

УДК 597.0/5-15

## О ЕСТЕСТВЕННОМ РЕПЕЛЛЕНТЕ КОЖИ КАРПОВЫХ РЫБ

Н. Е. Лебедева, Г. А. Малюкина, А. О. Касумян

(Кафедра иктиологии Московского государственного университета)

Из кожи голяна *Phoxinus phoxinus* (L.) методом препаративной гель-хроматографии на сефадексе выделяли естественный обонятельно-активный репеллент. Показано наличие в водном экстракте кожи 3 групп веществ с различной репеллентной активностью. Выявлена фракция, характеризующаяся максимальной репеллентной активностью, и установлены ее некоторые физико-химические свойства. Рассматриваются свойства и репеллентное действие 2 других фракций. Показано изменение свойств фракции в зависимости от различного физиологического состояния организма и сезонов года.

Известно, что для формирования поведения многих рыб запахи естественного происхождения имеют большое значение. Одним из видов таких реакций является оборонительное поведение, наблюдающееся при действии веществ, выделяющихся из кожи самих рыб при ее повреждении. Впервые обнаруженная Фришем (Frisch, 1938) у голянов *Phoxinus phoxinus* (L.), эта реакция впоследствии была описана для многих видов рыб (Frisch, 1941; Грбачек, 1953; Малюкина и др., 1969, 1973; Noble, 1939; Schutz, 1956; Verhejen, 1956; Pfeiffer, 1960, 1961, 1961a, 1963, 1963a, 1963b, 1967, 1967a). Различаясь деталями у рыб разных видов, эта реакция «испуга» или «тревоги» всегда характеризуется возбуждением животных и побегом их от места действия раздражителя. Осуществляемая исключительно посредством обоняния, реакция обеспечивает защитное поведение рыб в ответ на химический сигнал опасности. Вещества, обуславливающие этот вид оборонительного поведения, были названы «веществами испуга».

Исследованиями, проведенными на большом числе видов, было показано, что «вещества тревоги» обладают межвидовой эффективностью, однако максимальное действие они оказывают на особей своего вида (Frisch, 1941; Schutz, 1956; Pfeiffer, 1963b). Гистологическое изучение кожи рыб, обнаруживающих эту оборонительную реакцию, показало наличие в ней специализированных колбовидных клеток, не имеющих связи с поверхностью тела; в них осуществляется синтез и депонирование естественного репеллента (Pfeiffer et al., 1971).

Изучение химической природы «вещества тревоги» было начато Хюттелем (Huttel, 1941), который, пользуясь методом бумажной хроматографии, предпринял попытку выделить и идентифицировать активные вещества кожи. В 1943 г. Хюттель и Спренглинг (Huttel, Sprengling, 1943), исследуя свойства вещества, выделенного из кожи рыб сем. Cyprinidae, показали, что по своему строению оно принадлежит к птеринам и близко изоксантоптерину. Молекулярный вес его равен 253, оно имеет максимум поглощения в ультрафиолетовой области около 280 нм и обладает синеволетовой флуоресценцией. Это вещество было названо авторами иктиоптерином. Кауфманом (Kaufmann, 1959), методом хроматографии на бумаге, было показано, что выделенный им из кожи золотой рыбки иктиопте-

рин близок синтезированному (Korte, Tschesche, 1954; Tschesche, Glaser, 1958) ихтиотерину, представляющему собой 6-( $\alpha$ ,  $\beta$ -дигидрооксипропил)изоксантоптерин.

Последующие детальные исследования (Schutz, 1956) реакций рыб на водные экстракты кожи и ихтиотерин показали, что последний вызывал значительно меньший эффект (или не вызывал совсем), чем цельный экстракт кожи. Автор приходит к выводу, что ихтиотерин нельзя идентифицировать с естественным репеллентом кожи рыб. Впоследствии этот вывод был поддержан Пфейфером (Pfeiffer, 1963б).

Таким образом, вопрос о естественном репелленте кожи рыб до настоящего времени остается открытым. В настоящей работе, являющейся продолжением и развитием проводимых нами исследований значения химической сигнализации в поведении рыб, предпринята попытка поиска и выделения активного репеллента кожи карповых рыб и исследование некоторых его свойств.

### Материал и методика

Исследования проводили на гольяне *Phoxinus phoxinus* (L.), в опытах было использовано 1496 особей. Для выделения активного репеллента из кожи нами был выбран метод препаративной гель-хроматографии на сефадексе, позволяющий разделять вещества по молекулярному весу, не изменяя их структуры.

