

Anna Filipiak, Roman Gondko, Teresa Gabrylak

ADAPTACJA HOMEOWISKOTYCZNA RYB

Artykuł przedstawia zagadnienia dotyczące adaptacji homeowiskotycznej u ryb. Szczególny nacisk położono na współzależności: temperatura, skład kwasów tłuszczowych fosfolipidów błony a jej właściwości. Omówiono przypuszczalne różnice w metabolizmie lipidów ryb w odpowiedzi na zmiany temperatury środowiska. Opisano także prawdopodobny mechanizm komórkowej percepcji zmian temperatury.

WSTĘP

Spośród fizycznych i chemicznych czynników oddziałujących na organizm, takich jak: skład chemiczny środowiska, ciśnienie, radiacja itp., szczególne znaczenie przypisuje się temperaturze. Ryby, płazy, gady, a także zwierzęta bezkręgowce są organizmami zmiennocieplnymi. Cechą wyróżniającą organizmy poikilotermiczne jest zmienna temperatura ciała uwarunkowana temperaturą otoczenia. Komórki ciała tych zwierząt podatne są na zmiany temperatury środowiska, co prowadzi do zmian tempa zachodzących w nich procesów biologicznych, a w warunkach ekstremalnych do śmierci organizmów [4, 24, 38].

Znanych jest ok. 20 000 różnych gatunków ryb. Obejmują one swym zasięgiem bardzo zróżnicowane nisze termiczne: począwszy od $-1,9^{\circ}\text{C}$ na biegunach (*Pagothenia bernacchii*, *Pagothenia borgrevinki*, *Trematomus hansonii*, *Gymnodraco acuticeps*), do ok. $+45^{\circ}\text{C}$ w źródłach termicznych (*Cyprinodon macularius*, *Barbus thermalis*). Zakres tolerancji ekologicznej większości gatunków ryb jest ograniczony do wąskich przedziałów temperaturowych. Ryby antarktyczne z rodziny *Notothenidae* żyją w przedziale od $-1,9^{\circ}\text{C}$ do $+4^{\circ}\text{C}$, ginąc już przy $+6^{\circ}\text{C}$. Łosoś i pstrąg są także rybami stenotermicznymi, z optymalną temperaturą życia ok. $+13^{\circ}\text{C}$ i górnym limitem $+18^{\circ}\text{C}$. Gatunki eurytermiczne bytują w szerszych przedziałach temperaturowych, adaptując się do dużych zmian termicznych otoczenia. Karp znosi temperatury zimą bliskie 0°C , jak i temperatury w granicach $+30^{\circ}\text{C}$

(jeziora tropikalne). Niektóre gatunki ryb, np. węgorz, mogą przeżyć niemal w tym samym zakresie temperatur, ale w warunkach ekstremalnych pozostają nieaktywne (stan odrętwienia). W tym ostatnim przypadku spadek aktywności biologicznej – podobny do hibernacji niektórych ssaków – jest strategią adaptacyjną prowadzącą do zmniejszenia zapotrzebowania energetycznego [12].

Utrzymanie stosunkowo stałego poziomu aktywności biologicznej kręgowców zmiennocieplnych w szerokim zakresie temperatur pozwala domyślać się istnienia różnorodnych mechanizmów przystosowawczych. Ewolucyjne przystosowanie do zmiennych warunków temperaturowych znalazło odbicie w aktywności i stabilności enzymów oraz innych białek [9, 10, 15, 26, 45, 66, 72].

Funkcja komórki jest ściśle zależna od procesów zachodzących w jej błonie. Dwuwarstwa lipidowa pełni szereg ważnych zadań:

- stanowi półprzepuszczalną barierę między środowiskiem zewnętrznym a wnętrzem komórki;
- jest amfipatyczną macierzą dla enzymów, receptorów i kanałów błonowych oraz hydrofobowych substratów (biosynteza lipidów, glikolipidów oraz reakcje redox z udziałem ubichinonów i plastochinonów);
- jej stan fizyczny i chemiczny determinuje wiele oddziaływań błonowych, jak proliferacja, fuzja i funkcje receptorowe.

Temperatura środowiska jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na fizyczne właściwości błon biologicznych. Powszechnie przyjęty model błony Singera i Nicolsona zakłada, że w warunkach fizjologicznych znajduje się ona w stanie ciekłokrystalicznym, który może ulegać zmianie wraz ze zmianą temperatury. Stwierdzono, że spadek temperatury powoduje wzrost lepkości dwuwarstwy lipidowej i odwrotnie, temperatura wyższa upłynnia dwuwarstwę. Powszechnie uważa się, że naruszenie funkcji błon Prokaryota i Eukaryota jest wynikiem nadmiernej płynności dwuwarstwy i jest proporcjonalne do stabilności natywnej konformacji białek związanych z błoną [13]. Temperatury powodujące śmierć organizmu są zbliżone do temperatur wywołujących cieplną inaktywację enzymów transportowych związanych z błoną [5]. Rozpuszczone w cytozolu enzymy cechuje natomiast duża termostabilność.

