

Напряжение кислорода в крови, скелетных мышцах и особенности тканевого метаболизма у кефали-сингиля в условиях экспериментальной гипотермии

UDC 591.128:597.556.333.7

A.A. SOLDATOV^{1*}, I.A. PARFYONOVA²

Oxygen Tension in Blood, Skeletal Muscles and Tissue Metabolism Peculiarities of *Liza aurata* Risso Under Experimental Hypothermia

В условиях эксперимента исследовано влияние температуры в диапазоне 1...15°C на напряжение кислорода и направленность метаболических процессов в скелетных мышцах кефали-сингиля (*Liza aurata* Risso). Показано, что гипотермия (5°C и ниже) вызывала развитие тканевой гипоксии. Она носила вторичный характер и проявлялась в увеличении числа гипоксических зон в мышечной ткани, снижении среднемышечного и венозного напряжения кислорода P_{O_2} . Это приводило к усилению анаэробных процессов в мышцах, о чем свидетельствовали увеличение содержания лактата, снижение уровня АТФ, а также уменьшение величины рН венозной крови. При температурах близких к 5°C в организме кефали-сингиля отмечали развитие компенсационных процессов, которые проявлялись в полном или частичном восстановлении напряжения кислорода в мышцах и венозной крови при параллельном подавлении анаэробных процессов. Их эффективность утрачивалась с понижением температуры, а при 1...2°C они выявлены не были.

Ключевые слова: гипотермия, скелетные мышцы, напряжение кислорода, тканевая гипоксия, анаэробные процессы, морские рыбы.

В умовах експерименту досліджено вплив температури в діапазоні 1...15°C на напруження кисню і спрямованість метаболічних процесів у скелетних м'язах кефалі-сингиля (*Liza aurata* Risso). Показано, що гіпотермія (5°C та нижче) викликала розвиток тканинної гіпоксії. Вона мала вторинний характер і виявлялася в збільшенні кількості гіпоксичних зон у м'язовій тканині, зниженні середньом'язового та венозного напруження кисню P_{O_2} . Це призводило до підсилення анаеробних процесів у м'язах, про що свідчили збільшення вмісту лактату, зниження рівня АТФ, а також зменшення значення рН венозної крові. За температур близьких до 5°C у організмі кефалі-сингиля відмічено розвиток компенсаційних процесів, які виявлялись у повному або частковому відновленні напруження кисню у м'язах і венозній крові при паралельному пригніченні анаеробних процесів. Їх ефективність втрачалась зі зниженням температури, а при 1...2°C їх не було виявлено.

Ключові слова: гіпотермія, скелетні м'язи, напруження кисню, тканинна гіпоксія, анаеробні процеси, морські риби.

Influence of temperature within 1...15°C range on oxygen tension and metabolic processes orientation in skeletal muscles of *Liza aurata* Risso was investigated under experiment conditions. It was shown, that hypothermia (5°C and lower) caused the development of tissue hypoxia. This phenomenon was of secondary character and was connected with increase of number hypoxic zones in a muscular tissue, decrease muscle and venous P_{O_2} . It resulted to activation of anaerobic in muscles. It reflects a rise of the lactate content, decrease of ATP level and also fall of pH value in venous blood. At temperatures close to 5°C in a mullet organism marked development of compensation processes. They have been shown in full or partial restoration P_{O_2} in muscles and venous blood at parallel suppression anaerobic processes. Their efficiency was lost with temperature fall. At 1...2°C they were not revealed at all.

Key-words: hypothermia, skeletal muscles, oxygen tension, tissue hypoxia, anaerobic processes, sea fishes.

Содержание теплолюбивых видов рыб при температуре воды ниже 5–7°C часто сопровождается развитием асфиксии. Это состояние нередко возникает у рыб на рыбоводных хозяйствах и является причиной массовой гибели посадочного материала [6, 11]. Данная реакция в определенной степени парадоксальна, так как развивается при снижении потребности организма в кислороде и повышении его растворимости в воде, тканевых и циркуляционных средах.

The keeping of homoiothermal fish species at water temperature below 5–7°C is frequently accompanied with the developing of asphyxia. This state appears as often as not in fish in fishing farms and is the cause of mass death of stocking material [6, 11]. This reaction is paradoxical in a certain extent, since it develops during reduction of organism need in oxygen and increase of its solubility in water, tissue and circulation media.

It has been shown that hypothermia may cause significant reorganization of tissue metabolism in

¹Институт биологии южных морей НАН Украины, г. Севастополь

²Севастопольский национальный технический университет

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: проспект Нахимова, 2, Севастополь Крым, Украина 99011; тел.:(+38 0692) 54-34-56; электронная почта: alekssoldatov@yandex.ru

¹Institute of Biology of the Southern Seas of the National Academy of Sciences of Ukraine, Sebastopol, Ukraine

²Sebastopol National Technical University, Sebastopol, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 2, Nakhimova ave., Sebastopol, Crimea, Ukraine 99011; tel.:+380 692 54 3456; e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Показано, что гипотермия может вызывать существенную реорганизацию тканевого метаболизма у пойкилотермов в направлении анаэробных процессов. В условиях гипотермии у рыб отмечено повышение содержания лактата при одновременном снижении уровня метаболитов цикла Кребса (оксалоацетата, малата, α -кетоглутарата) на фоне уменьшения суммы адениловых нуклеотидов и энергетического заряда клетки [1, 3].

Особый интерес представляет индукция образования HIF-1 (hypoxia inducible factor) в условиях низких температур [15]. Сравнительно недавно данный фактор был идентифицирован в плазме крови форелей [23]. Известно, что HIF-1, наряду с другими локусами генома, экспрессируется гипоксией [13, 17]. Это означает, что гипотермия должна изменять кислородный режим тканей.

Цель работы – исследование в условиях эксперимента влияния гипотермии на напряжение кислорода в скелетных мышцах, артериальной и венозной крови, а также содержание ряда тканевых метаболитов у кефали-сингиля.

Материалы и методы

В работе использовали взрослых особей кефали-сингиля (*Liza aurata* Risso) обоего пола в возрасте 3–4 лет в состоянии относительного физиологического покоя. Вес тела рыбы составлял 140–250 г, длина – 22–27 см.

Эксперименты были выполнены в аквариумах вместимостью 1,5 м³. Контрольную группу рыб содержали при температуре воды 15 ± 1 °C. В ходе опыта температуру снижали со скоростью 0,2 °C/ч от 15 до 1 °C, оставляя в процессе снижения группы особей при 10 ± 1, 5 ± 1 и 1 ± 1 °C. После этого исследовали адаптацию к указанным температурам в течение 40 суток. Регистрацию показателей, отбор проб крови и тканей проводили на 1–5, 14–15 и 41–46-е сутки содержания. В эксперименте каждой опытной группе рыб соответствовала контрольная.

Пробы артериальной и венозной крови получали соответственно пункцией дорсальной аорты (*aorta dorsalis*) и хвостовой вены (*vena caudalis*) в шприц под слой вазелинового масла [16]. Образцы мышечной ткани отбирали из большой белой боковой (*musculus lateralis magnus*) и поверхностной красной боковой (*musculus lateralis superficialis*) мышц, расположенных позади спинного плавника. В момент отбора проб и регистрации показателей применяли уретановую анестезию [9].