Во всех опытах использовали водный экстракт кожи, позволяющий выделить репеллент в нативном состоянии. С обездвиженной рыбы снимали кожу (150 мг), тщательно очищали ее от слизи, мышц и подкожной клетчатки и гомогенизировали в фарфоровой ступке в 15 мл дистиллированной воды. Гомогенат центрифугировали 15 мин. при 4000 об/мин. Всю процедуру проводили на холоде. Хроматографирование экстракта проводили на сефадексе G-15, позволяющем разделять низкомолекулярные вещества, которые, как можно было предполагать на основании литературных данных (Хюттель, Спренглинг, 1943; Pfeiffer, Lemke, 1973), обладают репеллентным действием. В опытах использовали стеклянную колонку, соотношение высоты к диаметру которой составляло 60:1; объем колонки 33 мл. Элюирующим раствором служил фосфатный буфер с pH 6,8; 0,35 М, ионной силой 0,142  $mk z^2$ . Идентификацию веществ, поглощающих ультрафиолетовый спектр, проводили в проточной кювете детектора (Лебедина, 1975). Изменение поглощения ультрафиолетового (УФ) света фиксировали самописцем. Процентное соотношение фракций рассчитывали методом площадей, используя планиметр ПП-2. Для определения молекулярных весов полученных фракций строили калибровочную кривую, применяя в качестве стандартов коммерческие препараты различных веществ.

Концентрирование полученных при хроматографировании фракций для длительного их хранения в неизменном виде проводили методом высушивания из замороженного состояния (лиофилизация). Тестирование фракций на поведение гольянов проводили по методике, предложенной Е. А. Марусовым (Малюкина и др., 1973). Эксперимент вели в проточном аквариуме размером 114×19×20 см. Для опытов использовали стайку гольянов из 7–8 одноразмерных особей. Всего было поставлено 93 поведенческих опыта на 680 особях гольяна. Оборонительная реакция подопытной стаи рыб выражалась в том, что спокойно плавающие рыбы поворачиваются против течения и группируются в плотную стайку. Затем резко бросаются вниз по течению, беспорядочно мечутся по отсеку и затаиваются плотной стайей у дна. Длительность затаивания колеблется от одной до нескольких минут. Величины оборонительных реакций оценивали по 6-балльной шкале Фриша. Тестированию подвергался весь элюат, выходящий из хроматографической колонки, по миллилитрам.

Для дальнейшей идентификации репеллентного начала, полученного после хроматографического разделения, использовали метод электрофореза

в полиакриламидном геле. Электрофорез проводили по Дэвису (Davis, 1964) с некоторыми изменениями.

Спектры флуоресценции и ультрафиолетового поглощения фракций и водного экстракта кожи получены на приборах Hitachi MPF-2A Fluorescence spectrophotometer, Hitachi 121 spectrophotometer, Hitachi EPS-3T spectrophotometer. Все спектральные измерения проводили при температуре исследуемых растворов 20°.

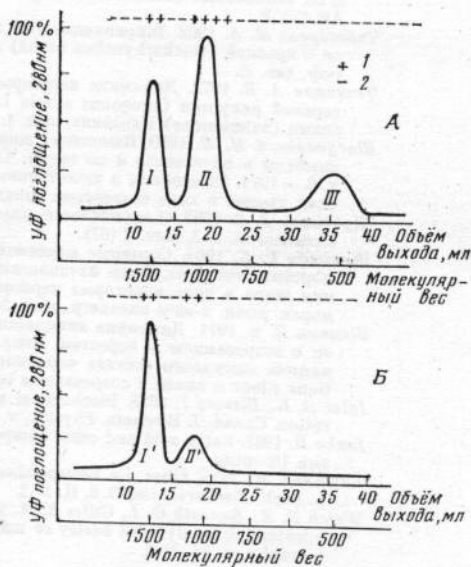


Рис. 1. Гель-хроматограмма водного экстракта кожи гольяна (А) и I фракции (Б). 1 — есть оборонительная реакция; 2 — нет оборонительной реакции. I, II, III, I' и II' — номера фракций

Содержание белка в коже определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951). Интенсивность окраски измеряли на спектрофотометре СФ-4А при длине волны 750 нм. Углеводы определяли с антроновым реактивом (Диппе, 1967). Качественный состав липидов в пробах исследовали методом тонкослойной хроматографии. Экстракцию липидов из проб проводили смесью хлороформ — этанол в соотношении 2:1. Растворителем служила смесь петролейного эфира, серного эфира и ледяной уксусной кислоты (90:10:1). Идентификация велась по Шталю (Хроматография в тонких слоях, 1965). Определение количественного содержания некоторых минеральных элементов в пробах проводили на пламенном фотометре.