Aklimatyzacja temperaturowa zwierząt przejawia się m. in. utrzymaniem w różnych temperaturach stałej płynności błony komórkowej. Proces ten nosi nazwę adaptacji homeowiskotycznej. W skrócie – jest to tendencja organizmu do utrzymania stałego środowiska, głównie płynności niezbędnej dla prawidłowego funkcjonowania składników błonowych (białka itp.). Termin „adaptacja homeowiskotyczna” wprowadził Sinenski w 1974 r. dla opisanego zmian w lepkości lipidów ekstrahowanych z komórek *E. coli*

hodowanych w różnych temperaturach. Jednak już wcześniej inni badacze zdawali sobie sprawę ze znaczenia lepkości dwuwarstwy dla regulacji metabolizmu [8].

ADAPTACJA HOMEOWISKOTYCZNA – MOLEKULARNE PODSTAWY

Homeowiskotyczna teoria adaptacji zakłada, że lepkość dwuwarstwy lipidowej błony ustala się na poziomie kompensującym wpływ czynników środowiska. Płynność i lepkość błony są zdeterminowane składem kwasów tłuszczowych fosfolipidów oraz ich oddziaływaniem z cholesterolem, trój-jodotyroniną, tyroksyną i białkami zarówno enzymatycznymi, jak i cytoszkieletu [20, 56, 73, 74]. Uważa się, że za adaptację homeowiskotyczną odpowiedzialne są głównie zmiany w składzie lipidów błonowych. Do tej pory proces ten u ryb jest słabo poznany. Oprócz funkcji strukturalnych niektóre fosfolipidy błonowe (kwasy tłuszczowe) biorą udział w metabolizmie prostaglandyn i leukotrienów [4].

Fizyczne właściwości lipidowych składników błony. Płynność błony i stopień nienasycenia kwasów tłuszczowych są wprost proporcjonalnej zależności, tzn. że wzrost stopnia nienasycenia powoduje wzrost płynności błony i odwrotnie. Ponadto tylko nasycone kwasy tłuszczowe przyjmują konformację, w której łańcuch węglowodorowy jest w pełni rozciągnięty. Pojawienie się nawet jednego wiązania podwójnego w łańcuchu acylowym narusza tę konformację, co uniemożliwia ich ściśle upakowanie. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe o długim łańcuchu acylowym, np. kwas arachidonowy 20:4(n-6), są w stanie przyjmować konformację spiralną [6]. Obecność nawet jednego wiązania podwójnego silnie wpływa na fizyczne właściwości kwasów (tab. 1), np. temperatura topnienia kwasu oleinowego 18:1(n-9) jest o 56,2°C niższa od temperatury topnienia kwasu stearynowego 18:0.

Temperatura topnienia kwasów nienasyconych zależy też w dużym stopniu od położenia wiązania podwójnego. Temperatura topnienia dla kwasów posiadających wiązanie podwójne zlokalizowane w centrum łańcucha węglowodorowego jest niższa od temperatury topnienia kwasu z wiązaniem podwójnym położonym blisko jednego z jego końców. Różnica ta w przypadku izomerów kwasu oktadekamonoenowego 18:1 wynosi 40°C, a dla izomerów kwasu oktadekadienowego 18:2(n-1) i 18:2(n-7) wynosi 52,5°C [75]. W pewnych przypadkach temperatura topnienia bardziej zależy od pozycji wiązania podwójnego niż od liczby tych wiązań.

Tabela 1

Właściwości fizyczne wybranych kwasów tłuszczowych

Kwas	Uproszczony zapis	Temperatura topnienia (°C)
Palmitynowy	16:0	13,1
Stearynowy	18:0	69,6
Arachinowy	20:0	75,3
Oleinowy	18:1 (n - 9)	13,4
Erukowy	22:1 (n - 9)	34,7
Linolowy	18:2 (n - 6)	- 5,0
Linolenowy	18:2	- 5,0
Arachidonowy	20:4 (n - 6)	- 49,5

Temperatury topnienia kwasów: 20:4 (n - 6), 20:5 (n - 3), 22:6 (n - 3) są podobne, ale np. temperatura topnienia kwasu 18:2 (n - 6) jest o ok. 28°C niższa niż kwasu 18:2 (n - 3). Na podstawie danych tabeli 1 można uznać, że w warunkach fizjologicznych wszystkie wielonienasycone kwasy tłuszczowe występują w stanie płynnym.

Właściwości fosfolipidów zależą od rodzaju obecnych w nich kwasów tłuszczowych. Analogicznie jak w przypadku pojedynczych kwasów na temperaturę topnienia fosfolipidów wpływa liczba i położenie wiązań nienasyconych oraz długość łańcuchów acylowych [2]. Cząsteczka fosfatydylocholina zawierająca jeden kwas stearynowy i jeden kwas oleinowy (18:0/18:1) posiada temperaturę topnienia niższą o 50°C niż cząsteczka zawierająca dwa kwasy stearynowe (18:0/18:0). Wprowadzenie kolejnego wiązania podwójnego (18:0/18:2) obniża temperaturę topnienia o kolejne 22°C [76].

W naturalnych fosfolipidach zazwyczaj nienasycone kwasy występują przy drugim atomie węgla glicerolu, a nasycone przy pierwszym atomie węgla. Istnieją wyjątki od tej reguły, kiedy rozmieszczenie to jest odwrotne, lub przy obu atomach węgla glicerolu występuje taki sam kwas tłuszczowy. W plazmalogenach natomiast kwas tłuszczowy przy pierwszym atomie węgla glicerolu zastąpiony jest cząsteczką aldehydu o równie długim łańcuchu. Zasadą najczęściej występującą w cząsteczce plazmalogenu jest etanoloamina, a w nielicznych przypadkach cholina. Tkanką bogatą w plazmalogeny z etanoloaminą są skrzela ryb [3].