Напряжение кислорода в мышцах измеряли при помощи остеклованных платиновых микроэлектродов с диаметром кончика 4–6 мкм. Их изготавли-

вали пойкилотермы towards anaerobic processes. Under hypothermia in fish there has been noted a rise in the content of lactate at simultaneous reduction of Krebs cycle metabolite level (oxaloacetate, malate, α -ketoglutarate) on the background of the decrease in the sum of adenyly nucleotides and energetic cell charge [1, 3].

Of special interest is the induction of HIF-1 (hypoxia inducible factor) formation under low temperatures [15]. Quite recently this factor was identified in blood plasma of trout species [23]. It is known that HIF-1 along with other genome loci is hypoxia expressed [13, 17]. This means with hypothermia should change oxygen regimen of tissues.

The research aim is to study under experiment the effect of hypothermia on oxygen tensions in skeletal muscles, arterial and venous blood, as well as the content of some tissue metabolites in golden mullet.

Materials and methods

In the research there were used golden mullet adult individuals (*Liza aurata* Risso) of both sexes aged from 3 to 4 years in the state of relative physiological quiescence. The fish body weight was 140–250 g, the length was 22–27 cm.

The experiments were carried-out in 1.5 m³ aquariums. The control group of fish was maintained at temperature of water 15 ± 1 °C. During the experiment the temperature was reduced with the rate of 0.2 °C/h from 15 to 1 °C, remaining during the reduction the groups of individuals at 10 ± 1, 5 ± 1, 1 ± 1 °C. Afterwards there was investigated the adaptation to the mentioned temperatures for 40 days. The recording of the indices, blood and tissue sampling were performed to 1–5, 14–15, 41–46 keeping days. In the research each experimental group corresponded to the control.

The samples of arterial and venous blood was derived correspondingly by the puncture of dorsal aorta (*aorta dorsalis*) and caudal vein (*vena caudalis*) into a syringe under the layer of liquid petrolatum [16]. The samples of muscular tissue were derived from large white lateral (*musculus lateralis magnus*) and superficial red lateral (*musculus lateralis superficialis*) muscles located behind the back fin. At the moment of samples' deriving and recording of the indices there was used urethane anaesthesia [9].

Oxygen tension in muscles was measured using vitrified platinum microelectrodes with the tip diameter of 4–6 μ m. They were produced, worn-out and calibrated on the previously described method [2]. To introduce the electrodes the skin was pierced to the depth of 7–8 mm (white muscle) and 3–5 mm (red muscle),

вали, состаривали и калибровали по методу, описанному ранее [2]. Для введения электродов кожу прокалывали на глубину 7–8 мм (белая мышца) и 3–5 мм (красная мышца), предварительно удалив чешую. По ходу движения электрода проводили отдельные измерения (100 для каждого типа мышечной ткани). Диффузионный ток кислорода при потенциале поляризации 0,55–0,65 V регистрировали с помощью усилителя постоянного тока OP-925 (“Radelkis”, Венгрия). В качестве вспомогательного электрода применяли стандартный каломельный электрод. Данные, полученные от разных особей, объединяли и строили суммарные гистограммы распределения P_{O_2} , а также рассчитывали средневзвешенную величину (P_{mO_2}):

$$P_{mO_2} = k_1 P_{rO_2} + k_2 P_{wO_2},$$

где k_1 и k_2 – коэффициенты соотношения красных и белых мышц в теле рыб, %; P_{rO_2} и P_{wO_2} – напряжение кислорода в красных и белых мышцах.

Напряжение кислорода в пробах артериальной (P_{aO_2}) и венозной (P_{vO_2}) крови, а также величину pH измеряли на анализаторе OP-210 (“Radelkis”, Венгрия). Среднекапиллярное напряжение кислорода (P_{cO_2}) рассчитывали по уравнению Баркрофта:

$$P_{cO_2} = \frac{P_{vO_2} + 2P_{aO_2}}{3}.$$

По величинам P_{mO_2} и P_{cO_2} определяли величину гематопаренхиматозного градиента (P_{c-mO_2}):

$$P_{c-mO_2} = P_{cO_2} - P_{mO_2};$$

Концентрацию АТФ в мышцах оценивали по методу Лампрехта и Тротшоляда [5], основанного на сочетании двух ферментативных реакций с участием гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. В работе использовали стандартные препараты этих ферментов (“Sigma”, США) активностью 500 и 1000 U соответственно. Содержание лактата в крови и мышечной ткани определяли по ферментативному методу Хохорста [5] с помощью препарата лактатдегидрогеназы (“Lachema”, Чехия).

Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов проведены с применением стандартного пакета Grapher (версия 1.25). Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm S\bar{x}$. Значимость различий оценивали при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни [7].

Результаты и обсуждение

Характер изменений, вызываемых гипотермией в организме кефали, зависел от величины темпе-

removing preliminary removal of scale. Along the electrode movement there were done the measurements (100 for each type of muscular tissue). Diffusive oxygen flow at polarization potential of 0.55–0.65 V was recorded using the direct current amplifier OP-925 (“Radelkis”, Hungary). As an additional electrode there was applied the standard calomel electrode. The findings from different species were joined and the summarized diagrams of P_{O_2} distribution were built, as well as there were calculated the weight average value (P_{mO_2}):

$$P_{mO_2} = k_1 P_{rO_2} + k_2 P_{wO_2},$$

where k_1 and k_2 – the coefficients of the ratio of red and white muscles in fish, %; P_{rO_2} and P_{wO_2} – oxygen tensions in red and white muscles.

Oxygen tension in the samples of arterial (P_{aO_2}) and venous (P_{vO_2}) blood as well as pH value was measured with the analyzer OP-210 (“Radelkis”, Hungary). Mean capillary oxygen tension (P_{cO_2}) was calculated on Barcroft equation:

$$P_{cO_2} = \frac{P_{vO_2} + 2P_{aO_2}}{3}.$$

On the values P_{mO_2} and P_{cO_2} there was found the value of hemato-parenchymatous gradient (P_{c-mO_2}):

$$P_{c-mO_2} = P_{cO_2} - P_{mO_2};$$

ATP concentration in muscles was assessed on the method of *Lamprecht* and *Trautshold* [5], based on the combination of two enzyme reactions with participation of hexogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In the research there were used standard formulations of these enzymes (Sigma, USA) with activity of 5000 and 1000 U, correspondingly. The content of lactate in blood and muscular tissue was found on Hohorst enzyme methods [5] using lactate dehydrogenase (Lachema, Czechia).

Statistical processing and graphical presentation of the findings are given using the standard software Grapher (version 1.25). The results are given as $\bar{x} \pm S\bar{x}$. The significance of differences was estimated with non-parametric U-criterion of Mann, Whitney [7].

Results and discussion

The character of hypothermia-caused changes in mullet depended on the value of temperature gradient and its adaptation duration to new temperature conditions.

ратурного градиента и продолжительности ее адаптации к новым температурным условиям.