### Результаты исследований

При хроматографическом разделении водного экстракта кожи гольяна получено 3 фракции, поглощающие УФ-свет в области 280 нм (рис. 1, А). Вещества, входящие в состав I, II и III фракций, составляют соответственно  $30 \pm 5$ ;  $51 \pm 5$  и  $19 \pm 5$ % всех веществ кожи, поглощающих УФ-свет в этой области. У полученных фракций определены следующие молекулярные веса: I фракция — больше 1500; II — около 1100 (1200—950) и III — около 490 (500—350). На основании расчетов коэффициентов

распределения веществ фракций между водой в гранулах геля и водой, окружающей гранулы ( $K_p$ ), можно предположить, что в состав I фракции входят высокомолекулярные биополимеры ( $K_p=0$ ); вещества III фракции ( $K_p=1,4$ ) обладают способностью образовывать непрочные комплексы с различными гидрофильными молекулами; вещества II фракции имеют  $K_p=0,4$ . Ихтиоптерин, который, по мнению ряда авторов (Хюттель,

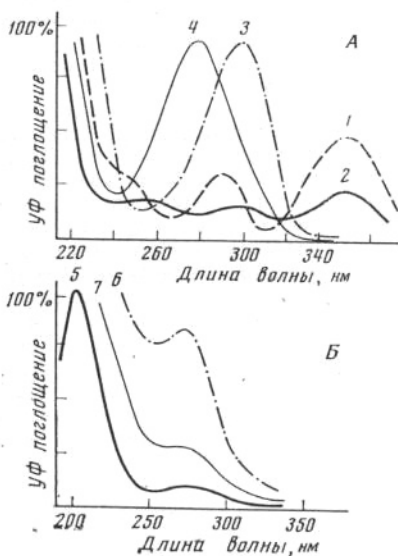


Рис. 2. Спектры ультрафиолетового (УФ) поглощения веществ II и III фракций при различном pH раствора (А) и веществ I и II фракций (Б). 1 — III фракция в водном растворе; 2 — III фракция в растворе 0,1 н. HCl; 3 — II фракция в водном растворе; 4 — II фракция в растворе 0,1 н. HCl; 5 — I фракция; 6 — I фракция при более высокой чувствительности прибора; 7 — II фракция

Спренглинг, 1943; Pfeiffer, Lemke, 1973), обладает репеллентными свойствами, имеет молекулярный вес в пределах молекулярных весов веществ, входящих в III фракцию. Для выявления наличия птеринов в III фракции были исследованы некоторые физико-химические свойства веществ последней, такие, как способность поглощать УФ-свет (спектры поглощения) и спектр флуоресценции. Спектр поглощения вещества III фракции (рис. 2, А) имеет характерные максимумы и минимумы поглощения. Полученные экстремальные значения поглощения УФ-света веществами III фракции были сопоставлены с имеющимися в литературе спектральными характеристиками ихтиоптерина, изученными Циглер-Гюнтером (Zigler-Gunter, 1956) и Кауфманом (1959).

Таблица 1

Экстремальные значения ультрафиолетового поглощения ихтиоптерина II и III фракций

Экстремум, нм	Вещество			Экстремум, нм	Вещество		
	ихтиоптерин	III фракция	II фракция		ихтиоптерин	III фракция	II фракция
$\lambda^1_{\max}$	343	345	—	$\lambda^3_{\max}$	257	257	—
$\lambda^1_{\min}$	303	307	—	$\lambda^3_{\min}$	251	244	—
$\lambda^2_{\max}$	289	292	295	$\lambda^4_{\max}$	242	205	205
$\lambda^2_{\min}$	272	276	250				

Экстремальные значения спектральных характеристик ихтиоптерина и веществ III фракции очень близки (табл. 1). Следует отметить и сходство характера спектров вещества III фракции и ихтиоптерина. Небольшой сдвиг в длинноволновую область УФ-света (на 2–4 нм) у веществ III фракции по сравнению с ихтиоптеринном, вероятно, связан с наличием сопутствующих веществ различной химической природы, входящих в ее состав. Полученные данные позволяют предполагать сходство и других свойств сравниваемых веществ.

Спектрофотометрирование при другом pH раствора (более кислом) (рис. 2, А) вызывает некоторый сдвиг спектра в длинноволновую область УФ (гипохромный сдвиг).

Птерины обладают характерным спектром флуоресценции — облучение их УФ светом с длиной волны 365 нм вызывает флуоресценцию в области 400–480 нм. В наших опытах для проверки присутствия птеринов в полученных фракциях проводили облучение их УФ-светом с длиной волны 365 нм. Это позволило обнаружить сильный сигнал флуоресценции с максимумом 440 нм и распространением на всю сине-фиолетовую область (400–480 нм). Отсутствие литературных данных о спектре флуоресценции ихтиоптерина не дало нам возможности сравнить его со спектром флуоресценции веществ III фракции. Флуоресценцию III фракции нам удавалось наблюдать и невооруженным глазом при облучении ее солнечным светом.