Czynniki wpływające na płynność błon biologicznych. Ruchliwość cząsteczek tworzących dwuwarstwę lipidową badana jest głównie metodą spektroskopii fluorescencyjnej [41] i elektronowego rezonansu paramagnetycznego [27, 28].

Parametry uporządkowania (np. czas korelacji, anizotropia fluorescencji) odpowiednich znaczników spinowych i fluorescencyjnych dają możliwości oceny ruchliwości składników błony. Stwierdzono, że fosfolipidy zawierające wielonienasycone kwasy tłuszczowe są ściślej upakowane w dwuwarstwie, ze stosunkowo niską przepuszczalnością, podczas gdy fosfolipidy z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi tworzą bardziej przepuszczalne błony. Obecność wiązań podwójnych zaburza porządek, w jakim upakowane są równoległe łańcuchy wodorowęglowe i stwarza możliwość ich wzajemnego krzyżowania się w dwuwarstwie. Prowadzi to także do zwiększenia odległości między nimi i w konsekwencji osłabia oddziaływania międzycząsteczkowe. W tym ostatnim przypadku stwierdzono niższą temperaturę punktu przejścia fazowego żel-ciekły kryształ w błonach biologicznych.

Płynność lipidów błony zależna jest także od rodzaju części polarnej fosfolipidów [40, 67]. Polarne „głowy” (kwas fosfatydowy + zasada) fosfatydyloetanolaminy zajmują mniejszą objętość niż fosfatydylocholiny. Tymczasem region niepolarny (acylowy) fosfatydyloetanolaminy zajmuje więcej miejsca niż fosfatydylocholiny, co spowodowane jest większą liczbą nienasyconych wiązań w kwasach tłuszczowych. W rezultacie fosfatydyloetanolamina przyjmuje w przestrzeni konfigurację stożka, podczas gdy fosfatydylocholina – walca [67]. Dlatego cząsteczki fosfatydylocholiny upakowane są w błonie w sposób regularny tworząc stabilne lamelle, natomiast cząsteczki fosfatydyloetanolaminy wykazują silną tendencję do tworzenia struktur nielamellarnych (np. heksagonalnych). Pierwszy typ upakowania powoduje usztywnienie błony. Tendencja zaburzeń struktury dwuwarstwy leży u podstaw postulowanej roli fosfatydyloetanolaminy w procesach fuzji błonowej i transportu między monowarstwami błony [70, 74].

W warunkach fizjologicznych cholesterol wpływa porządkująco na błonę, ponieważ stosunkowo nieodkształcalną, sztywną strukturą pierścieniową wnika między fosfolipidy. Wywiera on usztywniający wpływ na fosfoglicerydy acylowane tylko na pierwszym węglu glicerolu przez nasycone kwasy tłuszczowe (np. fosfatydylocholina 16:0/18:2). Efektu tego nie obserwowano w obecności obu kwasów nienasyconych [60]. Podobny efekt spowodowało włączenie do błony tyroniny. Hormon obniżał płynność błony w stanie ciekłokrystalicznym i powodował wzrost płynności błony znajdującej się w fazie krystalicznej. Natomiast tyroksyna usztywnia błony w temperaturach powyżej punktu przejścia fazowego, ale nie wywołuje upłynnienia fazy krystalicznej [20]. Różnice te to skutek różnych rozmiarów cząsteczek tyroksyny i tyroniny. Obie cząsteczki mają charakter amfipatyczny, posiadają krótki, trójwęglowy łańcuch alanylowy o właściwościach hydrofilowych oraz hydrofobowy układ zbudowany z dwóch pierścieni fenylowych połączonych wiązaniem eterowym. Wnikając częścią niepolarną do rdzenia lipidowego mogą zaburzać uporządkowanie tego regionu. Obecny w pozycji 5' pierścienia

β tyroksyny czwarty atom jodu uniemożliwia wniknięcie części difenylloeterowej pomiędzy łańcuchy węglowodorowe znajdujące się w stanie krystalicznym. W takim przypadku jedynie mniejsza cząsteczka tyroniny narusza płynność błony.

Ważnym czynnikiem regulującym lepkość błon komórkowych są białka. Szybkość dyfuzji lateralnej lipidów jest od trzech do dziesięciu razy większa w błonach nie zawierających białek niż w błonach naturalnych [14, 25, 56]. Różnice te występują w obu monowarstwach błony.

Uporządkowanie dwuwarstwy lipidowej może być zmieniane także pod wpływem związków chemicznych. Wykryto, że środki znieczulające zmniejszają uporządkowanie dwuwarstwy [50]. Przykładem może być tetrakaina – miejscowy środek znieczulający, której kation oddziałuje z ujemnie naładowanymi grupami polarnymi lipidów, prowadząc do rozluźnienia ścisłego upakowania cząsteczek fosfolipidów w błonie.