Температура 10°C. Снижение температуры воды в диапазоне 10–15°C существенно влияло на артериальное (P_{aO_2}) и венозное (P_{vO_2}) напряжение кислорода (табл. 1). Данные показатели не изменялись в течение всего периода наблюдений (41–46 суток). Расчет среднекапиллярного (P_{cO_2}) и среднемышечного (P_{mO_2}) напряжения кислорода показал, что его утилизация скелетными мышцами происходила при прежнем градиенте P_{O_2} , существующем между кровью и мышечной тканью. Величина P_{c-mO_2} составляла в среднем около 60 гПа.

В распределении P_{O_2} в мышцах также не наблюдали существенных изменений (рис. 1, 2). Число гипоксических зон (менее 8 гПа) в красных мышцах оставалось на уровне контрольных значений (3–8%), в белых мышцах оно несколько снижалось (46–54%), что свидетельствует об уменьшении числа гипоксических зон на 11–19%.

При температуре воды 10°C концентрация лактата в крови и мышцах, артериовенозная разница по рН (pH_{a-v}) у особей кефали оставались на уровне контрольных величин. Содержание АТФ в мышцах

Temperature 10°C. Water temperature reduction within the range of 10–15°C significantly affected arterial (P_{aO_2}) and venous (P_{vO_2}) oxygen tension (Table 1). These indices did not alter during the whole observation period (41–46 days). The calculation of mean capillary (P_{cO_2}) and mean muscular (P_{mO_2}) oxygen tension has shown that its utilization by skeletal muscles occurred at previous gradient P_{O_2} , existing between blood and muscular tissue. The value P_{c-mO_2} made in average about 60 gPa.

In distribution of P_{O_2} in muscles no changes were observed as well (Fig. 1, 2). The number of hypoxic zones (less than 8 gPa) in red muscles remained at the level of the control values (3–8%), in white muscles it decreased slightly (46–54%), that testifies to the decrease in the number of hypoxic zones by 11–19%.

At water temperature of 10°C the concentration of lactate in blood and muscles, arteriovenous difference on pH (pH_{a-v}) in mullet individuals remained at the level of the control values. ATP content in muscles also did not differ statistically and significantly (Table 2).

Temperature 5°C. Arterial oxygen tension during the experiment kept at the level of the control values

Таблица 1. Напряжение кислорода в крови и мышечной ткани кефали-сингиля в условиях экспериментальной гипотермии

Table 1. Oxygen tension in blood and muscular tissue of golden mullet under experimental hypothermia

Условия эксперимента Experimental conditions		Напряжение кислорода, гПа Oxygen tension, gPa								
Температура, °C Temperature, °C	Длительность, сут Duration, days	Кровь Blood				Мышцы Muscles				
		n	P_{aO_2}	P_{vO_2}	P_{cO_2}	n	P_{rO_2}	P_{wO_2}	P_{mO_2}	P_{c-mO_2}
15	контроль	8	114,2±5,6	48,2±2,5	70,3±3,1	5	28,2±0,8	7,28±0,20	10,0±0,1	62,6±4,4
	1–5	7	110,3±4,1	51,2±2,1	70,9±1,4	5	27,9±0,6	8,34±0,60	10,9±0,6	58,3±1,3
10	14–15	8	118,3±4,7	53,0±1,8	74,8±1,6	5	27,1±1,1	7,90±0,50	10,4±0,5	62,4±1,6
	41–46	6	115,6±4,6	49,7±2,5	71,7±2,3	5	26,6±0,5	8,48±0,70	10,8±0,6	59,1±2,3
5	1–5	6	118,4±3,1	38,4±1,4	65,1±1,9	5	16,8±0,5	5,99±0,59	7,4±0,5	57,9±2,1
	14–15	8	119,6±2,9	43,1±1,9	68,6±2,2	5	23,8±0,6	5,95±0,31	8,3±0,3	57,3±2,6
	41–46	8	123,0±3,2	44,3±1,7	70,5±2,1	5	26,9±0,7	6,91±0,35	9,5±0,3	60,6±2,6
1–2	1–5	6	115,6±3,4	29,1±1,5	57,9±2,0	5	14,3±0,4	6,21±0,42	7,3±0,4	50,2±2,4
	14–15	7	114,7±2,8	29,4±1,4	57,8±1,8	5	15,0±0,7	5,75±0,48	7,0±0,3	50,4±2,6

Примечания: n – количество особей; P_{aO_2} , P_{vO_2} – напряжение кислорода в артериальной и венозной крови; P_{cO_2} – среднекапиллярное напряжение кислорода; P_{rO_2} , P_{wO_2} – напряжение кислорода в красных и белых мышцах; P_{mO_2} – среднемышечное напряжение кислорода; P_{c-mO_2} – градиент напряжений кислорода между кровью и мышечной тканью.

Notes: n – number of individuals, P_{aO_2} , P_{vO_2} – oxygen tension in arterial and venous blood; P_{cO_2} – mean capillary oxygen tension; P_{rO_2} , P_{wO_2} – oxygen tension in red and white muscles; P_{mO_2} – mean muscular oxygen tension; P_{c-mO_2} – gradient of oxygen tensions between blood and muscular tissue.

также не претерпевало статистически значимых изменений (табл. 2).

Температура 5°C. Артериальное напряжение кислорода в течение опыта оставалось на уровне контрольных значений (табл. 1), а венозное P_{O_2} в начальный период адаптации (1–5 сутки) снижалось на 9,8 гПа ($p < 0,01$). Это происходило на фоне уменьшения среднемышечного и среднекапиллярного напряжения кислорода. В сравнении с контрольными величинами в красных мышцах P_{O_2} уменьшалось на 40% ($p < 0,001$), в белых – на 18% ($p < 0,01$). При этом диффузионный градиент P_{c-mO_2} не изменялся. Наблюдалась тенденция к уменьшению значений P_{cO_2} (не более 5 гПа).

Анализ распределения P_{O_2} в мышечной ткани показал увеличение числа гипоксических зон (рис. 1, 2). В красных мышцах максимум распределения смещался относительно контрольных данных на 10 гПа влево. Число гипоксических зон (менее 8 гПа) увеличивалось в 2,6 раза и составляло 13% от общего числа измерений. Аналогичные изменения происходили в белых мышцах. Максимум распределения был смещен на 2 гПа влево, а значения менее 8 гПа достигали 32%, что на 88% больше, чем у особой контрольной группы.

(Table 1), and venous P_{O_2} in initial period of adaptation (1–5 days) reduced by 9.8 gPa ($p < 0.01$). This occurred on the background of reduction of mean muscular and mean capillary oxygen tension. In comparison with the control values in red muscles P_{O_2} decreased by 40% ($p < 0.001$) and by 18% in white ones ($p < 0.01$). herewith the diffusive gradient P_{c-mO_2} did not alter. The trend to a reduction of P_{cO_2} values was observed (not more than 5 gPa).

Distribution analysis of P_{O_2} in muscular tissue has shown the rise in the number of hypoxic zones (Fig. 1, 2). In red muscles the maximum of distribution shifted in respect of the control data by 10 gPa leftwards. The number of hypoxic zones (less than 8 gPa) increased in 2.6 times and made 13% from total measurements. The same changes occurred in white muscles. The distribution maximum was shifted by 2 gPa leftwards and the values less than 8 gPa reached 32% that by 88% higher than in the individuals of the control group.

