

УДК 577.112.6:[595.767.29 + 597.554.3]017.322:57.043

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕПТИДНОГО СОСТАВА СУПЕРНАТАНТОВ ИЗ ЛИЧИНОК БОЛЬШОГО МУЧНОГО ХРУЩАКА *TENEBRIO MOLITOR* И КАРАСЯ СЕРЕБРЯНОГО *CARASSIUS AURATUS* В ПРОЦЕССЕ ХОЛОДОВОЙ АККЛИМАЦИИ

А. К. Гулевский, Д. В. Третяк

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, 61016,
Украина; Тел. +380573734135, e-mail: profgulevsky@gmail.com

Поступила в редакцию 12 октября 2016 года

Принята 31 октября 2016 года

Хроматографическим методом исследовано молекулярно-массовое распределение пептидов из супернатантов, полученных из тканей личинок *Tenebrio molitor* и карася серебряного *Carassius auratus* при холодной акклимации. Установлено, что в процессе холодной акклимации пептидный спектр супернатантов из личинок *T. molitor* и *C. auratus* изменяется. Наибольшее количество пептидных фракций имеют супернатанты из неакклимированных личинок *T. molitor* и деакклимированной рыбы. Показано, что у холодоакклимированных личинок *T. molitor* наблюдаются низкомолекулярные пептидные фракции с M от $(5,40 \pm 0,20) \cdot 10^2$ до $(22,6 \pm 0,9) \cdot 10^2$ Да, а у неакклимированных особей *T. molitor* отмечается значительное количество высокомолекулярных пептидов в диапазоне M от $(46,8 \pm 2,3) \cdot 10^2$ до $(66 \pm 6) \cdot 10^2$ Да. Обнаружено, что деакклимация карася серебряного в зимний период сопровождается органоспецифическими изменениями пептидного состава. После деакклимации в мышцах *C. auratus* выявлены низкомолекулярные пептиды $((14,1 \pm 0,3) \cdot 10^2$ и $(6,75 \pm 0,25) \cdot 10^2$ Да), а в печени – высокомолекулярные $((67,83 \pm 0,21) \cdot 10^2$ и $(64,16 \pm 0,26) \cdot 10^2$ Да) и низкомолекулярные $((34,1 \pm 1,0) \cdot 10^2$ и $(14,29 \pm 0,15) \cdot 10^2$ Да) пептиды. Количественные и качественные изменения пептидного спектра супернатантов из *T. molitor* и *C. auratus* при холодной акклимации могут быть одним из механизмов их естественной адаптации к низким температурам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: холодная акклимация, хроматография, пептиды.

ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕПТИДНОГО СКЛАДУ СУПЕРНАТАНТІВ ІЗ ЛИЧИНОК ВЕЛИКОГО БОРОШНЯНОГО ХРУЩАКА *TENEBRIO MOLITOR* І КАРАСЯ СРІБНОГО *CARASSIUS AURATUS* У ПРОЦЕСІ ХОЛОДОВОЇ АКЛІМАЦІЇ

О. К. Гулевський, Д. В. Третяк

Институт проблем криобиологии і криомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23,
Харків, 61016, Україна

Хроматографічним методом досліджено молекулярно-масовий розподіл пептидів із супернатантів, отриманих із тканин личинок *Tenebrio molitor* і карася срібного *Carassius auratus* за холодової аклімації. Встановлено, що у процесі холодової аклімації пептидний спектр супернатантів із личинок *T. molitor* і *C. auratus* змінюється. Найбільшу кількість пептидних фракцій мають супернатанти із неаклімованих личинок *T. molitor* і деаклімованої риби. Показано, що у холодоаклімованих личинок *T. molitor* спостерігаються низкомолекулярні пептидні фракції з M від $(5,40 \pm 0,20) \cdot 10^2$ до $(22,6 \pm 0,9) \cdot 10^2$ Да, а у неаклімованих особин *T. molitor* відзначається значна кількість високомолекулярних пептидів у діапазоні M від $(46,8 \pm 2,3) \cdot 10^2$ до $(66 \pm 6) \cdot 10^2$ Да. Виявлено, що деаклімація карася срібного у зимовий період супроводжується органоспецифічними змінами пептидного складу. Після деаклімації у м'язах *C. auratus* виявлені низкомолекулярні пептиди $((14,1 \pm 0,3) \cdot 10^2$ та $(6,75 \pm 0,25) \cdot 10^2$ Да), а у печінці – високомолекулярні $((67,83 \pm 0,21) \cdot 10^2$ і $(64,16 \pm 0,26) \cdot 10^2$ Да) та низкомолекулярні $((34,1 \pm 1,0) \cdot 10^2$ і $(14,29 \pm 0,15) \cdot 10^2$ Да) пептиди. Кількісні і якісні зміни пептидного спектру супернатантів із *T. molitor* і *C. auratus* за холодової аклімації можуть бути одним із механізмів їх природної адаптації до низьких температур.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: холодова аклімація, хроматографія, пептиди.

THE STUDY OF THE PEPTIDE COMPOSITION OF THE SUPERNATANTS FROM MEALWORM *TENEBRIO MOLITOR* LARVAE AND GOLDFISH *CARASSIUS AURATUS* DURING COLD ACCLIMATION

A. K. Gulevsky, D. V. Tretiak

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine,
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, 61016, Ukraine*