Temperatura a skład lipidów błonowych. Aklimatyzacja ryb w niskich temperaturach powoduje wzrost ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych w fosfolipidach błonowych. Dlatego błony komórkowe zwierząt zaadaptowanych do niskich temperatur posiadają bardziej nieuporządkowaną strukturę niż błony zwierząt żyjących w wysokich temperaturach [57]. Podobne rezultaty otrzymano w wyniku eksperymentów przeprowadzanych w warunkach *in vitro*. Różnice w składzie chemicznym fosfolipidów kompensują porządkujący wpływ niskiej temperatury lub zaburzający wpływ wysokiej temperatury. Stopień kompensacji termicznej różni się dla różnych gatunków ryb, a także dla różnych typów błon, ale najczęściej waha się w granicach 33–50% [1]. W przypadku mózgu złotej rybki kompensacja błonowa wynikająca z różnic w jej składzie wynosi ok. 20% dla błon mielinowych; 33% dla frakcji błon synaptycznych; 50% dla błon mitochondrialnych, przy zmianie temperatury o 20°C [11]. Kompensacja płynności błon pochodzących z mózgu karpia była znacznie większa i wynosiła od 70% do 80% [7]. Błony plazmatyczne izolowane z hepatocytów pstrąga inkubowanych w 5°C były znacznie bardziej płynne niż błony izolowane z komórek inkubowanych w 20°C. Wzrost płynności był wystarczający dla zmniejszenia o 50% uporządkowania błony wynikającego z obniżenia temperatury. Dodatkowo płynność warstwy wewnętrznej ulegała dużo mniejszym zmianom pod wpływem temperatury niż płynność warstwy zewnętrznej. Obserwacje te prowadzą do wniosku, iż podczas adaptacji termicznej każda monowarstwa w błonie może być niezależnie przebudowywana [67].

Frakcja fosfolipidów z wątroby różnych gatunków ryb wykazuje mniejszy stopień kompensacji termicznej, mieszczący się w granicach 7–10% [19]. Dlatego uważa się, że adaptacji homeowiskotycznej nie podlegają wszystkie

blony komórkowe, ale jedynie te, w których płynność na stałym poziomie jest niezbędna dla zapewnienia funkcji komórek i tkanek. Tak np. błony plazmatyczne pochodzące z plemników pstrąga nie ulegają adaptacji homeowiskotycznej. Ich aktywność metaboliczna jest niska, a przeżywalność w przewodzie genitalnym nie zależy od płynności ich błon plazmatycznych [35].

Wybrane przykłady składu kwasów tłuszczowych lipidów błon plazmatycznych ryb z różnych tkanek w różnych temperaturach przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2

Zawartość kwasów tłuszczowych w tkankach ryb w różnych temperaturach

Kwas tłuszczowy	Lipidy z mózgu karpia [7]	Lipidy z erytrocytów karpia [17]	Lipidy z błon erytrocytów karpia [46]
	5°C < 25°C	5°C < 25°C	5°C < 25°C
16:0	b.z.	b.z.	<
16:1	b.z.	>	b.z.
18:0	<	>	<
18:1 (n-9)	>	b.z.	<
18:2 (n-6)	b.z.	-	b.z.
18:3 (n-3)	>	b.z.	b.z.
20:2 (n-6)	-	<	b.z.
20:4 (n-6)	>	b.z.	b.z.
20:5 (n-3)	b.z.	b.z.	>
22:4 (n-6)	b.z.	<	b.z.
22:5 (n-3)	b.z.	<	b.z.
22:5 (n-6)	-	<	-
22:6 (n-3)	<	b.z.	>
	Lipidy z błon erytrocytów flądry [53]	Lipidy z wątroby pstrąga [42]	Lipidy z mitochondriów wątroby i serca <i>Dicentrarchus labrax</i> [58]
	2,5°C < 25°C	11°C < 21°C	5°C < 25°C
16:0	<	<	b.z.
16:1	b.z.	b.z.	>
18:0	<	b.z.	b.z.
18:1 (n-9)	>	<	>
18:2 (n-6)	b.z.	b.z.	>
18:3 (n-3)	b.z.	b.z.	b.z.
20:2 (n-6)	b.z.	<	>
20:4 (n-6)	b.z.	b.z.	b.z.
20:5 (n-3)	>	>	b.z.
22:4 (n-6)	b.z.	b.z.	-
22:5 (n-3)	>	b.z.	-
22:5 (n-6)	>	b.z.	-
22:6 (n-3)	<	b.z.	<

Eksperymenty *in vivo* zwykle wywołują silniejszą odpowiedź adaptacyjną w porównaniu z hodowlą komórek tych samych tkanek w warunkach *in vitro* [18]. Dlatego sugeruje się, iż pewne składniki osocza krwi mogą także wymieniać się z zewnętrzną błoną plazmatyczną komórek w odpowiedzi na zmiany temperatury. Poparciem dla tej teorii są badania składu kwasów tłuszczowych i fosfolipidów w osoczu ryb żyjących w różnych warunkach termicznych. Większość lipidów osocza ryb występuje w postaci lipoprotein, głównie frakcji HDL, transportującej i rozmieszczającej endo- i egzogenne lipidy wewnątrz organizmu [61, 62]. Lipoproteiny osocza ryb są układem dynamicznym, których skład zależy od częstości i rodzaju lipidów zawartych w pokarmie. Stwierdzono, że stężenie niektórych lipoprotein osocza ryb może zmieniać się w procesie aklimatyzacji termicznej oraz podczas nagłych zmian temperatury środowiska. Zmiany te zachodzą niezależnie od lipidowego składu pożywienia.