During adaptation to the temperature of 5°C within 5 days the rise in lactate content in mullet skeletal muscles was noted by 39–46% ($p < 0.001$) (Table 2). Simultaneously the concentration of lactate in blood increased up to the level of 164.5 ± 13.0 mg/l, that by

Таблица 2. Концентрация АТФ, лактата и рН крови в мышцах кефали-сингиля в условиях экспериментальной гипотермии

Table 2. Concentration of ATP, lactate and pH in muscles' blood of golden mullet under experimental hypothermia

Условия эксперимента Experimental conditions		АТФ, мкмоль/г сырого веса ATP, mmol/g of raw mass			Лактат, мг/г сырого веса (л крови) Lactate, mg/g of raw mass (l of blood)				pH			
Температура, °C Temperature, °C	Длительность, сут Duration, days	n	r	w	n	r	w	a	n	a	v	a-v
15	контроль control	8	1,60±0,21	4,09±0,18	8	1,69±0,08	1,88±0,09	110,4±6,8	8	7,80±0,03	7,78±0,03	0,018±0,004
10	1–5	5	1,70±0,22	4,10±0,18	5	1,64±0,07	1,92±0,13	105,9±7,6	7	7,91±0,03	7,90±0,03	0,014±0,004
	14–15	6	1,72±0,19	4,02±0,12	6	1,72±0,11	1,82±0,08	111,8±8,9	8	7,93±0,02	7,92±0,02	0,014±0,004
	41–46	5	1,64±0,20	3,94±0,18	5	1,58±0,07	1,84±0,14	103,7±6,9	6	7,90±0,02	7,89±0,02	0,013±0,004
5	1–5	6	0,98±0,17	2,84±0,14	6	2,35±0,12	2,75±0,13	164,5±13,0	8	7,89±0,02	7,84±0,02	0,043±0,004
	14–15	7	1,49±0,18	3,24±0,15	7	1,99±0,12	2,59±0,09	135,8±6,7	8	7,94±0,02	7,92±0,02	0,018±0,003
	41–46	5	1,58±0,22	3,38±0,15	5	1,82±0,07	2,52±0,11	121,7±7,1	7	7,98±0,03	7,97±0,03	0,011±0,003
1–2	1–5	5	0,92±0,10	2,48±0,16	5	2,92±0,17	3,84±0,18	216,3±14,7	6	7,92±0,02	7,87±0,02	0,045±0,004
	14–15	5	0,78±0,12	1,84±0,16	5	3,86±0,18	4,76±0,16	276,7±14,9	7	7,94±0,02	7,90±0,02	0,043±0,004

Примечания: n – количество особей; r, w – данные относительно красных и белых мышц соответственно; a, v – данные относительно артериальной и венозной крови соответственно.

Notes: n – number of individuals, the same in brackets; r, w – data regarding red and white muscles; a, v – data regarding arterial and venous blood.

При адаптации к температуре 5°C в первые 5 суток отмечали увеличение содержания лактата в скелетных мышцах кефали на 39–46% ($p < 0,001$) (табл. 2). Одновременно повышалась концентрация лактата в крови до уровня $164,5 \pm 13,0$ мг/л, что на 49% ($p < 0,001$) выше контрольных значений. Кровь, оттекающая от мышц, подвергалась значительному закислению. Артериовенозная разница по pH в сравнении с контролем увеличивалась в 2,4 раза ($p < 0,001$). Содержание АТФ в мышечной ткани уменьшалось на 31–39% ($p < 0,05$).

Продолжительная адаптация особей кефали к 5°C (41–46 суток) сопровождалась развитием в организме компенсационных процессов. Начальные изменения P_{O_2} в красных мышцах полностью нивелировались. Характер распределения P_{O_2} в мышечной ткани и P_{mO_2} восстанавливались до контрольного уровня. Содержание АТФ, лактата в крови и красных мышцах, величина pH нормализовались. В белых мышцах отмечали восстановление P_{mO_2} только на 72%. Число гипоксических зон в ткани несколько уменьшалось. Одновременно повышалось значение P_{O_2} в венозной крови. Однако по сравнению с красными мышцами в белых мышцах различия статистически были незначи-

49% ($p < 0,01$) higher than the control values. Blood reflowing from the muscles was subjected to significant acidulation. Arteriovenous difference on pH if compared with the control increased by 2.4 times ($p < 0,001$). Muscular tissue ATP reduced by 31–39% ($p < 0,05$).

Prolonged adaptation of mullets to 5°C (41–46 days) was accompanied by the development of compensation processes in an organism. Initial changes of P_{O_2} in red muscles were completely neutralized. The character of P_{O_2} distribution in muscular tissue and P_{mO_2} restored to the control level. Content of ATP, lactate in blood and red muscles, pH value were normalized. In white muscles there was noted the restoration of P_{mO_2} only by 72%. The number of hypoxic zones in tissue slightly reduced. At the same time the value P_{O_2} in venous blood increased. However in the white muscles the differences were not manifested statistically if compared to red ones. The parameters of tissue metabolism (lactate, ATP, pH) were not restored.

Temperature 1–2°C. At 1–2°C there was found significant reduction of P_{vO_2} , P_{mO_2} and P_{cO_2} , correspondingly ($p < 0,01$) (see Table 1). Oxygen tension in red muscles reduced by 49% ($p < 0,001$) and by 21%