The molecular-mass distribution of peptides from supernatants, obtained from the tissues of larvae *Tenebrio molitor* and goldfish *Carassius auratus* during cold acclimation, has been determined by chromatography. The results showed that peptide spectrum of the supernatants from larvae *T. molitor* and *C. auratus* varied during cold acclimation. The supernatants from non-acclimated larvae of *T. molitor* and deacclimated fish possessed the highest number of peptide fractions. Furthermore, the cold-acclimated larvae of *T. molitor* had the peptide fractions of the low molecular weight (*ca.* $5.4 \cdot 10^2 \div 22.6 \cdot 10^2$ Da), and non-acclimated insects had the peptides of the high molecular weight (*ca.* $46.8 \cdot 10^2 \div 66 \cdot 10^2$ Da). Next, the organ-specific changes of the peptide composition of the goldfish during winter deacclimation have been revealed. Specifically, the low molecular weight peptides (*ca.* $(14.1 \pm 0.3) \cdot 10^2$ and $(6.75 \pm 0.25) \cdot 10^2$ Da), have been detected in the *C. auratus* muscles, and both the high (*ca.* $(67.83 \pm 0.21) \cdot 10^2$ (*ca.* $64.16 \pm 0.26) \cdot 10^2$ Da) and low (*ca.* $(34.1 \pm 1.0) \cdot 10^2$ and $(14.29 \pm 0.15) \cdot 10^2$ Da) molecular weight peptides have been detected in the liver. Quantitative and qualitative changes in the peptide spectra from supernatants of the *T. molitor* and *C. auratus* during cold acclimation could be one of the mechanisms of their natural adaptation to low temperatures.

KEY WORDS: cold acclimation, chromatography, peptides.

В настоящее время выяснение молекулярных механизмов низкотемпературной адаптации живых организмов является одной из актуальных проблем криобиологии. Известно, что холодоустойчивые биологические виды, а именно арктическая рыба [1-4], насекомые (*Meracantha contracta* [5], *Dendroides canadensis* [6], *Choristoneura fumiferana* [7] и *Cucujus clavipes* [8], *Tenebrio molitor* [9]) и бактерии [10-11], способны приспосабливаться к действию низких температур благодаря молекулярным механизмам адаптации, приобретенным в процессе эволюции, в частности за счет синтеза и аккумуляции специфических белков (антифризные белки, антифризные гликопротеины, белки-нуклеаторы, белки холодового шока) и пептидов. Кроме того, установлено, что при низкотемпературной адаптации наблюдаются конформационные изменения части белков холодоустойчивых организмов, которые приводят к увеличению гибкости [12] и стабильности белковых молекул [13, 14] и, в свою очередь, к уменьшению их гидрофобности [15], это способствует сохранению и оптимизации функционального состояния макромолекул при изменении температурных условий среды обитания. Таким образом, процесс адаптации биообъектов к действию низких температур, по-видимому, преимущественно, связан со структурными модификациями их белков и с качественными изменениями их белково-пептидного спектра. Для выяснения общих закономерностей изменений пептидного состава представляло интерес изучить этот процесс при холодной акклимации у представителей различных эволюционных ступеней развития, а именно у позвоночных (карась серебряный *Carassius auratus*) и беспозвоночных (личинки *Tenebrio molitor*) пойкилотермных животных. Целью данной работы было исследовать с помощью гель-проникающей хроматографии пептидный состав супернатантов из личинок *Tenebrio molitor* и тканей (мышцы и печень) карася серебряного *Carassius auratus* в процессе холодной акклимации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были проведены в соответствии с Законом Украины № 3447-IV от 21.02.2006 г. «О защите животных от жестокого обращения», с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986 г.), а также согласно принципам биоэтики и нормам биологической безопасности.

В работе были использованы акклимированные при 5–7°C в течение 3-х недель личинки большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*. Личинок последних возрастов

гомогенизували в 0,6% розстворі хлориду натрія на 0,1 М Na-фосфатному буфері (рН 7,4) з додаванням інгібітора протеаз фенілметилсульфонілфториду (Sigma, США) із розрахунок 6 личинок на 2 мл буфера. Гомогенат центрифугували 10 мин при 1800g. Затем надосадочную жидкость центрифугували в течение 60 мин при 100000g на центрифуге MSE Superspeed 65 (MSE Scientific Instruments, Великобритания). В исследованиях использовали супернатант (100000g).

Также в работе использовали карасей из прудов Валковского рыбного хозяйства Харьковской области, выловленных в зимний период (декабрь). Одну группу акклиматизированных особей *C. auratus* содержали в холодильной комнате при температуре воды 4–5°C. Другую группу рыб помещали в аэрируемый аквариум при температуре 20°C в течение 3-х недель (процесс деакклиматизации) с целью моделирования летнего режима в зимний период. Для приготовления проб ткани мышц и печени *C. auratus* гомогенизували в 0,6% растворе хлорид натрия на 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 7,4) с добавлением ингибитора протеаз фенілметилсульфонілфториду (Sigma, США) із розрахунок 0,3 г ткани на 2 мл буфера. Гомогенат центрифугували 10 мин при 1800g. Надосадочную жидкость центрифугували в течение 60 мин при 100000g на центрифуге MSE Superspeed 65 (MSE Scientific Instruments, Великобритания). Для хроматографических исследований использовали супернатант (100000g). Количество белка в пробах определяли по методу Бредфорда [16].

Количественную и качественную оценку пептидного состава супернатантов из личинок *T. molitor* и тканей мышц и печени *C. auratus* проводили с помощью гелепроникающей хроматографии [17] на колонке размером 400 × 16 мм, заполненной поливиниловым гелем TSK-Gel Toyopearl HW-40 Fine (Toyo Soda Manufacturing Co, Япония), который дает возможность разделить полипептидные молекулы с молекулярной массой от 100 до 12000 Да. Через петлевой инжектор в колонку вводили пробы в объеме 0,2 мл и с помощью перистальтического насоса Microperplex LKB 2132 (Швеция) подавался элюирующий фосфатно-солевой буферный раствор (18 мМ Na₂HPO₄, 12 мМ NaH₂PO₄, 100 мМ NaCl (рН 7,4)). Скорость потока элюента составляла 1,63 мл/мин. Полученные фракции низкомолекулярных веществ белково-пептидной природы регистрировали с помощью ультрафиолетового оптического монитора Uvicord SII LKB 2238 (Швеция) при длине волны 280 нм. Сигнал монитора записывался в виде хроматограмм 2-канальным самопишущим потенциометром Recorder LKB 2210 (Швеция) и подавался на интегратор Waters 746 Data Module (США), записывающий время удерживания фракции и площадь под пиком. В качестве маркеров молекулярных масс использовали рибофлавин с М 376,40 Да (Sigma, США), ангиотензин II с М 1046,18 Да (Sigma, США), цианокобаламин с М 1355,37 Да (Sigma, США), мелитин с М 2846,46 Да (Sigma, США), инсулин человека с М 5807,57 Да (Sigma, США). Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Значимыми считали различия при p < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все живые организмы, которые обитают в условиях изменения температурного режима, должны обладать температурно-компенсаторными реакциями, которые могут проявляться на различном уровне биологической организации (от поведения вида до молекулярного уровня). Область познания адаптационных процессов холодоустойчивых организмов с каждым годом расширяется и все же остается до конца не изученной [18-20]. Процессы, происходящие на молекулярном уровне организации при низкотемпературной адаптации, являются ключевыми в понимании выживания и сохранения биологического вида в неблагоприятных условиях, поэтому

