выполняет $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ -диафораза (Percy, Lappin, 2008):



За кислению внутриэритроцитарной среды и возникновение дефицита $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ должно приводить к снижению активности фермента и к увеличению содержания MtHb и $\cdot\text{O}_2^-$ в крови. Это тоже может быть вероятным процессом, объясняющим рост содержания ферри-формы гемоглобина в крови рыб в условиях внешней гипоксии. В настоящее время обнаружен факт закисления внутриклеточной среды эритроцита при дефиците кислорода (Adragna et al., 2004). Установлено также, что при снижении рН усиливаются процессы автоокисления гемоглобина (Wallace et al., 1982; Adragna et al., 2004).

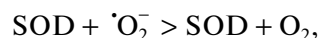
Закисление внутриэритроцитарной среды в условиях острой гипоксии активизирует работу Na^+/H^+ -антипорта и сопровождается поступлением Na^+ в клетку (Tufts, 1992). Это приводит к гидратации цитоплазмы и росту ее диэлектрической проницаемости, что должно способствовать проникновению воды в гидрофобную полость гемоглобина (White et al., 1978). Вода обычно встраивается на уровне имидазольной группы His, вы-

зывая окисление преимущественно дезокси-формы пигмента. Это должно приводить к освобождению $\cdot\text{O}_2^-$.

Какой из вышеприведенных механизмов определяет рост содержания MtHb в крови в условиях острой гипоксии, сказать сложно. Скорее всего, они протекают одновременно, учитывая их взаимозависимость. Необходимо отметить, что в ряде исследований гипоксия не сопровождалась ростом уровня MtHb в крови (Cameron, 1971; Soldatov, Parfenova, 2001). Это объясняется тем, что были исследованы умеренные формы гипоксии (более 2.5 $\text{mgO}_2/\text{л}$), которые и в нашем случае были малоэффективны.

Активность SOD и CAT в эритроцитах

Активность SOD и CAT существенно повышалась в условиях острой гипоксии (менее 1.0 $\text{mgO}_2/\text{л}$) и хорошо коррелировала с уровнем MtHb в крови рыб. Значения R^2 превышали 0.750. Переход гемоглобина из ферро- в ферри-форму сопряжен с продукцией супероксиданион радикала ($\cdot\text{O}_2^-$). Его нейтрализация должна осуществляться в реакции дисмутации, в которой принимают участие оба фермента. Вначале SOD переводит $\cdot\text{O}_2^-$ в два этапа в H_2O_2 :



а затем образующаяся H_2O_2 нейтрализуется CAT: $2\text{H}_2\text{O}_2 > 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Эта реакция была отмечена для различных соматических тканей рыб, включая эритроциты крови (Lushchak, Vagnyukova, 2006; Stara et al., 2012).

Известно, что данные ферменты не всегда могут функционировать совместно, т.е. определять реакцию дисмутации (Soldatov et al., 2014). CAT способна самостоятельно нейтрализовать гидроперекиси, а SOD может участвовать в прооксидантных процессах. В нашем случае мы допускаем, что данные ферменты в эритроцитах функционируют все же по схеме реакции дисмутации, так как связь между ними существует: R^2 был равен 0.480, что соответствует коэффициенту корреляции 0.693.

Изменения, происходящие в крови морского ерша, связаны с определенными функциональными следствиями, позволяющими данному виду существовать в условиях острой гипоксии. Переход гемоглобина в мет-форму способствует деоксигенации венозной крови, насыщенной на 40–60% кислородом. Процесс не требует снижения тканевого PO_2 , что особенно актуально в условиях гипоксии. В наших экспериментах увеличение уровня метгемоглобина в крови наблюдалось при концентрации кислорода в инкубационной среде менее 2 мг O_2 /л и становилось еще более заметным при его содержании 0–1 мг O_2 /л, что соответствует венозному насыщению кислорода. Данная реакция должна способствовать поддержанию окислительных процессов в тканях в условиях дефицита кислорода.