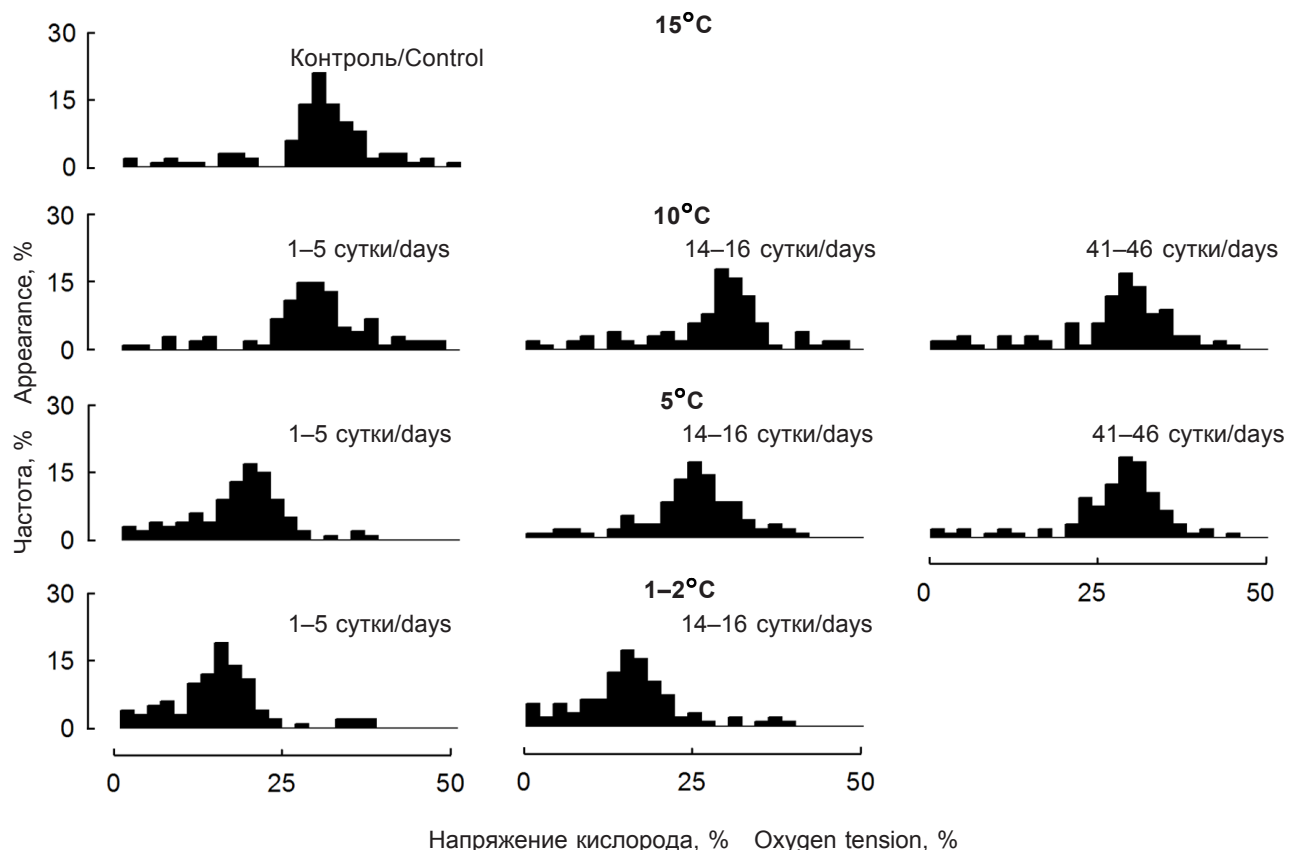


Рис. 1. Напряжение кислорода в красных скелетных мышцах кефали-сингиля при адаптации к низким температурам.

Fig. 1. Oxygen tension in red skeletal muscles of golden mullet during adaptation to low temperatures.

тельны. Параметры тканевого метаболизма (лактат, АТФ, рН) не восстанавливались.

Температура 1–2°C. При 1–2°C отмечали значительное снижение P_{vO_2} , P_{mO_2} и P_{cO_2} на 43,6; 27,0% ($p < 0,001$) и 17,6% ($p < 0,01$) соответственно (табл. 1). Напряжение кислорода в красных мышцах уменьшалось на 49% ($p < 0,001$), в белых – на 21% ($p < 0,001$). Сопоставление значений P_{cO_2} и P_{mO_2} показало, что диффузия кислорода в мышечной ткани происходила при меньшем градиенте P_{O_2} . В сравнении с контролем величина P_{c-mO_2} уменьшалась на 19,8% ($p < 0,05$).

Снижение P_{mO_2} при 1–2°C влияло на характер распределения P_{mO_2} в мышечной ткани, величина смещения составляла для красных мышц – 15 гПа, белых – 4 гПа (рис. 1, 2). Резко увеличивалось число гипоксических зон (менее 8 гПа). В красных мышцах на них приходилось около 18% регистрируемых значений. В белых мышцах значения менее 5 гПа составляли 35%, тогда как у контрольной группы рыб – 17%.

При 1–2°C концентрация лактата в мышечной ткани кефали достигала максимальных значений (табл. 2). На 14–16 сутки наблюдений она в 2,3–2,5 раза ($p < 0,001$) превышала контрольные вели-

чины в белых. Сравнение значений P_{cO_2} и P_{mO_2} показало, что диффузия кислорода в мышечной ткани происходила при меньшем градиенте P_{O_2} . Если сравнить с контролем, то значение P_{c-mO_2} снизилось на 19,8% ($p < 0,05$).

Снижение P_{mO_2} при 1–2°C повлияло на характер распределения P_{mO_2} в мышечной ткани, максимум которого сдвинулся влево. Величина сдвига для красных мышц составила 15 гПа и 4 гПа для белых (рис. 1, 2). Число гипоксических зон (менее 8 гПа) резко увеличилось (на 18% от записанных значений).

В белых мышцах значения менее 5 гПа составили 35%, тогда как в контрольной группе рыб – 17%.

При 1–2°C концентрация лактата в мышечной ткани кефали достигала максимальных значений (табл. 2). На 14–16 сутки наблюдений она в 2,3–2,5 раза ($p < 0,001$) превышала контрольные значения. Содержание лактата в крови увеличилось до уровня 348.21 ± 21.0 мг/л. Значение pH_{a-v} увеличилось в 2,4–2,5 раза ($p < 0,001$). Концентрация АТФ в ткани значительно снизилась.

При нормализации кислородного режима и метаболических процессов в мышечной ткани кефали при 1–2°C и 5°C не наблюдалось. В течение первых 5 дней эксперимента были обнаружены единичные случаи гибели рыб