W osoczu pstrągów stwierdzono dwu- a nawet trzykrotny wzrost stężenia frakcji VLDL, w ciągu dwóch dni, po obniżeniu lub podwyższeniu temperatury o 10–15°C [63]. Aklimatyzacja w niskiej temperaturze powoduje także szybki i krótkotrwały spadek stężenia lipoprotein frakcji HDL o ok. 20% [63]. Wiadomo, że lipidy tej frakcji bogate są w nienasycone kwasy tłuszczowe, co pozwala przypuszczać, że część lipidów (kwasów tłuszczowych), pojawiających się w błonach komórkowych różnych tkanek podczas adaptacji do niskich temperatur, pochodzi właśnie z lipoprotein osocza. Stwierdzono także, że skład kwasów tłuszczowych osoczowych lipoprotein nie jest stały podczas adaptacji termicznej. Zachodzące zmiany w lipoproteinach w wyniku działania niskiej temperatury pozostają w zgodności z wynikami badań nad adaptacją fosfolipidów z wątroby pstrąga. Wzrost stopnia nienasylenia kwasów tłuszczowych lipoprotein osocza to głównie bardzo znaczne zwiększenie ilości kwasu cerwonowego 22:6(n–3) i spadek zawartości kwasu oleinowego 18:1(n–9), co obserwowano także w fosfolipidach wątroby [20, 40, 64]. Szybka przebudowa fosfolipidów wątroby zachodząca w niskiej temperaturze ze wzrostem proporcji nienasyconych kwasów tłuszczowych stwarza możliwość uwalniania do osocza lipoprotein o składzie kwasów tłuszczowych przystosowanym do zmian temperatury otoczenia. W ten sposób lipoproteiny osocza mogą być źródłem lipidów o stopniu nienasylenia wymaganym dla termicznej adaptacji błon w mniej aktywnych metabolicznie tkankach.

W badaniach adaptacji homeowiskotycznej najczęściej uwagi poświęcono zmianom w nienasyleniu łańcuchów acylowych kwasów tłuszczowych, ale różnice w składzie zasad fosfolipidów są także ważnym przejawem indukowanej termicznie przebudowy błony. Preparaty błon zwierząt zaadaptowanych do niskich temperatur posiadają większe ilości fosfatydyloetanoloaminy i mniejsze ilości fosfatydylocholin niż błony zwierząt bytujących

w wyższej temperaturze. Znaczące zmiany zaobserwowano także dla kardiolipiny, której ilość w skrzelach pstrąga wzrosła po aklimatyzacji w niskiej temperaturze [32]. Mitochondrialne pochodzenie kardiolipiny sugeruje, że w komórkach skrzeli wzrosło natężenie jej syntezy lub ilość mitochondriów. Wywołane termicznie zmiany w zawartości fosfatydylocholiny i fosfatydyloetanoloaminy zaobserwowano także w izolowanych mitochondriach [54, 63], erytrocytach [17] i w całkowitej frakcji lipidowej pochodzącej z różnych tkanek [30]. Przebieg i kierunek obserwowanych zmian sugeruje, że grupy polarnych fosfolipidów mogą brać udział w procesie regulacji fizycznych i fizjologicznych właściwości błon biologicznych podczas aklimatyzacji termicznej.

W wielu przypadkach stwierdzono także wprost proporcjonalną zależność między zawartością cholesterolu w błonie a temperaturą aklimatyzacji [47, 53].

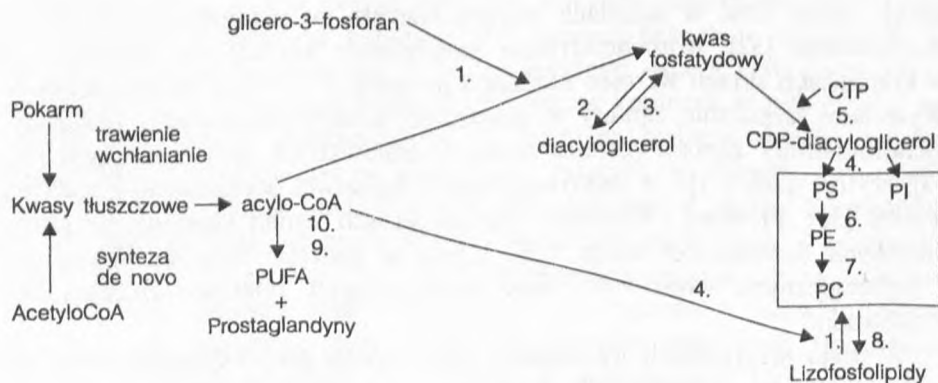
MECHANIZM ADAPTACJI HOMEOWISKOTYCZNEJ

Szlaki metaboliczne, dzięki którym następuje przebudowa fosfolipidów błonowych, bez wątplenia zależą od zmian aktywności enzymów uczestniczących w biosyntezie lipidów.

Metabolizm lipidów u ryb. Przemiana lipidów u ryb jest procesem złożonym, z szeregiem różnic międzygatunkowych. Podstawowa różnica między rybami morskimi a słodkowodnymi dotyczy zdolności do przekształcania 18-C, do 20-C oraz 22-C wysokonienasyconych kwasów tłuszczowych. W odróżnieniu od ryb słodkowodnych ryby morskie odznaczają się niską zdolnością tej przemiany [44] i wymagają w diecie wysokonienasyconych kwasów np. 20:4 (n - 6), 22:6 (n - 3).