Спектры флуоресценции III фракции и водного экстракта нативной кожи идентичны и отличаются лишь более интенсивным сигналом у последнего (рис. 3, А). Таким образом, можно думать, что основная часть сине-фиолетовой флуоресценции кожи гольяна обусловлена веществами III фракции. Полученные данные хорошо коррелируют с положением, высказанным Хюттелем и Спренглингом (1943) о том, что ихтиоптерин обуславливает основную часть сине-фиолетовой флуоресценции кожи. Нашими опытами была обнаружена прямая зависимость между интенсивностью флуоресценции цельного экстракта кожи и величиной оборонительной реакции — репеллентной активностью (рис. 4). Таким образом, нами найдено, что вещества III фракции имеют молекулярный вес 350–550 (молекулярный вес птеринов 250–500), обладают характерным спектром поглощения УФ (спектр ихтиоптерина почти полностью идентичен ему), флуоресцируют в области 400–480 нм (ихтиоптерин флуоресцирует в той же области) и определяют основную часть флуоресценции кожи.

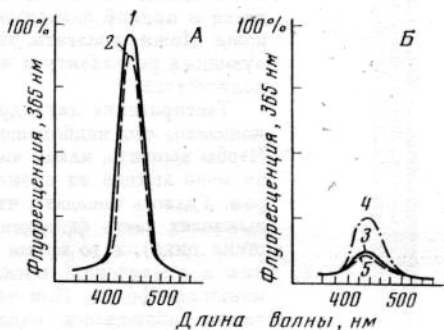


Рис. 3. Спектры флуоресценции цельного экстракта и III фракции (А) и I, II, III фракций (Б). 1 — цельный экстракт; 2 — III фракция; 3 — I фракция; 4 — II фракция; 5 — III фракция

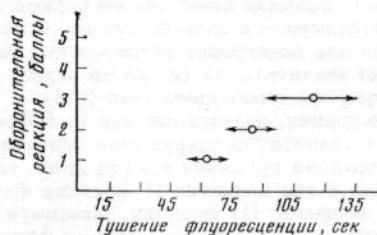


Рис. 4. Зависимость силы оборонительной реакции от интенсивности флуоресценции экстракта кожи гольяна

Фигурой оборонительной реакции — репеллентной активностью (рис. 4). Таким образом, нами найдено, что вещества III фракции имеют молекулярный вес 350–550 (молекулярный вес птеринов 250–500), обладают характерным спектром поглощения УФ (спектр ихтиоптерина почти полностью идентичен ему), флуоресцируют в области 400–480 нм (ихтиоптерин флуоресцирует в той же области) и определяют основную часть флуоресценции кожи.

Однако тестирование III фракции на оборонительное поведение не дало ни в одном опыте положительных результатов. Даже увеличение концентрации на порядок по сравнению со стандартными («нормальными») растворами, используемыми другими авторами (Frisch, 1941) не вызывало эффекта. Эти данные позволяют думать, что вещества III фракции не обладают репеллентной активностью. Вместе с тем, как отмечалось выше, наши опыты показали, что интенсивность оборонительной реакции находится в прямой зависимости от силы флуоресценции цельного экстракта кожи. Можно полагать, что флуоресцирующие вещества являются сопутствующими репелленту и находятся с ним в экстракте в пропорциональных количествах.

Тестирование двух других фракций, полученных при хроматографии, показало, что наибольшей активностью обладают вещества II фракции. Чтобы выявить, какая часть II фракции наиболее активна, всю фракцию по мере выхода из хроматографической колонки собирали по миллилитрам. Удалось показать, что наибольшую по силе оборонительную реакцию вызывает часть фракции, соответствующая максимуму поглощения (вершина пика), в то время как части фракции, соответствующие уменьшению и увеличению поглощения (подъем и спад пика), дают в 2 раза меньший эффект. При тестировании I фракции оборонительная реакция также наблюдалась, однако она была очень нестабильна (50% опытов) и невелика по силе. Предположив, что причиной этого может быть малая концентрация репеллента в I фракции, мы попытались увеличить ее применением лиофилизации. По нашим предварительным данным, а также данным Пфейфера и Лемке (Pfeiffer, Lemke, 1973), лиофилизация не влияет на активность репеллента.

Оказалось, что увеличение концентрации веществ I фракции в 3 раза (примерно от 500 мг кожи) вызывает оборонительную реакцию в 100% опытов. Однако по своей силе она никогда не превышала 2 баллов (в среднем была равна 1 баллу), тогда как реакции на II фракции всегда равнялись 4–5 баллам.