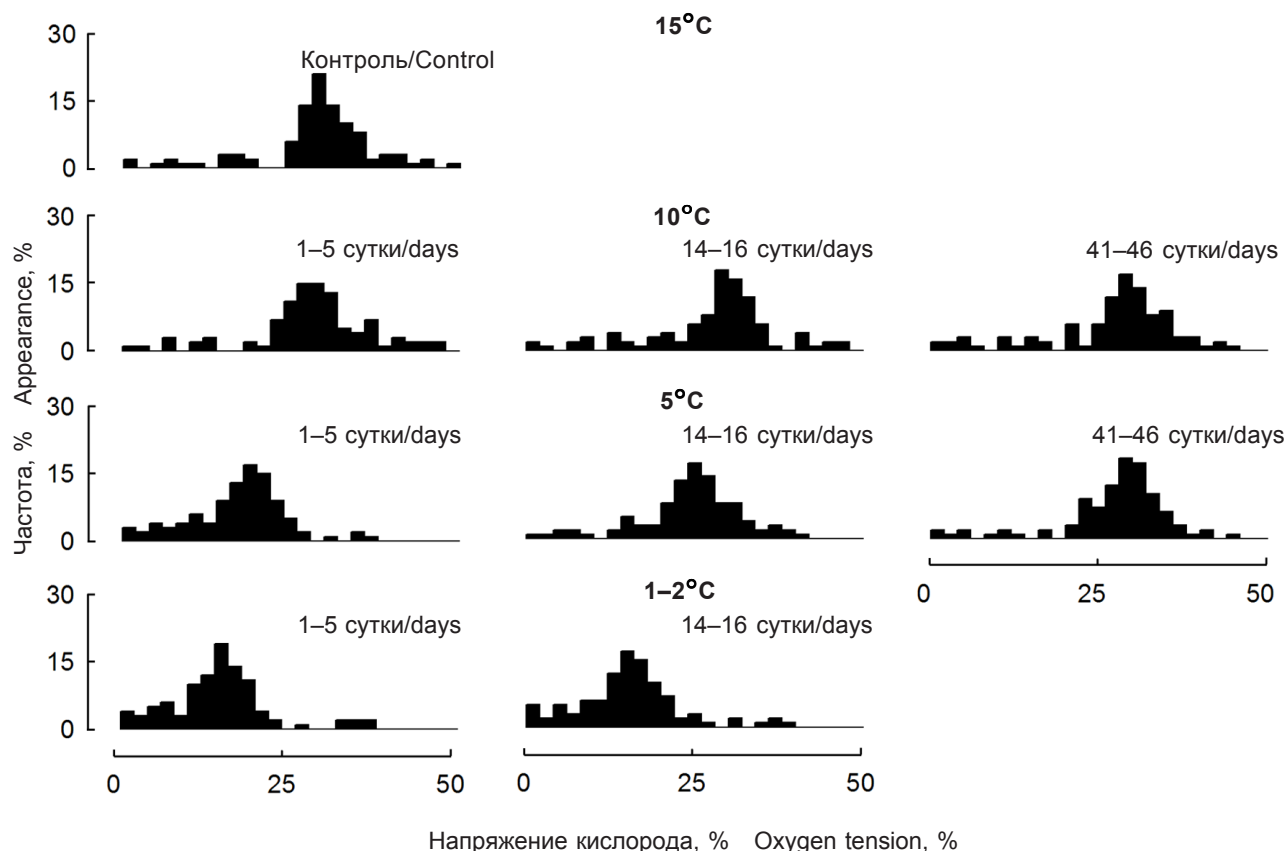


Рис. 2. Напряжение кислорода в белых скелетных мышцах кефали-сингиля при адаптации к низким температурам.
Fig. 2. Oxygen tension in white skeletal muscles of golden mullet during adaptation to low temperatures.

чины. Содержание лактата в крови повышалось до уровня $348,2 \pm 21,0$ мг/л. Величина $\text{pH}_{\text{a-v}}$ увеличивалась в 2,4–2,5 раза ($p < 0,001$). Концентрация АТФ в ткани существенно понижалась.

Нормализацию кислородного режима и метаболических процессов в мышечной ткани кефали при 1–2°C, как и при 5°C, не наблюдали. В первые 5 суток эксперимента отмечали единичные случаи гибели рыбы при явных признаках асфиксии. Особи поднимались к поверхности воды, захватывали ртом атмосферный воздух, теряли равновесие. На 15-е сутки эксперимента гибель составила 100%.

Из результатов экспериментов, выполненных на кефали-сингиле, следует, что снижение температуры воды от 15 до 10°C не оказывало значимого влияния на кислородный режим мышечной ткани рыб. В то же время понижение температуры до 5 и 1–2°C, напротив, вызывало заметное ухудшение кислородного режима и приводило к развитию тканевой гипоксии. Об этом свидетельствовали следующие факты: снижение значений среднемышечного P_{mO_2} и увеличение числа гипоксических зон (менее 8,0 гПа) в мышечной ткани; уменьшение величин P_{vO_2} , P_{cO_2} и pH; повышение содержания лактата в мышцах и крови при параллельном снижении уровня АТФ. Отмеченные различия были статистически значимы. При 1–2°C они были более выражены, чем при 5°C. Это свидетельствует о том, что тканевая гипоксия носит вторичный характер. Она не связана с тканевыми молекулярными системами утилизации кислорода, так как протекает на фоне снижения P_{mO_2} и P_{vO_2} . В основе ее развития должны лежать изменения в состоянии систем кислородного обеспечения организма: респираторной, сердечно-сосудистой, микроциркуляции, газотранспортных свойств крови, диффузионных процессов.

Известно, что гипотермия может негативно влиять на состояние респираторного центра у рыб, подавляя его активность и ограничивая тем самым вентиляционные объемы [12, 21]. Следствием этого является развитие артериальной гипоксемии, которая должна приводить к понижению тканевого напряжения кислорода. Однако в настоящей работе не было зарегистрировано снижение артериального P_{O_2} , напротив, в условиях гипотермии регистрируемые значения были несколько выше, чем у контрольной группы рыб (15°C). Это означает, что в отношении кефали-сингиля данный механизм развития тканевой гипоксии может быть исключен из рассмотрения.

Циркуляторные формы гипоксии в условиях низких температур вполне возможны. Для рыб показано, что гипотермия снижает частоту сердечных сокращений и уменьшает минутный объем сердца рыб [22], а также негативно влияет на глад-

evident signs of asphyxia. The individuals came to the water surface, gasped for atmosphere air, lost the balance. To the 15th day of experiment the death made 100%.

The results of experiment made in golden mullet demonstrated that water temperature decrease from 15 to 10°C did not render significant effect on oxygen regimen of fish muscular tissue. At the same time the reduction of temperature from 5 to 1–2°C in contrast caused significant aggravation of oxygen regimen and led to the development of tissue hypoxia. This is confirmed by the following facts: reduction of mean muscular P_{mO_2} and rise of the number of hypoxic zones (less than 8.0 gPa) in muscular tissue; decrease in the values P_{vO_2} , P_{cO_2} and pH; rise in the content of lactate in muscles and blood at parallel reduction of ATP level. The found differences were statistically significant. At 1–2°C they were more manifested than at 5°C. This testifies to the fact that tissue hypoxia is of a secondary character. It is not related to molecular systems of oxygen utilization, since it proceeds on the background of reduced P_{cO_2} and P_{vO_2} . In the base of its development there should be the alteration in the state of the systems of organism oxygen supply: respiratory, cardiovascular, microcirculation, gas transport properties of blood, diffusive processes.

Hypothermia is known negatively affecting the state of respiratory center in fish, suppressing its activity and limiting thereby ventilation volumes [12, 21]. The consequence of this is the development of arterial hypoxemia which should result in lowering the tissue oxygen tension. However in this research there was no recorded the decrease in arterial P_{mO_2} , in contrast under hypothermia the recorded values were slightly higher than in the control group of fish (15°C). This means that regarding the golden mullet this mechanisms of tissue hypoxia development may be excluded from the consideration.

Circulatory hypoxia forms under low temperatures are quite possible. For fish it has been shown that hypothermia reduces the frequency of cardiac contractions and reduces the minute volume of fish heart [22], as well as negatively affects smooth muscle wall of vessels of microcirculatory channel by rising the resistance to blood flux [24]. Both processes should lead to restricting of volume blood flux in tissues and reduce the oxygen tension in them.

The change of functional state of hemoglobin under hypothermia also may result in the limitation of oxygen supply to tissues. Low temperatures contribute to the strengthening of oxidative processes in erythrocytes and transition of hemoglobin into ferri-form (methemoglobin) [4, 10, 14, 19]. This process is related to the reduction of activity of NADH₂-diaphorase [8, 18]. Herewith the share of oxidized pigment may exceed 15% [14].

комышечную стенку сосудов микроциркуляторного русла, увеличивая сопротивление кровотоку [24]. Оба процесса должны приводить к ограничению объемного кровотока в тканях и снижать напряжения кислорода в них.