Enzymy, regulujące skład kwasów tłuszczowych w błonach są zlokalizowane na retikulum endoplazmatycznym, gdzie zachodzi synteza kwasów tłuszczowych oraz wewnątrz organelli, w których ma miejsce końcowy proces syntezy fosfolipidów. Nadal pozostaje niejasne, który z etapów szlaku metabolicznego lipidów odgrywa istotną rolę w procesach przystosowania składu lipidowego błon do zmieniającej się temperatury. Na rys. 1 przedstawiono podstawowe reakcje metaboliczne lipidów, które wydają się być szczególnie ważne podczas przebudowy fosfolipidów w błonach biologicznych ryb.

Mechanizm, dzięki któremu następuje przebudowa fosfolipidów błonowych w komórkach ryb ze zmianą temperatury, nie jest w pełni poznany. Wzrost stopnia nienasyconienia lipidów błonowych bez wątplenia zależy od enzymów pośredniczących w biosyntezie lipidów. Wydaje się, że tempo adaptacji



Rys. 1. Główne szlaki metabolizmu lipidów u ryb

1 – acylotransferaza; 2 – fosfataza; 3 – kinaza; 4 – fosfatydylotransferaza; 5 – cytydylotransferaza; 6 – dekarboksylaza; 7 – metylotransferaza; 8 – fosfolipaza; 9 – elongaza; 10 – desaturaza
 PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe, PS – fosfatydyloseryna, PE – fosfatydyloetanolamina, PC – fosfatydylocholina, PI – fosfatydyloinozytol [2]

homeowiskotycznej warunkują: acylotransferazy i desaturazy. Acylotransferazy selektywnie włączają kwasy tłuszczowe do hydroksylowych grup glicerolu. Możliwe jest, że odpowiednie acylotransferazy biorące udział w tej reakcji mają różną wrażliwość na temperaturę otoczenia. Na poziomie komórkowym zmiany w składzie kwasów tłuszczowych w fosfolipidach zachodzą bardzo szybko, w ciągu kilku godzin [57]. Tak szybka przemiana wydaje się być raczej wynikiem procesów deacylacji i reacylacji już istniejących fosfolipidów niż ich syntezy *de novo*. Wykazano, że aktywność mikrosomalnej acylotransferazy (acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) w wątrobie pstrąga maleje ze spadkiem temperatury [73]. Zgodne jest to z badaniami, w których wykazano, że tak krótka, jak i długotrwała ekspozycja na niskie temperatury powoduje zwiększenie ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy błon erytrocytów pstrąga [31, 33]. Podobne wyniki otrzymano także w przypadku komórek z mózgu pstrąga [57].

Desaturaza wprowadza nienasycone wiązania w specyficzne pozycje łańcucha acylowego i w ten sposób modyfikuje skład kwasów tłuszczowych. W odpornej na niską temperaturę cyjanobakterii *Synechocystis* PCC6803 stwierdzono występowanie genu *desA*, kodującego $\Delta 12$ desaturazę. Transfekcja tego genu do wrażliwej na zimno cyjanobakterii *Anacystis nidulus* powoduje obniżenie temperatury przejścia fazowego błon plazmatycznych u transformantów i w konsekwencji wzrost tolerancji na niskie temperatury [55]. Możliwe, że podobny mechanizm działa u ryb. Dowiedziono, że gwałtowne obniżanie temperatury powoduje indukcję wątrobowej $\Delta 9$ desaturazy u karpi,

co skorelowane jest ze zmianami mikrolepkości błony retikulum endoplazmatycznego [68].

Komórkowa percepcja zmian temperatury. O ile do tej pory niewiele wiadomo o przemianach prowadzących do zmiany składu kwasów tłuszczowych u ryb, to nie uzyskano żadnych danych o udziale w tym procesie receptorów i aktywatorów komórkowych. Na podstawie odkryć, że indukowaną niską temperaturą desaturację u cyjanobakterii hamuje rifampicyna i chloramfenikol, inhibujące prokariotyczną transkrypcję i translację, zasugerowano, że najważniejszym etapem tej regulacji jest synteza desaturazy *de novo* [48, 60]. Według innych autorów nasiloną desaturacja w niskich temperaturach jest rezultatem ujemnego współczynnika temperaturowego dla aktywności desaturazy [52]. Kolejna hipoteza sugeruje, że synteza *de novo* nasyconych lipidów ulega silnemu hamowaniu w niskich temperaturach, podczas gdy desaturaza kwasów tłuszczowych jest stosunkowo aktywna, co prowadzi do wzrostu stopnia nienasycenia lipidów błonowych w niskich temperaturach [34]. Kiedy poznano budowę genu *desA* *Synechocystis* PCC6803 stało się możliwe badanie wpływu niskich temperatur na jego ekspresję i tym samym mechanizmów desaturacji lipidów błonowych. Stwierdzono, że niska temperatura indukuje ekspresję genu dla desaturazy, co prowadzi do zwiększonej desaturacji kwasów tłuszczowych. Komórki cyjanobakterii reagują raczej na zmiany temperatury, a nie na jej absolutne wartości [39].