изучение и расширение представлений о молекулярных механизмах адаптации биообъектов является актуальной проблемой современной криобиологии.

В данной работе нами был исследован состав пептидов двух представителей биологических видов *Tenebrio molitor* и *Carassius auratus* в процессе холодной акклимации. Следует отметить, что ранее с помощью SDS-электрофореза в ПААГ было показано, что личинки большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* при 2-недельной холодной акклимации продуцируют белки с М 5-10, 30 и 65 кДа [21], которые, в свою очередь, могут иметь шаперонную или антифризную природу. В работе [22] установлено, что в зимний период в красных мышцах и миокарде *Carassius auratus* появляются белки с М 205 кДа, а в печени – 172 кДа. Также автором [22] выявлено, что после 2-недельной деакклимации при 20-22°C спектр белков красных мышц, миокарда и печени *C. auratus* не отличался от тех, что были получены летом, а весной при 4-5°C характерный для зимних условий белок с М 205 кДа сохранялся только в красных мышцах. Вместе с тем большую роль в приобретении устойчивости к низким температурам в процессе холодной акклимации могут иметь изменения пептидного состава биологических сред живого организма, в частности, пептиды могут выступать в качестве регуляторов биосинтеза белков в этих условиях, а также иметь антифризную природу [23-25] или быть пептидами стрессового состояния [26].

С помощью гель-проникающей хроматографии получено распределение веществ белково-пептидной природы из супернатантов холодоакклимированных и неакклимированных личинок *T. molitor* (рис. 1 и табл. 1). В результате анализа экспериментальных данных, выявлено, что супернатанты из неакклимированных и акклимированных к холоду личинок *T. molitor* содержат 10 и 7 белково-пептидных фракций с М от $5,4 \cdot 10^2$ до $\geq 120 \cdot 10^2$ Да соответственно. Вещества с М $\leq 70 \cdot 10^2$ Да идентифицировали как пептиды, а вещества, которые имели М $\geq 120 \cdot 10^2$ Да – как белки. Основными пиками, которые были выявлены в результате анализа хроматографического разделения низкомолекулярных веществ белковой и пептидной природы из супернатантов акклимированных к холоду и неакклимированных личинок *T. molitor*, являются пики Pr, A_{4,2}, B₁, C, D и F с М $\geq 120 \cdot 10^2$, $(22,6 \pm 0,9) \cdot 10^2$, $(15,3 \pm 1,2) \cdot 10^2$, $(11,1 \pm 1,2) \cdot 10^2$, $(8,3 \pm 0,6) \cdot 10^2$ и $(5,40 \pm 0,20) \cdot 10^2$ Да соответственно (рис. 1).

Как видно из рис. 1 качественный состав низкомолекулярных веществ пептидной природы супернатантов из личинок *T. molitor* в процессе низкотемпературной акклимации существенно изменяется. Следует отметить, что у акклимированных к холоду личинок *T. molitor* отсутствуют 4 высокомолекулярные пептидные фракции (пики A₁, A_{1,1}, A₂ и A₃) с М $(66 \pm 6) \cdot 10^2$, $(60,4 \pm 2,8) \cdot 10^2$, $(53,3 \pm 2,0) \cdot 10^2$ и $(46,8 \pm 2,3) \cdot 10^2$ Да, и отмечается появление низкомолекулярных пептидов с М $(13,0 \pm 0,8) \cdot 10^2$ Да (пик B₂). Для супернатантов из акклимированных *T. molitor* характерно наличие 6 низкомолекулярных пептидных фракций с М от $(5,40 \pm 0,20) \cdot 10^2$ до $(22,6 \pm 0,9) \cdot 10^2$ Да.

Можно предположить, что полученные качественные изменения спектра низкомолекулярных веществ пептидной природы являются одним из проявлений низкотемпературных механизмов холодоустойчивости насекомых *T. molitor*, что способствует их выживанию в неблагоприятных условиях существования. Выявленная фракция пептидов с М $(13,0 \pm 0,8) \cdot 10^2$ Да у личинок *T. molitor* после акклимации может иметь антифризную природу, что позволяет насекомым переносить стрессовые условия. Фракции пептидов с М $(66 \pm 6) \cdot 10^2$, $(60,4 \pm 2,8) \cdot 10^2$, $(53,3 \pm 2,0) \cdot 10^2$ и $(46,8 \pm 2,3) \cdot 10^2$ Да, которые отсутствуют у акклимированных особей *T. molitor*, могут функционировать как нуклеаторы, т.е. инициировать процессы кристаллизации, а поскольку стратегия холодоустойчивости личинок *T. molitor* заключается в избегании замерзания, то естественно, что после холодной акклимации данные вещества исчезают.