Наряду с биологическим тестированием I и II фракций исследовали их физико-химические свойства. Было обнаружено, что спектры их УФ поглощения различаются по своему характеру как между собой, так и от спектра III фракции (рис. 2, А и В). Спектр I фракции имеет характеристики, присущие спектру белков (максимум 205 и 278 нм и минимум 258 нм). УФ-спектр II фракции имеет тот же первый максимум в области 205 нм, а второй максимум — в области 295 нм, с минимумом в области 250 нм. Применение для спектрофотометрирования растворителя с более низким рН вызывает значительный (на 25 нм) сдвиг в более коротковолновую область ультрафиолетового света (рис. 2, А).

Спектры флуоресценции, полученные для I и II фракций (рис. 3), показали наличие в них слабофлуоресцирующего вещества, причем флуоресценция веществ I фракции примерно в 5 раз ниже, чем II фракции, т. е. едва заметна. Вместе с тем вещества II фракции флуоресцируют в 25–30 раз слабее, чем вещества III фракции. Максимум флуоресценции веществ I и II фракций совпадают с максимумами флуоресценции вещества III фракции и экстракта кожи. Эти данные свидетельствуют о том, что флуоресценция в коже обусловлена не только низкомолекулярными веществами, в частности птеринами, но и веществами со значительно большим молекулярным весом. Возможно, небольшая часть других флуоресцирующих веществ кожи находится в связанном состоянии с некоторыми гидрофильными веществами I и II фракций и обуславливает их флуоресценцию. Однако это предположение требует специальных исследований.

Таким образом, по спектральным характеристикам и молекулярному весу полученный нами репеллент, находящийся во II фракции, отличается от ранее найденного репеллента птериновой природы (Хюттель, Спренглинг, 1943). Можно полагать, что использование водных экстрактов кожи,

а также отсутствие каких-либо химических воздействий обусловили в наших опытах выделение репеллента из кожи в нативном состоянии, тогда как другие исследователи (Хюттель, Спренглинг, 1943; Кауфман, 1959; Пфейфер, Лемке, 1973; Schutz, 1956) для выделения репеллента из кожи и последующего элюирования использовали уксусную кислоту, а для хроматографирования — бутанолуксусно-водный раствор, которые могут разрушить структуру репеллента и изменить его свойства. Так, например, об изменении свойств репеллента при подкислении среды свидетельствует гипохромный сдвиг его УФ-спектра.

Выше мы высказали предположение о наличии комплексов репеллента в I и II фракциях. Для проверки этого предположения фракции подвергались повторному хроматографированию на сефадексе для разрушения неустойчивых комплексов. Разделение веществ, входящих в состав II фракции, в данных условиях эксперимента не произошло. Вещества I фракции при повторном хроматографировании на сефадексе разделялись на 2 фракции: I' — высокомолекулярную (молекулярный вес более 1500) и II' — с меньшим молекулярным весом, 1100 (рис. 1, B). Близость молекулярных весов I и I' фракций объясняется тем, что они содержат большую группу веществ, молекулярный вес которых превышает 1500. Сходство же веществ, входящих в состав II и II' фракций, ограничивается только молекулярным весом, тогда как их спектры УФ поглощения различны (рис. 2, B). Кроме того, вещества этих фракций отличаются по способности сорбироваться на высокомолекулярных соединениях.

Спектры флуоресценции II и II' фракций не отличаются по области флуоресценции, а лишь по ее интенсивности. Здесь уместно напомнить, что все полученные из кожи гольяна группы веществ — фракции, несмотря на различие ряда свойств, характеризуются одной и той же областью флуоресценции (рис. 3). Таким образом, нами было показано, что в экстракте кожи содержится не одно, а несколько групп веществ, способных к флуоресцированию. Эти данные подтверждают результаты Шутца (Schutz, 1965), Пфейфера и Лемке (1973), получивших из экстракта кожи гольяна 4 и 7 флуоресцирующих фракций соответственно, причем менее половины этих фракций обладают репеллентным действием. В наших опытах оборонительную реакцию не вызывают вещества III фракции, которые, однако, обуславливают основную флуоресценцию экстракта. В связи с этим мы считаем, что использовать флуоресценцию как естественную метку репеллента при его выделении из кожи, как это делает ряд авторов, нецелесообразно, поскольку флуоресценция не является отличительной чертой репеллента. Флуоресценты кожи, как можно думать, — в основном вещества, сопутствующие репелленту, и находятся с ним в коже в пропорциональных количествах.