Bezpośrednim, natychmiastowym skutkiem obniżenia temperatury jest spadek płynności błony. Dla ustalenia – czy różnica płynności lipidów błonowych to pierwszy sygnał dla komórki o zmianach temperatury – przebadano wpływ katalizowanego *in vitro* uwodorowania lipidów błonowych na ekspresję genu *desA* u *Synechocystis* PCC6803. Stwierdzono, że spadek płynności lipidów błonowych wywołany uwodorowaniem stymuluje ekspresję genu, a następnie desaturację lipidów błonowych [71]. Podobne wyniki uzyskano w przypadku komórek drożdży – *Candida lipolytica*, gdzie uwodorowanie lipidów indukowało wzrost aktywności 18:1 – CoA desaturazy [34]. Ten wzrost może być wynikiem zwiększonego stężenia enzymu spowodowanym nasileniem transkrypcji i translacji odpowiedniego genu lub też skutkiem zmian konformacyjnych w jego cząsteczce. Aktywność systemu desaturazy wymaga współdziałania trzech białek: reduktazy NADH-cytochrom b5, cytochromu b5, i właściwej desaturazy. Możliwe, że oddziaływania pomiędzy tymi polipeptydami mają miejsce tylko w środowisku o stosunkowo dużej mikrolepkości.

LITERATURA

- [1] Behan-Martin M. K., Jones G. R., Bowler K., Cossins A. R. (1993), *Biochim. Biophys. Acta*, **1151**, 216-222.
- [2] Bell M. V., Henderson R. J., Sargent J. R. (1986), *Comp. Biochem. Physiol.*, **821**, 711-719.
- [3] Bell M. V., Simpson C. M. F., Sargent J. R. (1983), *Lipids*, **18**, 720-726.
- [4] Billard R., Peter R. E. (1976), *Gen. comp. Endocr.*, **30**, 451-456.
- [5] Bowler K., Duncan C. J., Gladwell R. T., Davison T. F. (1973), *Comp. Biochem. Physiol.*, **451**, 441-450.
- [6] Brenner R. R. (1984), *Prog. Lipid Res.*, **23**, 69-96.
- [7] Buda C., Dey I., Balogh N., Horvath L. I., Maderspach K., Juhasz M., Yeo Y. K., Farkas T. (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8234-8238.
- [8] Chapman D., Bryne P., Shipley G. G. (1966), *Proc. R. Soc., A* **290**, 115-142.
- [9] Chudzik J., Houston A. H. (1983), *Can. J. Zool.*, **61**, 1322-1325.
- [10] Clementi M. E., Condo S. G., Castagnola M., Giardina B. (1994), *Eur. J. Biochem.*, **223**, 309-317.
- [11] Cossins A. R., Prosser C. L. (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **687**, 303-309.
- [12] Crawshaw L. J. (1984), *Am. J. Physiol.*, **246**, R479-R486.
- [13] Cress A. E., Genner E. W. (1980), *Nature*, **283**, 677-679.
- [14] Cribier S., Morrot G., Neumann J. M., Devaux P. F. (1990), *Eur. Biophys. J.*, **18**, 33-41.
- [15] Crockford T., Wommack K. E., Johnston I. A., McAndrew B. J., Mutungi G., Johnston T. P. (1991), *Journ. Musc. Res. Cell. Mot.*, **12**, 439-446.
- [16] Van Deenen L. L. M., Hontsmuller U. M. T., Dellass G. H., Mulder E. (1962), *J. Pharm. Pharmacol.*, **4**, 429-444.
- [17] Dey I., Buda C., Wiik T., Halver J. E., Farkas T. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7498-7502.
- [18] Dey I., Szegletes T., Buda Cs., Nemcsok J., Farkas T. (1993), *Lipids*, **28**, 743-746.
- [19] Dey I., Farkas T. (1992), *Fish Physiol. Biochem.*, **10**, 347-355.
- [20] Farias R. N., Chehin R. N., Rintoul M. R., Morero R. D. (1995), *J. Membrane Biol.*, **143**, 135-141.
- [21] Farkas T. (1984), *Comp. Biochem. Physiol.*, **79B**, 531-535.
- [22] Gehrken U., Somme L. (1987), *J. Insect Physiol.*, **33**, 987-991.
- [23] Goldspink G. (1995), *J. Therm. Biol.*, **20**, 167-174.
- [24] Gladwell R. T., Duncan C. J., Bowler K. (1976b), *J. Therm. Biol.*, **1**, 79-94.
- [25] Golan B. E., Alecio M. R., Veatch W. R., Rando R. R. (1984), *Biochem.*, **23**, 332-339.
- [26] Guo X.-F., Nakaya M., Watabe S. (1994), *J. Biochem.*, **116**, 728-735.
- [27] Gwoździński K. (1991), *Rad. Biol. Med.*, **11**, 557-561.
- [28] Gwoździński K. (1992), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **23**, 426-430.
- [29] Harper A. A., Shelton J. R., Watt P. W. (1989), *J. Exp. Biol.*, **147**, 237-248.
- [30] Hazel J. R. (1979), *Am. J. Physiol.*, **236**, R91-R101.
- [31] Hazel J. R. (1983), *J. Exp. Zool.*, **227**, 167-176.
- [32] Hazel J. R., Carpenter R. (1985), *J. Comp. Physiol. B.*, **155**, 597-602.
- [33] Hazel J. R., Hagar A. F., Pruitt N. L. (1987), *Biochim. Biophys. Acta*, **918**, 149-158.