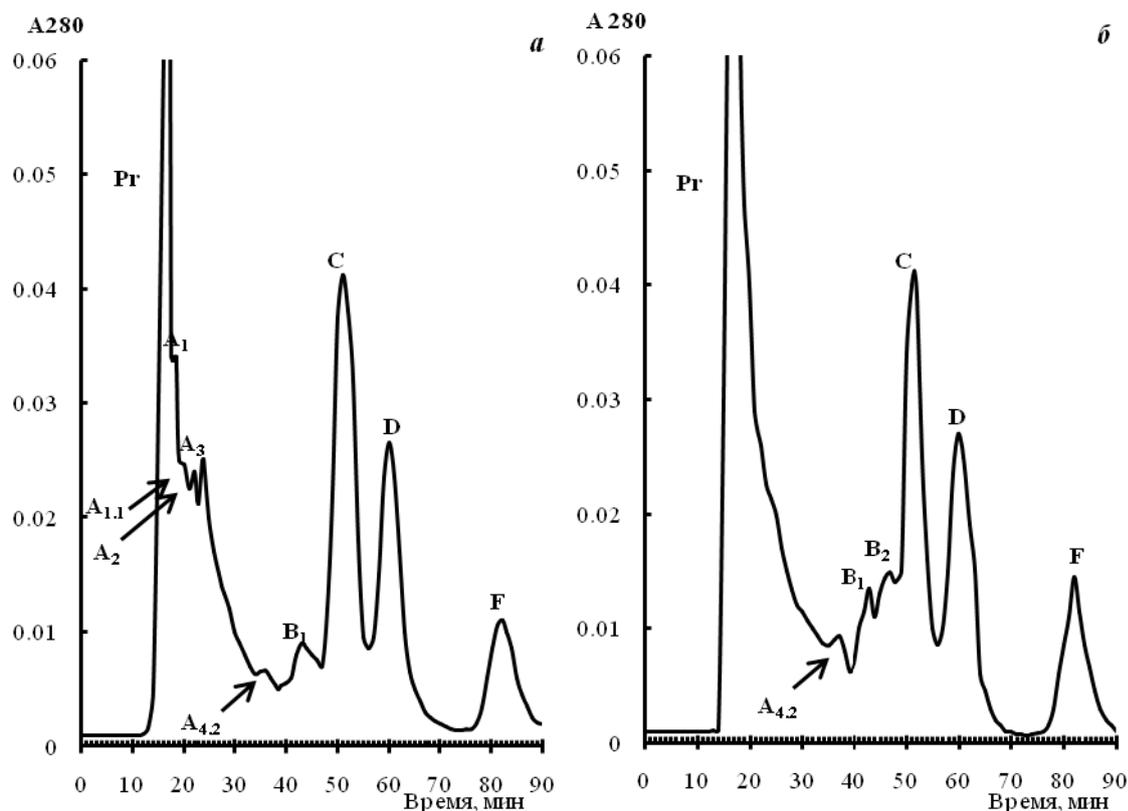


Рис. 1. Типичные хроматограммы распределения белково-пептидных фракций супернатантов из личинок *T. molitor*: а – неакклимированные личинки, б – акклимированные личинки.

Таблица 1

Средние значения хроматографических параметров белково-пептидных фракций супернатантов из личинок *T. molitor*

Пик	Средняя молекулярная масса фракции, 10^2 Да	Неакклимированные личинки		Акклимированные личинки	
		Средняя площадь пика, $\cdot 10^2$ мм ²	Площадь пика, %	Средняя площадь пика, $\cdot 10^2$ мм ²	Площадь пика, %
Pr	≥ 120	$14,5 \pm 2,1$	34 ± 5	33 ± 6	70 ± 12
A ₁	66 ± 6	$2,7 \pm 0,21$	$6,4 \pm 0,5$	-	-
A _{1.1}	$60,4 \pm 2,8$	$3,34 \pm 0,14$	$7,8 \pm 0,3$	-	-
A ₂	$53,3 \pm 2,0$	$4,83 \pm 0,29$	$11,3 \pm 0,7$	-	-
A ₃	$46,8 \pm 2,3$	$1,3 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,7$	-	-
A _{4.2}	$22,6 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,4$	$2,8 \pm 1,0$	$0,2 \pm 0,08^*$	$0,35 \pm 0,18^*$
B ₁	$15,3 \pm 1,2$	$1,45 \pm 0,28$	$3,4 \pm 0,7$	$0,63 \pm 0,22^*$	$1,5 \pm 0,5^*$
B ₂	$13,0 \pm 0,8$	-	-	$1,3 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,8$
C	$11,1 \pm 1,2$	$7,2 \pm 0,3$	$16,8 \pm 0,8$	$5,99 \pm 0,20^*$	$12,6 \pm 0,4^*$
D	$8,3 \pm 0,6$	$4,1 \pm 0,4$	$9,6 \pm 0,9$	$3,7 \pm 0,5$	$7,8 \pm 1,1$
F	$5,40 \pm 0,20$	$2,10 \pm 0,29$	$4,9 \pm 0,7$	$2,48 \pm 0,09$	$5,20 \pm 0,18$
Общий выход веществ		$42,6 \pm 1,8$		$47,6 \pm 2,3$	

Примечание: n = 6, * – статистически значимые различия по сравнению с неакклимированными насекомыми ($p < 0,05$).

Состав пептидных веществ из супернатантов холодоакклимированных и неакклимированных личинок *T. molitor* имеет количественные различия, в частности статистически значимые изменения наблюдаются во фракциях с М $(22,6 \pm 0,9) \cdot 10^2$, $(15,3 \pm 1,2) \cdot 10^2$ и $(11,1 \pm 1,2) \cdot 10^2$ Да, соответствующие пикам А_{4,2}, В₁ и С хроматограмм (рис. 1). В процессе холодовой акклимации личинок *T. molitor* отмечается уменьшение количества пептидов с М $(22,6 \pm 0,9) \cdot 10^2$ и $(15,3 \pm 1,2) \cdot 10^2$ в 8 и в 2,3 раза соответственно (пики А_{4,2} и В₁).