Изменение функционального состояния гемоглобина в условиях гипотермии также может приводить к ограничению доставки кислорода к тканям. Низкие температуры способствуют усилению окислительных процессов в эритроцитах и переходу гемоглобина в ферри-форму (метгемоглобина) [4, 10, 14, 19]. Этот процесс связан со снижением активности НАДН₂-диафоразы [8, 18]. При этом доля окисленного пигмента может превышать 15% [14].

Можно допустить, что при гипотермии происходит и изменение диффузионных характеристик гематопаренхиматозного барьера. Установлено, что температурные адаптации у рыб сопряжены со значительным изменением уровня липидов в их тканях. Известно также, что растворимость кислорода в липидах в 4 раза выше, чем в оводненной цитоплазме [20], то есть этот фактор также нельзя исключать из рассмотрения.

Особый интерес представляют компенсационные процессы, описанные в настоящей работе, у кефали-сингиля при адаптации к гипотермии (5°C). Они полностью или в значительной степени восстанавливали тканевое напряжение кислорода и направленность метаболических процессов в мышечной ткани. Установить их содержание и механизмы реализации пока сложно. В любом случае они должны быть реализованы на уровне систем кислородного обеспечения тканей. Этот вопрос требует проведения дополнительных исследований.

Выводы

Гипотермия (5°C и ниже) вызывала в скелетных мышцах кефали-сингиля развитие тканевой гипоксии. Она носила вторичный характер и проявлялась в снижении P_{mO_2} , увеличении числа гипоксических зон в мышечной ткани и понижении P_{vO_2} . Это приводило к усилению анаэробных процессов в мышцах, о чем свидетельствовал рост содержания лактата, уменьшение уровня АТФ, а также снижение величины рН венозной крови.

При температурах близких к 5°C в организме кефали-сингиля отмечали развитие компенсационных процессов, которые проявлялись в полном или частичном восстановлении P_{O_2} в мышцах и венозной крови при параллельном подавлении анаэробных процессов. Эффективность этих процессов утрачивалась с понижением температуры, при 1–2°C они не выявлялись совсем.

One may admit that under hypothermia there is the change in diffusive parameters of hemato-parenchymatous barrier. It has been established that temperature adaptation in fish is conjugated with significant alteration of lipid level in their tissues. It is also known that the solubility of oxygen in lipids is 4 times higher than in hydrated cytoplasm [20], that is this factor also should be considered.

Of special interest are the compensation processes, described in this work, in golden mullet during adaptation to hypothermia (5°C). They either completely or insignificantly restored tissue oxygen tension and direction of metabolic processes in muscular tissue. Their content and mechanisms' establishing is quite complicated now. In any case they should be implemented at the level of the systems of oxygen providing of tissues. This question requires the additional studies.

Conclusions

Hypothermia (5°C and lower) caused in skeletal muscles of golden mullet the development of tissue hypoxia. It had a secondary character and manifested in P_{mO_2} reduction, rise in the number of hypoxic zones in muscular tissue and decrease in P_{vO_2} . This resulted into the strengthening of anaerobic processes in muscles, that was confirmed with the increase in lactate content, APT level reduction, as well as diminishing of venous blood pH value.

At temperatures close to 5°C in golden mullet there was noted the development of compensation processes, manifesting in a complete or partial restoration of P_{O_2} in muscles and venous blood at parallel suppression of anaerobic processes. The efficiency of these processes was lost with temperature decrease at 1–2°C they were not revealed at all.

Литература

1. Arsan O.M. Role of temperature of water medium in regulation processes of glycolysis and tricarbone cycle in fish organism // *Gidrobiol. Zhurnal.* – 1986. – Vol. 22, N3. – P. 57–62.
2. Berezovsky V.A. Oxygen tension in animal and human tissues. – Kiev: Naukova Dumka, 1975. – 276 p.
3. Gulevsky A.K., Relina L.I., Zhegunova E.G. Role of glycolysis at cold adaptation of *Carassius auratus gibelio* gold fish // *Problems of Cryobiology.* – 2007. – Vol. 17, N1. – P. 64–70.
4. Dubinina E.E., Danilova L.A., Efimova L.F. et al. Activity of superoxide dismutase and content of methemoglobin in human and animal erythrocytes // *Zhurnal Evolutsion. Biokhim. i Fiziol.* – 1988. – Vol. 24. – P. 171–175.
5. Eschenko N.D. Examination of content of lactic acid in tissues and activity of lactate dehydrogenase in tissues // *Methods of Biochemical Studies (lipid exchange and metabolism).* – Leningrad: Leningrad State University, 1982. – P. 222–226.
6. Kulikova N.I., Shekk P.V., Rudenko V.I. About attitude of young Black sea mullet to low temperature // *Voprosy Ikhtiologii.* – 1986. – Vol. 26, Issue 1. – P. 119–128.