Тестирование I' и II' фракций на поведение показало, что каждая из них вызывает четкую оборонительную реакцию подопытных рыб. Однако репеллентное действие I' фракции сильнее, чем у II'. В поведенческих опытах удалось также показать, что соединение веществ I' и II' фракций оказывает больший репеллентный эффект, чем каждая в отдельности. В этих опытах, чтобы избежать концентрационного эффекта, каждую фракцию при суммарном их тестировании брали в объеме, вдвое меньшем, чем при индивидуальном испытании.

В следующей серии опытов, чтобы выявить однородна ли I' фракция, она была подвергнута повторному хроматографированию. Были обнаружены 2 группы веществ — I'' и II'', имеющие молекулярный вес больше 1500 и 1100 соответственно. По своему характеру хроматограмма была сходна с хроматограммой, полученной при разделении исходной I фракции. Изменялось лишь процентное соотношение фракций: если в случае разделения I фракции оно составляло 67 и 33% для высоко- и низкомолекулярных веществ соответственно, то в I' фракции оно составило 91 и 9% для таких же групп веществ.

Таким образом, опыты показали, что высоко- и низкомолекулярные вещества, входящие в состав I фракции, образуют неустойчивые комплексы, распад которых происходит ступенчато. Фракции, полученные в результате повторного хроматографирования I фракции, обладают репеллентной активностью.

Подобные результаты были получены нами и в опытах с трипсином, вызывающим гидролитическое расщепление белковых комплексов. После инкубирования I фракции в течение 2 час. с трипсином и последующей гель-хроматографии смеси были получены 2 группы веществ — с молекулярным весом более 1500 и около 1100. Из них лишь последняя фракция вызывала четкую оборонительную реакцию.

Свойства репеллента исследовали также методом электрофореза в полиакриламидном геле. Удалось показать, что репеллентной активностью обладает элюат нижней четверти столбика геля, содержащей около 6 белков с максимальной электрофоретической подвижностью. Репеллентно-активный элюат при хроматографии на сефадексе разделялся на 2 группы веществ: с молекулярным весом больше 1500 и около 1100.

Обнаруженная нами репеллентная активность высокомолекулярных веществ, входящих в состав I фракции, согласуется с данными других авторов (Pfeiffer et al., 1971) о возможной белковой природе секрета колбовидных клеток кожи.

Для выяснения биохимического состава фракций нами было изучено наличие и количественное содержание в них основных классов органических соединений — белков, липидов, некоторых углеводов. Показано, что в I и II фракциях углеводы находятся в равных количествах, тогда как содержание в них белка различно и составляет 4:1 соответственно. Белки и углеводы в III фракции обнаружены не были. По своему липидному составу все фракции представляют сложную смесь из фосфолипидов, триглицеридов, холестерина, моно- и диглицеридов, свободных жирных кислот, витамина А и эфиров стероидов. Однако четких специфических различий между фракциями по липидному составу обнаружено не было. Измерение содержания некоторых минеральных элементов (Ca, Mg, Fe, Cu) выявило различия в распределении их по фракциям — содержание каждого элемента в среднем соответствовало процентному содержанию веществ, поглощающих УФ-свет.

Известно, что интенсивность оборонительных реакций при действии экстракта кожи претерпевает заметные колебания, снижаясь зимой и вновь возрастая летом (Малюкина и др., 1973). В связи с этим можно предполагать, что сезонные изменения оборонительной реакции обусловлены изменениями состава (количественного и качественного) и свойств веществ репеллентно-активных фракций и экстракта кожи. Нами были ранее показаны также (Лебедева, Бурлаков, 1971; Бурлаков, Лебедева, 1972) методом электрофореза в полиакриламидном геле значительные сезонные изменения количества белков экстракта кожи голяяна, их электрофоретической подвижности, а также концентрации их в различных фракциях. Эти изменения касаются, в частности, и быстроподвижных белков, находящихся в нижней (анодной) четверти геля, элюат которой вызывает оборонительную реакцию. Показаны также сезонные изменения состава фракций кожи голяяна. Так, было обнаружено, что процентное соотношение I фракции от лета к зиме уменьшается с  $30 \pm 5$  до  $19 \pm 5$ %, а III фракции увеличивается соответственно с  $19 \pm 5$  до  $31 \pm 5$ %. Процентное соотношение веществ II фракции остается почти без изменений:  $51 \pm 5$ % летом,  $50 \pm 5$ % зимой. Кроме того, изменяется соотношение между веществами I' и II' фракций: летом II' фракция составляет 33%, а зимой — лишь 11%.