Таким образом, при концентрации кислорода в воде менее 2 мг O_2 /л часть гемоглобина переходила в ферри-форму. Эффект был наиболее выражен при острых формах гипоксии (менее 1 мг O_2 /л). Максимальный прирост уровня МtHb составлял 19% от общего содержания пигмента в крови. Это коррелировало с существенным ростом активности SOD и CAT в эритроцитах (R^2 превышал 0.750). Последнее отражало усиление процесса дисмутации $\cdot O_2^-$.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственной программы АААА-А18-118021490093-4 и при частичной поддержке проекта РФФИ 20-04-00037.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гурин С.В. Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах // Лаб. диагностика. 1999. № 4. С. 45–46.
- Кушаковский М.С. Метгемоглобинемии. Справочник по функциональной диагностике. М.: Медицина. 1970. С. 423–427.
- Парфенова И.А. Критические и пороговые напряжения кислорода у морских рыб различной толерантности к внешней гипоксии // VII Міжн. науково-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених “Екологія. Людина. Суспільство”. Київ (Україна). 13–15 травня 2004 р. С. 53.
- Перслегина И.А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Лаб. дело. 1989. № 11. С. 20–23.
- Савина М.В. Механизмы адаптации тканевого дыхания в эволюции позвоночных. М.: Наука. 1992. 200 с.
- Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Головина И.В. Состояние антиоксидантного ферментативного комплекса тканей черноморского моллюска *Mytilus gallorvincialis* Lam. в условиях естественного окислительного стресса // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2008. Т. 44. № 2. С. 150–155.
- Adragna N.C., Di Fulvio M., Lauf P.K. Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes // J. Membr. Biol. 2004. V. 201. P. 109–137.
- Affonso E.G., Polez V.L.P., Corrêa C.F. et al. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia // Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol. 2002. V. 133. Iss. 3. P. 375–382.
- Arnaud J., Quilici J.C., Gutierrez N. et al. Methaemoglobin and erythrocyte reducing systems in high-altitude natives // Ann. Hum. Biol. 1979. V. 6. Iss. 6. P. 585–592.
- Boutilier R.G., Ferguson R.A. Nucleated red cell function: metabolism and pH regulation // Can. J. Zool. 1989. V. 67. P. 2986–2993.
- Cameron J.N. Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout // Comp. Biochem. Physiol., Part A: Physiol. 1971. V. 40. P. 743–749.
- Chen N., Wu M., Tang G-P. et al. Effects of acute hypoxia and reoxygenation on physiological and immune responses and redox balance of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih, 1955) // Front. Physiol. 2017. V. 8. Art. ID 375. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00375>
- Chew S.F., Gan J., Ip Y.K. Nitrogen metabolism and excretion in the swamp eel, *Monopterus albus*, during 6 or 40 days of estivation in mud // Physiol. Biochem. Zool. 2005. V. 78. Iss. 4. P. 620–629.
- Danovaro R., Dell’Anno A., Pusceddu A. et al. The first metazoa living in permanently anoxic conditions // BMC Biol. 2010. V. 8. Iss. 1. Art. ID 30. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-30>
- El Albani A., Bengtson S., Canfield D.E. et al. Large colonial organisms with coordinated growth in oxygenated environments 2.1 Gyr ago // Nature. 2010. V. 466. P. 100–104.