В результате сравнительного анализа хроматографических параметров белково-пептидных фракций супернатантов из личинок *T. molitor* выявлено, что количество белковой фракции (пик Рг) с М $\geq 120 \cdot 10^2$ Да у неакклимированных личинок в 2,3 раза ниже, чем у акклимированных особей. Процентное соотношение низкомолекулярных пептидных фракций с М от $(5,40 \pm 0,20) \cdot 10^2$ до $(22,5 \pm 0,9) \cdot 10^2$ Да в акклимированных к холоду личинок *T. molitor* составило 30,2%, тогда как у неакклимированных – 37,5%. Также следует отметить увеличение количества пептидов с М $(22,6 \pm 0,9) \cdot 10^2$, $(15,3 \pm 1,2) \cdot 10^2$, $(11,1 \pm 1,2) \cdot 10^2$ и $(8,3 \pm 0,6) \cdot 10^2$ Да в 8,0; 2,3; 1,3 и 1,2 раза у неакклимированных *T. molitor* соответственно.

Таким образом, было установлено, что состав низкомолекулярных веществ пептидной природы супернатантов, полученных из личинок *T. molitor*, после низкотемпературной адаптации претерпевает изменения. Обнаруженные количественные и качественные различия в пептидном составе супернатантов из акклимированных к холоду и неакклимированных личинок *T. molitor* могут иметь существенное значение в понимании роли этих компонентов в механизмах холодоустойчивости организмов. Выявленные пептидные фракции у холодоакклимированных личинок *T. molitor* могут иметь антифризную или шаперонную природу, что обеспечивает их устойчивость в условиях действия низких температур.

Также с помощью гель-проникающей хроматографии был изучен пептидный состав супернатантов из тканей мышц и печени карася серебряного *Carassius auratus* в процессе холодовой акклимации (рис. 2).

Молекулярно-массовое распределение белков и пептидов супернатантов, полученных из тканей мышц акклимированного и деакклимированного карася серебряного *C. auratus*, представлено на рис. 2. Качественный пептидный состав супернатантов из мышц акклимированных к холоду и деакклимированных *C. auratus* существенно отличается. При хроматографическом разделении белково-пептидных веществ супернатанты, полученные из мышц деакклимированных и акклимированных *C. auratus* (табл. 2), содержат 9 и 7 фракций. У акклимированных особей *C. auratus* отсутствуют низкомолекулярные пептиды (пики В₁ и Е) с М $(14,1 \pm 0,3) \cdot 10^2$ и $(6,75 \pm 0,25) \cdot 10^2$ Да, соответственно, что может быть связано с молекулярными механизмами адаптации представителей этого биологического вида к действию низких температур.

Следует отметить, что, кроме качественных модификаций, наблюдаются количественные изменения определенных фракций супернатантов из мышц карася серебряного *C. auratus* во время его акклимации и деакклимации (рис. 2). В частности сравнивая хроматографическое распределение низкомолекулярных пептидных веществ из мышц деакклимированных и акклимированных к холоду *C. auratus*, в последних отмечается существенное количественное увеличение (на 17,0 %) пика А₂ с М $(54,7 \pm 0,5) \cdot 10^2$ Да, что может быть связано с сезонными изменениями спектра пептидных веществ. Также следует отметить, что в процессе деакклимации карася серебряного *C.*

auratus наблюдается существенное увеличение количества пептидных фракций B₂ и D с M ($13,63 \pm 0,26$)·10² и ($8,69 \pm 0,21$)·10² Да на 9,6 и 15,1 % соответственно.

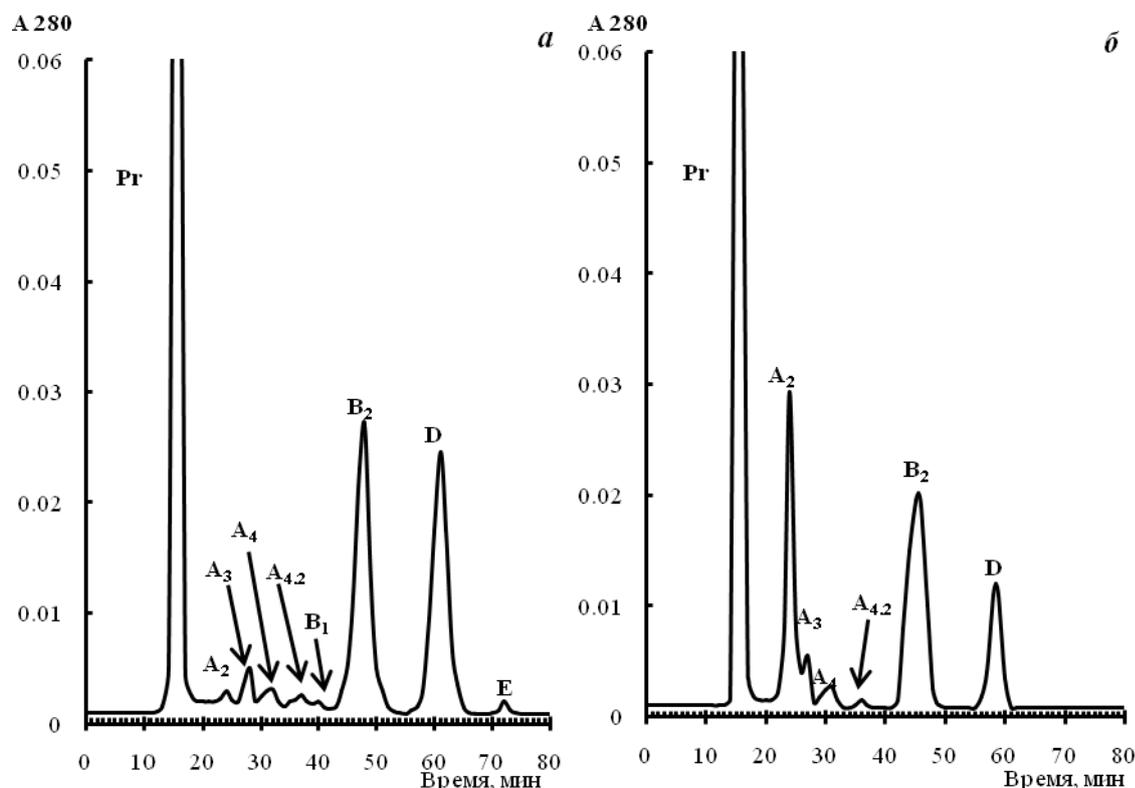


Рис. 2. Типичные хроматограммы разделения белково-пептидных фракций супернатантов из мышц *C. auratus*: а – деакклимированная рыба, б – акклимированная рыба.