Литература

1. Арсан О.М. Роль температуры водной среды в регуляции процессов гликолиза и трикарбонового цикла в организме рыб // Гидробиол. журн.– 1986.– Т. 22, №3.– С. 57–62.
2. Березовский В.А. Напряжение кислорода в тканях животных и человека.– Киев: Наук. думка, 1975.– 276 с.
3. Гулевский А.К., Релина Л.И., Жеунова Е.Г. и др. Роль гликолиза при холодной адаптации карася серебряного *Carassius auratus gibelio* // Пробл. криобиологии.– 2007.– Т. 17, №1.– С. 64–70.
4. Дубинина Е.Е., Данилова Л.А., Ефимова Л.Ф. и др. Активность супероксиддисмутазы и содержание метгемоглобина в эритроцитах человека и животных // Журнал эволюцион. биохим. и физиол.– 1988.– Т. 24.– С. 171–175.
5. Ещенко Н.Д. Определение содержания молочной кислоты в тканях и активности лактатдегидрогеназы в тканях // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен).– Л.: Изд-во ЛГУ, 1982.– С. 222–226.
6. Куликова Н.И., Шекк П.В., Руденко В.И. Об отношении молодежи черноморских кефалей к низкой температуре // Вопросы ихтиологии.– 1986.– Т. 26, Вып. 1.– С. 119–128.
7. Ребров О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTIKA.– М.: Медиа Сфера, 2002.– 305 с.
8. Солдатов А.А. Активность НАДН₂-зависимой метгемоглобинредуктазы в эритроцитах бычка-кругляка при адаптации к низким температурам // Журнал эволюцион. биохим. и физиол.– 1989.– Т. 25, №6.– С. 772–774.
9. Солдатов А.А. Физиологические аспекты действия уретанового наркоза на организм морских рыб // Гидробиол. журнал.– 2003.– Т. 39, №1.– С. 51–63.
10. Солдатов А.А. Эритропоэз и концентрация метгемоглобина в крови кефали-сингиля (*Liza aurata* Risso) на протяжении годового цикла // Совр. пробл. физиол. и биохим. водных организмов. – Петрозаводск: Изд-во Ин-та биологии, 2005.– С. 182–187.
11. Шекк П.В., Куликова Н.И., Руденко В.И. Возрастные изменения реакции черноморского сингиля *Liza aurata* на низкую температуру // Вопр. ихтиологии.– 1990.– Т. 30, Вып. 1.– С. 94–106.
12. Azuma T., Chikushi Ya., Itazawa Ya. Effects of acute drop of ambient temperature on respiration and blood circulation of porgy // Fish Sci.– 1998.– Vol. 64, N2.– P. 270–275.
13. Bosworth C.A., Chou C.W., Cole R.B., Rees B.B. Protein expression patterns in zebrafish skeletal muscle: initial characterization and the effects of hypoxic exposure // Proteomics.– 2005.– Vol. 5, N5.– P. 1362–1371.
14. Graham M.S., Fletcher G.L. High concentrations of methemoglobin in five species of temperate marine teleosts // J. Exp. Zool.– 1986.– Vol. 239.– P. 139–142.
15. Heise K., Puntarulo S., Nikinmaa M. et al. Oxidative stress and HIF-1 DNA binding during stressful cold exposure and recovery in the North Sea eelpout (*Zoarces viviparus*) // Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.– 2006.– Vol. 143, N4.– P. 494–503.
16. Houston A.H. Blood and circulation // Methods for Fish Biology.– N-Y.: Amer. Fish. Society, 1990.– P. 273–334.
17. Ju Z., Wells M.C., Heater S.J., Walter R.B. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia // Comp. Biochem. Physiol. C.– 2007.– Vol. 145, N1.– P. 134–144.
18. Kawatsu Y., Nakanishi Y., Takeda H. Methemoglobin determination in eel blood // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.– 1987.– Vol. 53.– P. 9–14.
19. Koudela K., Zitkova V. Chronostabilita a termostabilita methemoglobinu y erythrocytech karpa obeceno // Sb. VSZ Praze B.– 1991.– Vol. 53.– P. 35–41.
20. Londrville R.L., Sidell B.D. Ultrastructure of aerobic muscle in antarctic fishes may contribute to maintenance of diffusive fluxes // J. Exp. Biol.– 1990.– Vol. 150.– P. 205–220.
21. Maricondi-Massari M., Kalinin A.L., Glass M.L., Rantin F.T. The effects of temperature on oxygen uptake. Gill ventilation and ECG waveforms in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* // J. Therm. Biol.– 1998.– Vol. 23, N5.– P. 283–290.
22. Mourad M.H. Effects of water temperature on the ECG; heart rate and respiratory rate of the eel *Anguilla anguilla* L. // Acta Ichthyol. Pisc.– 1991.– Vol. 21, N1.– P. 81–86.
23. Soitamo A.J., Raabergh C.M.I., Gassmann M. et al. Characterization of a hypoxia-inducible Factor (HIF-1) from Rainbow Trout: Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension // J. Biol. Chem.– 2001.– Vol. 276, N23.– P. 19699–19705.
24. Soivio A., Tuurala H. Structural and circulatory responses to hypoxia in the secondary lamellae of *Salmo gairdneri* gills at two temperatures // J. Comp. Physiol.– 1981.– Vol. 145B, N1.– P. 37–43.
7. Rebrov O.Yu. Statistical analysis of medical data. Application of the STATISTIKA software.– Moscow: Media Sfera, 2002.– 305 p.
8. Soldatov A.A. Activity of NADH₂-dependent methemoglobin reductase in round goby erythrocytes at adaptation to low temperatures // Zhurnal Evolyutsion. Biokhim. i Fiziol.– 1989.– Vol. 25, N6.– P. 772–774.
9. Soldatov A.A. Physiological aspects of the effect of urethane narcosis on marine fish organism // Hidrobiolog. Zhurnal. – 2003.– Vol. 39, N1.– P. 51–63.
10. Soldatov A.A. Erythropoiesis and concentration of methemoglobin in blood of golden mullet (*Liza aurata* Risso) during a year cycle // Modern problems of physiology and biochemistry of aqueous organisms.– Petrozavodsk: Publ. House of the Institute of Biology.– 2005.– P. 182–187.
11. Shekk P.V., Kulikova N.I., Rudenko V.I. Age changes in reaction of Black sea mullet *Liza aurata* to low temperature // Voprosy Ikhtologii.– 1990.– Vol. 30, Issue 1.– P. 94–106.
12. Azuma T., Chikushi Ya., Itazawa Ya. Effects of acute drop of ambient temperature on respiration and blood circulation of porgy // Fish Sci.– 1998.– Vol. 64, N2.– P. 270–275.
13. Bosworth C.A., Chou C.W., Cole R.B., Rees B.B. Protein expression patterns in zebrafish skeletal muscle: initial characterization and the effects of hypoxic exposure // Proteomics.– 2005.– Vol. 5, N5.– P. 1362–1371.
14. Graham M.S., Fletcher G.L. High concentrations of methemoglobin in five species of temperate marine teleosts // J. Exp. Zool.– 1986.– Vol. 239.– P. 139–142.
15. Heise K., Puntarulo S., Nikinmaa M. et al. Oxidative stress and HIF-1 DNA binding during stressful cold exposure and recovery in the North Sea eelpout (*Zoarces viviparus*) // Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.– 2006.– Vol. 143, N4.– P. 494–503.
16. Houston A.H. Blood and circulation // Methods for Fish Biology.– N-Y.: Amer. Fish. Society, 1990.– P. 273–334.
17. Ju Z., Wells M.C., Heater S.J., Walter R.B. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia // Comp. Biochem. Physiol. C.– 2007.– Vol. 145, N1.– P. 134–144.
18. Kawatsu Y., Nakanishi Y., Takeda H. Methemoglobin determination in eel blood // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.– 1987.– Vol. 53.– P. 9–14.
19. Koudela K., Zitkova V. Chronostabilita a termostabilita methemoglobinu y erythrocytech karpa obeceno // Sb. VSZ Praze B.– 1991.– Vol. 53.– P. 35–41.

Accepted in 24.06.2009

20. *Londraville R.L., Sidell B.D.* Ultrastructure of aerobic muscle in antarctic fishes may contribute to maintenance of diffusive fluxes // *J. Exp. Biol.*– 1990.– Vol. 150.– P. 205–220.
21. *Maricondi-Massari M., Kalinin A.L., Glass M.L., Rantin F.T.* The effects of temperature on oxygen uptake. Gill ventilation and ECG waveforms in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* // *J. Therm. Biol.*– 1998.– Vol. 23, N5.– P. 283–290.
22. *Mourad M.H.* Effects of water temperature on the ECG; heart rate and respiratory rate of the eel *Anguilla anguilla* L. // *Acta Ichthyol. Pisc.*– 1991.– Vol. 21, N1.– P. 81–86.
23. *Soitamo A.J., Raabergh C.M.I., Gassmann M. et al.* Characterization of a hypoxia-inducible Factor (HIF-1) from Rainbow Trout: Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension // *J. Biol. Chem.*– 2001.– Vol. 276, N23.– P. 19699–19705.
24. *Soivio A., Tuurala H.* Structural and circulatory responses to hypoxia in the secondary lamellae of *Salmo gairdneri* gills at two temperatures // *J. Comp. Physiol.*– 1981.– Vol. 145B, N1.– P. 37–43.

Поступила 24.06.2009
Рецензент Е.Ф. Конейка