- Gewin V. Oceanography: Dead in the water // Nature. 2010. V. 466. P. 812–814.
- Chiocchia G., Motais R. Effect of catecholamines on deformability of red cells from trout: relative roles of cyclic AMP and cell volume // J. Physiol. 1989. V. 412. Iss. 1. P. 321–332.
- Jahns R., Borgese F., Lindenthal S. et al. Trout red blood cell arrestin (TRCarr), a novel member of the arrestin family: cloning, immunoprecipitation and expression of recombinant TRCarr // Biochem. J. 1996. V. 316. № 2. P. 497–506.
- Jensen F.B. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport // Acta Physiol. Scand. 2004. V. 182. Iss. 3. P. 215–227.
- Joyce S. The dead zones: oxygen-starved coastal waters // Environ. Health Perspect. 2000. V. 108. Iss. 3. P. A120–A125.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. Iss. 1. P. 265–275.
- Lushchak V.I., Bagnyukova T.V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish // Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol. 2006. V. 144. P. 283–289.
- Mansouri A. Methemoglobin formation and reduction in relation to hemoglobin oxygen affinity // Experientia. 1981. V. 37. P. 95–96.
- Middelburg J.J., Levin L.A. Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry // Biogeosciences. 2009. V. 6. P. 1273–1293.
- Mommsen T.P., French C.J., Hochachka P.W. Sites and patterns of protein and amino acid utilization during the spawning migration of salmon // Can. J. Zool. 1980. V. 58. Iss. 10. P. 1785–1799.
- Olander C.P., Parr C.E. Jr. Methemoglobin in hypoxic rats // Experientia. 1977. V. 33. P. 1656–1657.
- Perry S.F., Montpetit C.J., Julio A.E., Moore K. The influence of chronic anaemia on catecholamine secretion in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // J. Comp. Physiol., B. 1999. V. 169. P. 335–343.
- Percy M.J., Lappin T.R. Recessive congenital methaemoglobinemia: cytochrome b₅ reductase deficiency // Br. J. Haematol. 2008. V. 141. P. 298–308.
- Phillips M.C., Moyes C.D., Tufts B.L. The effects of cell ageing on metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells // J. Exp. Biol. 2000. V. 203. P. 1039–1045.
- Soldatov A.A. Physiological aspects of effects of urethane anesthesia on the organism of marine fishes // Hydrobiol. J. 2005. V. 41. Iss. 1. P. 113–126.
- Soldatov A.A., Andreenko T.I., Sysoeva I.V., Sysoev A.A. Tissue specificity of metabolism in the bivalve mollusc *Anadara inaequalis* Br. under conditions of experimental anoxia // J. Evol. Biochem. Physiol. 2009. V. 45. P. 349–355.
- Soldatov A.A., Andreeva A.Yu., Novitskaya V.N., Parfenova I.A. Coupling of membrane and metabolic functions in nucleated erythrocytes of *Scorpaena porcus* L. under hypoxia *in vivo* and *in vitro* // J. Evol. Biochem. Physiol. 2014. V. 50. P. 409–415.
- Soldatov A.A., Gostyukhina O.L., Golovina I.V. Functional states of antioxidant enzymatic complex of tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. under conditions of oxidative stress // J. Evol. Biochem. Physiol. 2014. V. 50. P. 206–214.
- Soldatov A.A., Parfenova I.A. The methemoglobin blood level and stability of circulating erythrocytes of the rockfish *Scorpaena porcus* to osmotic shock under conditions of experimental hypoxia // J. Evol. Biochem. Physiol. 2001. V. 37. P. 622–625.
- Stara A., Machova J., Velisek J. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.) // Neuroendocrinol. Lett. 2012. V. 33. Suppl 3. P. 130–135.
- Stoeck T., Taylor G.T., Epstein S.S. Novel eukaryotes from the permanently anoxic Cariaco Basin (Caribbean Sea) // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. Iss. 9. P. 5656–5663.
- Tiihonen K., Nikinmaa M. Substrate utilization by carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes // J. Exp. Biol. 1991. V. 161. P. 509–514.
- Tufts B. *In vitro* evidence for sodium-dependent pH regulation in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) red blood cells // Can. J. Zool. 1992. V. 70. P. 411–416.
- Van Waarde A. Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production // Comp. Biochem. Physiol., Part B: Comp. Biochem. 1988. V. 91. Iss. 2. P. 207–228.
- Wallace W.J., Houtchens R.A., Maxwell J.C., Caughey W.S. Mechanism of autooxidation for hemoglobins and myoglobins: Promotion of superoxide production by protons and anions // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 4966–4977.
- Wells R.M.G. Blood-gas transport and hemoglobin function: adaptations for functional and environmental hypoxia // In: Hypoxia // Fish Physiology. 2009. London: Academic. V. 27. Ch. 6. P. 255–299.
- White A., Handler Ph., Smith E.L. et al. Principles of biochemistry. 6th ed. New York: McGraw-Hill. 1978. V. 3. 1878 p.
- Wood C.M., Simmons H. The conversion of plasma HCO₃⁻ to CO₂ by rainbow trout red blood cells *in vitro*: adrenergic inhibition and the influence of oxygenation status // Fish Physiol. Biochem. 1994. V. 12. P. 445–454.

Catalase and Superoxide Dismutase Activity in Erythrocytes and Methemoglobin Level in Blood of Black Scorpionfish *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 Exposed to Acute Hypoxia

A. A. Soldatov^{a, b}, T. I. Andreenko^{a, b}, T. A. Kukhareva^a, A. Yu. Andreeva^a, and E. S. Kladchenko^a

^aA.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia

^bSevastopol State University, Sevastopol 299053, Russia

The effect of exposure to acute hypoxia on the level of methemoglobin (MtHb) in blood and the activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in erythrocytes of the Black Scorpionfish *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 was studied in experiments in vivo. The O₂ concentration in the seawater was reduced from 8.5–8.7 mgO₂/L to the required values by pumping N₂ into the water for 1.5–2.0 h. The concentration range of 0.35–8.50 mgO₂/L was studied. The exposure lasted for 4 h at a water temperature of 14–16°C. It has been shown that at oxygen concentrations in water less than 2 mgO₂/L part of hemoglobin passes into the ferric form. The effect was most pronounced in the case of acute hypoxia exposure (less than 1 mgO₂/L). The maximum increase in the MtHb level was 19% of the total level of the pigment in blood. This correlated with a significant increase in the SOD and CAT activity in erythrocytes (with the coefficient of determination R^2 higher than 0.750). The latter indicated an increase in the dismutation of superoxide anion in red blood cells.

Keywords: hypoxia, methemoglobin, catalase, superoxide dismutase, erythrocytes, blood, fish