Таблица 2

Средние значения хроматографических параметров белково-пептидных фракций супернатантов из мышц карася серебряного *C. auratus*

Пик	Средняя молекулярная масса фракции, ·10 ² Да	Деакклимированная рыба		Акклимированная рыба	
		Средняя площадь пика, ·10 ² мм ²	Площадь пика, %	Средняя площадь пика, ·10 ² мм ²	Площадь пика, %
Pr	≥ 120	2,2 ± 0,3	25 ± 4	2,90 ± 0,28	33 ± 3
A ₂	54,7 ± 0,5	0,1 ± 0,03	1,3 ± 0,4	1,59 ± 0,15*	18,3 ± 1,7*
A ₃	44,9 ± 0,4	0,2 ± 0,06	2,2 ± 0,7	0,2 ± 0,08	2,8 ± 0,9
A ₄	32,5 ± 1,4	0,1 ± 0,07	1,6 ± 0,8	0,1 ± 0,05	1,6 ± 0,6
A _{4.2}	23,15 ± 0,16	0,1 ± 0,04	1,2 ± 0,5	0,09 ± 0,03	1,1 ± 0,4
B ₁	14,1 ± 0,3	0,060 ± 0,021	0,71 ± 0,23	-	-
B ₂	13,63 ± 0,26	2,97 ± 0,21	35,6 ± 2,5	2,26 ± 0,13*	26,0 ± 1,5*
D	8,69 ± 0,21	2,68 ± 0,14	32,1 ± 1,7	1,48 ± 0,16*	17,0 ± 1,8*
E	6,75 ± 0,25	0,060 ± 0,021	0,72 ± 0,24	-	-
Общий выход веществ		8,3 ± 0,6		8,70 ± 0,27	

Примечание: n = 6, * – статистически значимые различия по сравнению с деакклимированной рыбой (p < 0,05).

При сравнительном анализе хроматографического разделения пептидов супернатантов из мышц *S. auratus* значительных количественных изменений пептидных фракций A_3 , A_4 и $A_{4,2}$ с M $(44,9 \pm 0,4) \cdot 10^2$, $(32,5 \pm 1,4) \cdot 10^2$ и $(23,15 \pm 0,16) \cdot 10^2$ Да не наблюдается (рис. 2).

Также были получены распределение белково-пептидных веществ супернатантов из печени карася серебряного *S. auratus* (рис. 3 и табл. 3). Качественный состав пептидных фракций супернатантов из печени холодоакклимированного и деакклимированного карася серебряного *S. auratus* имеет существенные отличия. При анализе молекулярно-массового распределения белково-пептидных веществ, установлено, что супернатанты из печени деакклимированных особей *S. auratus* содержат 8 фракций, а супернатанты из печени акклимированных *S. auratus* – 7 фракций. Основными фракциями, которые выявлены в акклимированных к холоду и деакклимированных *S. auratus*, являются фракции Pr, A_3 , C и E с $M \geq 120 \cdot 10^2$, $(46,7 \pm 1,5) \cdot 10^2$, $(11,5 \pm 0,4) \cdot 10^2$ и $(6,84 \pm 0,20) \cdot 10^2$ Да соответственно.