Некоторые сезонные изменения характера спектра УФ-поглощения были отмечены нами для веществ II и III фракций. Для веществ II фракции они выражены в изменении интенсивности максимумов поглощения,



а для веществ III фракции — в раздвоении максимума в коротковолновой области спектра. УФ спектры веществ I фракции стабильны и не показывают сезонных изменений. К числу стабильных в течение всего года свойств фракций можно отнести значения величины молекулярного веса веществ, входящих в состав фракций, и их спектры флуоресценции. Кроме сезонных изменений на хроматографическую картину экстракта кожи и его фракций значительное влияние оказывает физиологическое состояние организма. Так, нам удалось показать, что при длительном лабораторном содержании голянов происходит изменение белкового состава кожи (увеличивается количество и процентное содержание быстроподвижных белковых фракций). Сильное возбуждение (стайку голянов гоняли несколько минут по аквариуму, пугая рыб) вызывает изменение количественного соотношения фракций (получаемых методом гель-хроматографии) — они становятся равными по величине.

Еще более резкие изменения происходят в составе экстракта кожи после смерти рыб. Несмотря на это, экстракты в течение некоторого времени сохраняют свою репеллентную активность (Frisch, 1941). Наши опыты с экстрактами кожи мертвых рыб, погибших в результате асфиксии в воде с низким содержанием кислорода, показали наличие в них репеллентной активности спустя 14 и даже 25 час. после смерти рыбы. Следует, однако, отметить, что сила реакции в последнем случае была в 2—3 раза ниже нормы. В хроматографической картине при этом наблюдали значительные изменения (табл. 2).

Таблица 2

*Процентное содержание фракций кожи и некоторые свойства цельного экстракта кожи в норме и после смерти рыбы*

Показатель	Норма	Время после смерти, час	
		14	25
I фракция, %	30	53	77
II »	51	28	23
III »	19	19	—
Флуоресценция цельного экстракта кожи, сек.	50	18	7
Сила оборонительной реакции, балл	3	1	Менее 1

Таблица 2 показывает, что, несмотря на полное отсутствие через 25 час. веществ III фракции, оборонительная реакция сохраняется, снижаясь, однако, по интенсивности. Вместе с тем наблюдается зависимость между количеством веществ II фракции и силой реакции. Но несмотря на отсутствие веществ III фракции через 25 час. после смерти рыбы, экстракт кожи сохраняет способность флуоресцировать. Полученные данные — еще одно доказательство того, что не низкомолекулярные вещества (находящиеся в III фракции) обуславливают оборонительную реакцию рыб.

Таким образом, в экстракте кожи голяна нам удалось обнаружить 3 группы УФ-поглощающих веществ, различающихся по молекулярному весу. Более половины всех УФ-поглощающих веществ составляют соединения небелковой природы с молекулярным весом около 1100, которые обуславливают основную репеллентную активность (вещества II фракции). Эти репеллентно-активные вещества имеют характерные спектры УФ-поглощения и флуоресценции, однако химическая природа их еще до конца не установлена. Сложность биохимического состава основной репеллентно-активной фракции позволяет предполагать, что, вероятно, репеллентное действие может определяться не одним, а несколькими

(смесь) веществами, причем сдвиг силы оборонительной реакции в зависимости от времени года или физиологического состояния организма рыбы может обуславливаться изменениями состава и соотношения этих компонентов.

Вторая по количеству УФ-поглощающих веществ фракция (I фракция) содержит соединения с молекулярным весом более 1500. Обнаруженная нами репеллентная активность веществ этой фракции связана, видимо, комплексом их с низкомолекулярными соединениями (с веществами I' и I'' фракций). Весьма вероятно, что комплекс высокомолекулярных веществ с соединениями I' и I'' фракций осуществляет функцию депонирования репеллента для последующего пополнения его запасов в коже за счет разрыва нестойкой связи белок — репеллент. Не исключена также возможность присутствия в коже карповых рыб не одного, а по крайней мере двух или более веществ репеллентного действия. Это предположение основано на существенном различии спектров УФ-поглощения I и I' фракций.

В последней по количеству УФ-поглощающих веществ фракции (III фракции) содержатся соединения птериновой природы. Доказывает наличие их в III фракции диапазон молекулярных весов, входящих в состав, спектр их УФ-поглощения, область и интенсивность их флуоресцирования. Полученные нами данные позволяют сделать вывод, что в нативном состоянии вещества птериновой природы не вызывают оборонительной реакции у карповых рыб и, следовательно, не являются их репеллентами.