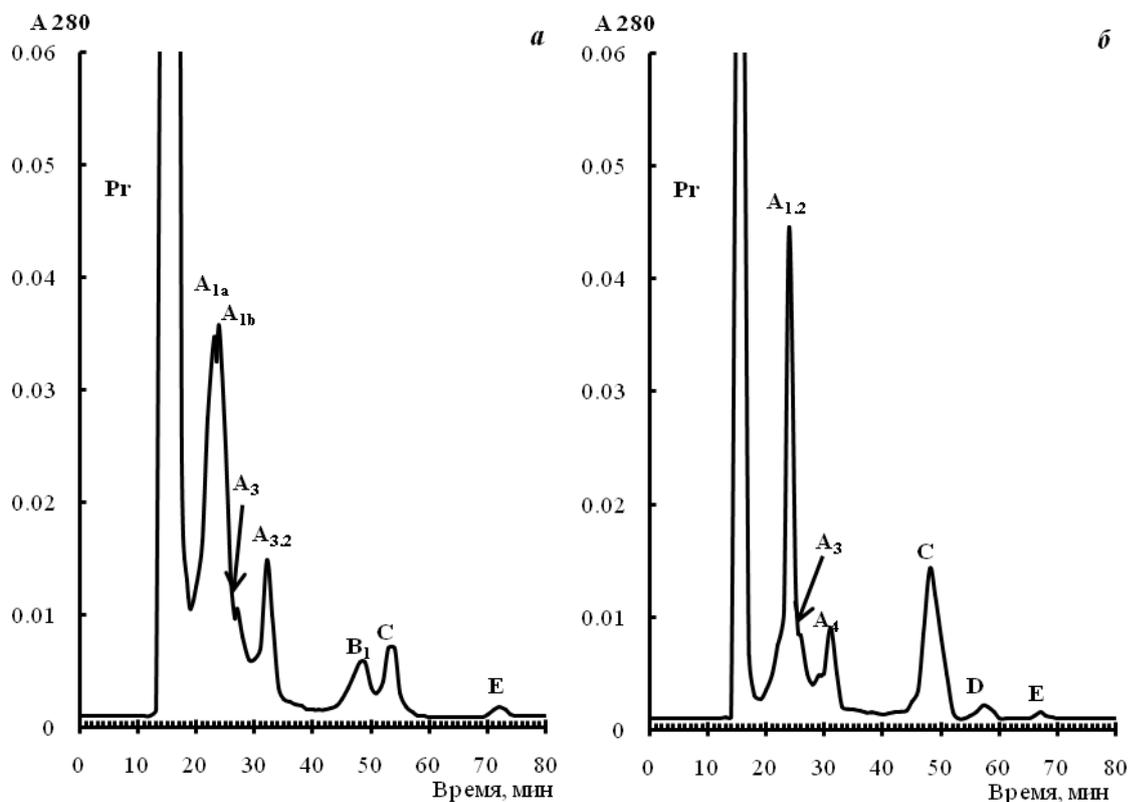


Рис. 3 Типичные хроматограммы разделения белково-пептидных фракций супернатантов из печени *S. auratus*: а – деакклимированная рыба, б – акклимированная рыба.

Следует отметить, что при деакклимации из спектра пептидных веществ печени *S. auratus* исчезают фракции $A_{1,2}$, A_4 и D с M $(56,9 \pm 0,7) \cdot 10^2$, $(31,2 \pm 1,5) \cdot 10^2$ и $(8,7 \pm 0,3) \cdot 10^2$ Да соответственно, которые присутствуют в акклимированных к холоду особей *S. auratus*. В свою очередь состав веществ пептидной природы из печени деакклимированных и акклимированных *S. auratus* отличается отсутствием в последних высокомолекулярных фракций A_{1a} , A_{1b} с M $(67,83 \pm 0,21) \cdot 10^2$ и $(64,2 \pm 0,3) \cdot 10^2$ Да и низкомолекулярных фракций $A_{3,2}$, B_1 с M $(34,1 \pm 1,0) \cdot 10^2$ и $(14,29 \pm 0,15) \cdot 10^2$ Да соответственно (рис. 3).

Таблица 3
Средние значения хроматографических параметров белково-пептидных фракций супернатантов из печени карася серебряного *C. auratus*

Пик	Средняя молекулярная масса фракции, $\cdot 10^2$ Да	Деакклимированная рыба		Акклимированная рыба	
		Средняя площадь пика, $\cdot 10^2$ мм ²	Площадь пика, %	Средняя площадь пика, $\cdot 10^2$ мм ²	Площадь пика, %
Pr	≥ 120	$27,2 \pm 2,4$	84 ± 7	$20,0 \pm 2,8$	77 ± 11
A _{1a}	$67,83 \pm 0,21$	$1,87 \pm 0,26$	$5,8 \pm 0,8$	-	-
A _{1b}	$64,16 \pm 0,26$	$1,76 \pm 0,19$	$5,4 \pm 0,6$	-	-
A _{1,2}	$56,9 \pm 0,7$	-	-	$3,45 \pm 0,24$	$13,3 \pm 0,9$
A ₃	$46,7 \pm 1,5$	$0,07 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,09$	$0,36 \pm 0,10^*$	$1,4 \pm 0,4^*$
A _{3,2}	$34,1 \pm 1,0$	$0,60 \pm 0,09$	$1,84 \pm 0,27$	-	-
A ₄	$31,2 \pm 1,5$	-	-	$0,41 \pm 0,11$	$1,6 \pm 0,4$
B ₁	$14,29 \pm 0,15$	$0,40 \pm 0,08$	$1,26 \pm 0,24$	-	-
C	$11,5 \pm 0,4$	$0,52 \pm 0,12$	$1,6 \pm 0,4$	$1,65 \pm 0,18^*$	$6,3 \pm 0,7^*$
D	$8,7 \pm 0,3$	-	-	$0,1 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,19$
E	$6,84 \pm 0,20$	$0,06 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,09$	$0,08 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,16$
Общий выход веществ		$32,5 \pm 1,2$		26 ± 3	

Примечание: n = 6, * – статистически значимые различия по сравнению с деакклимированной рыбой ($p < 0,05$).

В результате сравнительного анализа установлено, что в акклимированного к низким температурам карася серебряного *C. auratus* наблюдается увеличение количества пептидов с М ($11,5 \pm 0,4$) $\cdot 10^2$ Да в 4,0 раза по сравнению с деакклимированной рыбой.

Обнаруженные качественные и количественные изменения пептидного состава супернатантов, полученных из тканей мышц и печени карася серебряного *C. auratus* в процессе холодовой акклимации могут быть связаны с молекулярными механизмами адаптации данного биологического вида к неблагоприятным условиям среды обитания, а именно к изменению температурных условий.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в настоящей работе на примере двух представителей различных видов животных, а именно карася серебряного *Carassius auratus* (Тип: Хордовые) и большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* (Тип: Членистоногие), показано, что спектр пептидов холодоустойчивых организмов при низкотемпературной адаптации претерпевает модификации, что является одной из молекулярных стратегий адаптации к холоду данных биообъектов.

Установлено, что в процессе холодовой адаптации личинок *T. molitor* происходит уменьшения общего содержания пептидов и количества пептидных фракций. В тоже время у более высокоорганизованных животных *C. auratus* при холодовой адаптации наблюдаются вариации пептидов в различных органах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Biochemistry of fish antifreeze proteins / P. L. Davies, C. L. Hew // The FASEB J. – 1990. – V. 4, № 8. – P. 2460–2468.