Поступила  
31.I.1974 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бурлаков А. Б., Лебедева Н. Е. 1972. Динамика водорастворимых белков некоторых тканей речного голяна. Матер. Всес. симпоз. «Энергетические аспекты роста и обмена водных животных». Киев, «Наукова думка».
- Грбачек Я. 1953. Химические вещества как возбудители реакции бегства у головастиков жабы и плотвы. Зоол. ж., т. 32, вып. 2.
- Душе З. 1967. Общие цветные реакции. В сб. «Методы химии углеводов». М., «Мир».
- Лебедева Н. Е. 1975. Прибор для регистрации белковых веществ в протоке. Биол. науки, № 5.
- Лебедева Н. Е., Бурлаков А. Б. 1971. Сезонные изменения белкового состава слизи и кожи голяна *Phoxinus phoxinus* (L.). Матер. II Всес. симп. «Летучие биологически активные соединения биогенного происхождения». Изд-во Моск ун-та.
- Малюкина Г. А., Девицина Г. В., Марусов Е. А. 1973. Общение рыб на основе хеморецепции. Ж. общей биол., т. 34, № 6.
- Малюкина Г. А., Дмитриева Н. Г., Марусов Е. А., Юркевич Г. В. 1969. Обоняние и его роль в поведении рыб. Зоология. Итоги науки. М., Изд. Всес. н.-и. ин-та научн. и техн. информ.
- Хроматография в тонких слоях. 1965. М., «Мир».
- Davis B. I. 1964. Disc electrophoresis. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, № 404.
- Frisch K., von, 1938. Zur Psychologie das Fischshwarmes. Naturwiss., v. 26, № 37.— 1941. Über einen Schreckstoff der Fischhaut und seine biologische Bedeutung. Z. vergl. Physiol., № 29.
- Huttel R. 1941. Die chemische Untersuchungen Schreckstoffes auf Elritzen Haut. Naturwissenschaften, № 29.
- Huttel R., Sprengling G. 1943. Über Ichthyopterin, einen blaufluoreszierenden Stoff aus Fischhaut. Liebigs Ann. Chem., № 554.
- Kauffmann T. 1959. Notiz über die Konstitution des Ichthyopterins. Liebigs Ann. Chem., № 625.
- Korte F., Tschesche R. 1951. Über Pteridine. V. Mitt. Die Konstitution des Ichthyopterins. Chem. Ber., v. 84, № 801.
- Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr H. L., Randall R. I. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., v. 193.
- Noble G. K. 1939. The experimental animal from naturalist's point of view. Amer. Naturalist, № 73.
- Pfeiffer W. 1960. Über die Schreckreaktion bei Fischen und die Herkunft des Schreckstoffes. Z. vergl. Physiol., v. 43, № 6.— 1961. Verbreitung der Schreckreaktion bei Fischen und die Herkunft des Schreckstoffes. Naturwiss. Rundschau, v. 14, № 9.— 1961a. Über die Schreckreaktion bei Fischen und die Herkunft des Schreckstoffes. Helgolander Wiss. Meere untersuch., v. 8, № 1.— 1963. The fright reaction in North

- American Fish. Canad. J. Zool., v. 41, № 1.— 1963a. Vergleichende Untersuchungen über des Schreckreaktion und den Schreckstoff der Ostariophysen. Z. vergl. Physiol., v. 47.— 1963b. Alarm substances. *Experientia*, v. 19, № 3.— 1967. Schreckreaktion und Schreckstoffzellen bei Ostariophysen und Gonorhynchiformes. Z. vergl. Physiol., v. 56, № 4.— 1967a. Schreckreaktion und Schreckstoffzellen bei Kneriidae und Phacotaemidae (Isospondyli, Pisces) *Naturwiss. Rundschau*, v. 54, № 7.
- Pfeiffer W., Lemke I.* 1973. Untersuchungen zur Isolierung und Identifizierung des Schreckstoffes aus der Haut der Elritze, *Phoxinus phoxinus* L. (Cyprinidae, Ostariophysen, Pisces). *J. Compar. Physiol.*, v. 82.
- Pfeiffer W., Sasse D., Arnold M.* 1971. Die Schreckstoffzellen von *Phoxinus phoxinus* und *Morulieus chrysophahedion* histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen. *Z. Zellforsch.*, v. 118, № 2.
- Schulz F.* 1956. Vergleichende Untersuchungen über die Schreckreaktion bei Fischen und deren Verbreitung. *Z. vergl. Physiol.*, v. 38, № 84.
- Tschesche R., Glaser A.* 1958. Über Pteridine. *Chem. Ber.*, v. 91.
- Verheijen F. I.* 1956. Transmission of a fight reaction amongst a shool of fish and the underlying sensory mechanism. *Experientia*, v. 12, № 5.
- Ziegler-Gunder I.* 1956. Untersuchungen über die Purin- und Pterinpigmente in der Haut und in den Augen der Weissfische. *Z. vergl. Physiol.*, v. 39.
-