2. Antifreeze glycopeptides and peptides in Antarctic fish species from the Weddell Sea and the Lazarev Sea / A. P. A. Wohrmann // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1996. – V. 130. – P. 47–59.
3. Compound ice-binding site of an antifreeze protein revealed by mutagenesis and fluorescent tagging / C. P. Garnham, A. Natarajan, A. J. Middleton [et al.] // *Biochemistry.* – 2010. – V. 49, № 42. – P. 9063–9071.
4. Functional validation of hydrophobic adaptation to physiological temperature in the small heat shock protein α A-crystallin / M. Posner, A. J. Kiss, J. Skiba [et al.] // *PLOS ONE.* – 2012. – V. 7, № 3. – e34438.
5. Environmental effects on antifreeze levels in larvae of the darkling beetle, *Meracantha contracta* / J. G. Duman // *J. Exp. Zool.* – 1977. – V. 201, № 2. – P. 333–337.
6. Factors involved in overwintering survival of the freeze tolerant beetle, *Dendroides Canadensis* / J. G. Duman // *J. Comp. Physiol.* – 1980. – V. 136, № 1. – P. 52–59.
7. Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect / S. P. Graether, M. J. Kuiper, S. M. Gagne [et al.] // *Nature.* – 2000. – V. 406, № 6793. – P. 325–328.
8. Comparative overwintering physiology of Alaska and Indiana populations of the beetle *Cucujus clavipes* (Fabricius): roles of antifreeze proteins, polyols, dehydration and diapauses / V. A. Bennett, T. Sformo, K. Walters [et al.] // *J. Exp. Biol.* – 2005. – V. 208, № 23. – P. 4467–4477.
9. Microfluidic experiments reveal that antifreeze proteins bound to ice crystals suffice to prevent their growth / Y. Celik, R. Drori, N. Pertaya-Braun [et al.] // *PNAS.* – 2013. – V. 110, № 4. – P. 1309–1314.
10. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria / J. A. Gilbert, P. J. Hill, C. E. Dodd [et al.] // *Microbiology.* – 2004. – V. 150, № 1. – P. 171–180.
11. Antifreeze protein activity in Arctic cryoconite bacteria / P. Singh, Y. Hanada, S. M. Singh [et al.] // *FEMS Microbiol Lett.* – 2014. – V. 351, № 1. – P. 14–22.
12. Activity–stability relationships in extremophilic enzymes / S. D’Amico, J. C. Marx, C. Gerday [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278, № 10. – P. 7891–7896.
13. Protein destabilization at low temperatures / F. Franks // *Adv. Prot. Chem.* – 1995. – V. 46. – P. 105–139.
14. The stability of proteins in extreme environments / R. Jaenicke, G. Böhm // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1998. – V. 8, № 6. – P. 738–748.
15. Molecular characterization of cold adaptation of membrane proteins in the *Vibrionaceae* core–genome / T. Kahlke, S. Thorvaldsen // *PLOS ONE.* – 2012. – V. 7, № 12. – e51761.
16. Скоупс Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс [пер. с англ. проф. В. К. Антонова]. – М.: Мир, 1985. – 358 с. / Skoups R. Metody ochistki belkov / R. Skoups [per. s angl. prof. V. K. Antonova]. – М.: Mir, 1985. – 358 s.
17. Бидлингмейер Б. Препаративная жидкостная хроматография / Б. Бидлингмейер – М.: Мир, 1990. – 360 с. / Bidlingmejer B. Preparativnaya zhidkostnaya hromatografiya / B. Bidlingmejer. – М.: Mir, 1990. – 360 s.
18. Seasonal Adaptations in Arctic Insects / H.V. Danks // *Integr. Comp. Biol.* – 2004. – V. 44, № 2. – P. 85–94.
19. Cold adaptation in insects of Central Yakutia / N. G. Li, A. I. Averenskii // *Biophysics.* – 2007. – V. 52, № 4. – P. 436–439.
20. Amino Acid Substitutions in Cold-Adapted Proteins from *Halorubrum lacusprofundi*, an Extremely Halophilic Microbe from Antarctica / S. DasSarma, M. D. Capes, R. Karan [et al.] // *PLOS ONE.* – 2013. – V. 8, № 3. – e58587.
21. Вплив низьких температур на фенотипічні ознаки і білок-синтезуючий апарат холодостійких жуків *Tenebrio molitor* на різних стадіях розвитку: автореф дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.19 «Кріобіологія і кріомедицина» / Л. І. Реліна. – Харків, 1999. – 16 с. / Vplyv nyz'kykh temperatur na fenotypichni oznaky i bilok-syntezyuyuchyj aparat holodostijkykh zhukiv *Tenebrio molitor* na riznyh stadiyah rozvytku: avtoref. dis. na zdobuttya nauk. stupenya kand. biol. nauk: spec. 03.00.19 «Kriobiologiya i kriomedycyna» / L. I. Relina. – Harkiv, 1999. – 16 s.
22. Структурні та метаболічні особливості тканин карася сріблястого *Carassius auratus* в умовах температурної аклімації: автореф дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.19 «Кріобіологія» / О. Г. Погожих. – Харків, 2010. – 17 с. / Strukturni ta metabolichni osoblyvosti tkanyn karasya sriblyastogo *Carassius auratus* v umovah temperaturnoi' aklimacii': avtoref. dis. na zdobuttya nauk. stupenya kand. biol. nauk: spec. 03.00.19 «Kriobiologiya» / O. G. Pogozhyh. – Harkiv, 2010. – 17 s.
23. Synthesis of an antifreeze glycoprotein analogue: efficient preparation of sequential glycopeptide polymers / T. Tsuda, S.-I. Nishimura // *Chem. Commun.* – 1996. – P. 2779–2780.
24. Type I 'antifreeze' proteins - Structure-activity studies and mechanisms of ice growth inhibition / M. M. Harding, L. G. Ward, A. D. J. Haymet // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – V. 264. – P. 653–665.
25. 'Antifreeze' glycoproteins from polar fish / M. M. Harding, P. I. Anderberg, A. D. Haymet // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – V. 270, № 7. – P. 1381–1392.
26. Insect capa neuropeptides impact desiccation and cold tolerance / S. Terhzaz, N. M. Teetsb, P. Cabreroa [et al.] // *PNAS.* – 2015. – V. 112, № 9. – P. 2882–2887.