- [34] Horvath I., Torok Z., Vigh L., Kates M. (1991), *Biochem. Biophys. Acta*, **1085**, 126-130.
- [35] Labbe C., Maise G., Muller K., Zachowski A., Kaushik S., Loir M. (1995), *Lipids*, **30**, 23-33.
- [36] Lagerspetz K. Y. H., Korhonen I. A., Tiiska A. J. (1995), *J. Therm. Biol.*, **20**, 43-48.
- [37] Livermore R. C., Hazel J. R. (1988), *J. Comp. Physiol.*, **158B**, 363-368.
- [38] Logue J., Tiku P., Cossins A. R. (1995), *J. Therm. Biol.*, **20**, 191-197.
- [39] Los D., Horvath I., Vigh L., Murata N. (1993), *F. E. B. S.*, **318**, 57-60.
- [40] Mac Donald A. G. (1988), *Biochem. J.*, **256**, 313-327.
- [41] Maire C., Bouchy M., Donner M., Andre J. C. (1992), *Biorheology*, **29**, 507-519.
- [42] Malak N. A., Brichon G., Meister R., Zwingelstein G. (1989), *Lipids*, **24**, 201-207.
- [43] Maresca B., Cossins A. R. (1993), *Nature*, **365**, 606-607.
- [44] Mourente G., Tocher D. R. (1994), *Biochim. Biophys. Acta*, **1212**, 109-118.
- [45] Di Prisco G., Tamburrini M. (1992), *Comp. Biochem. Physiol.*, **102B**, 661-671.
- [46] Rady A. A. (1993), *Comp. Biochem. Physiol.*, **105A**, 513-518.
- [47] Roche H., Peres G. (1984), *Comp. Biochem. Physiol.*, **78B**, 755-759.
- [48] Sato N., Murata N. (1981), *Plant Cell Physiol.*, **22**, 1043-1050.
- [49] Schlame M., Horvath L., Vigh L. (1990), *Biochem. J.*, **265**, 79-85.
- [50] Shimooka T., Shibata A., Terada H. (1992), *Biochim. Biophys. Acta*, **1104**, 261-268.
- [51] Sinensky M. (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 522-525.
- [52] Skrives L., Thompson G. A. (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **572**, 376-381.
- [53] Sorensen P. G. (1993), *Comp. Biochem. Physiol.*, **106B**, 907-912.
- [54] Thillart Van den G., De Bruin G. (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 439-447.
- [55] Thompson G. A. (1988), *Trend Biochem. Sci.*, **8**, 43-59.
- [56] Tocanne J. F., Cezanne L., Lopez A., Piknova B., Schram V., Tournier J. F., Welby M. (1994), *Chem. Phys. Lipids*, **73**, 139-158.
- [57] Tocher D. R., Sargent J. R. (1992), *Comp. Biochem. Physiol.*, **101B**, 353-359.
- [58] Trigari G., Pirini M., Ventrella V., Pagliarani A., Trombetti F., Borgatti A. R. (1992), *Lipids*, **27**, 371-377.
- [59] Wada H., Gombos Z., Murata N. (1990), *Nature*, **347**, 200-203.
- [60] Wada H., Murata N. (1990), *Plant. Physiol.*, **92**, 1062-1069.
- [61] Wallaert C., Babin P. J. (1993), *Biochim. Biophys. Acta*, **1210**, 23-26.
- [62] Wallaert C., Babin P. J. (1994), *J. Lipid Res.*, **35**, 1619-1633.
- [63] Wallaert C., Babin P. J. (1994), *Comp. Biochem. Physiol.*, **109B**, 473-487.
- [64] Wallaert C., Babin P. J. (1994), *Lipids*, **29**, 373-376.
- [65] Watabe S., Hwang G. C., Ushio H., Hashimoto K. (1990), *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 219-221.
- [66] Watabe S., Guo X. F., Hwang G. C. (1994), *J. Therm. Biol.*, **19**, 261-268.
- [67] Williams E. E., Hazel J. R. (1994), *Amer. Physiol. Soc.*, **94**, R773-R780.
- [68] Wodtke E., Cossins A. R. (1991), *Biochim. Biophys. Acta*, **1064**, 343-350.
- [69] Wodtke E. (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 698-709.
- [70] Verkleij A. J. (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **779**, 43-64.
- [71] Vigh L., Los D. A., Horvath I., Murata N. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9090-9094.
- [72] Vornanen M. (1994), *Amer. Physiol. Soc.*, **94**, R1567-R1573.
- [73] Vornanen M. (1994), *Can. J. Zool.*, **72**, 433-442.

- [74] Zachowski A. (1993), *Biochem. J.*, **294**, 1-14.
[75] Zolman R. T., Christie W. W. (1967), *Chem. Phys. Lipids*, **1**, 407-423.
[76] Zoolbear K. B., Berde C. B., Keough K. M. W. (1983), *Biochem.*, **22**, 1466-1473.

Wpłynęło do Redakcji Foliai
7.07.1995 r.

Katedra Biofizyki Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Anna Filipiak, Roman Gondko, Teresa Gabryelak

HOMEOWISCOUS ADAPTATION IN FISH

Homeowiscous adaptation is a common phenomenon observed in poikilotherms which remain active at different temperatures. It is usually caused by changes in fatty acids pool in cellular membranes, what enable to maintain the physical structure of their membranes within tolerable limits. The increased unsaturation of membrane lipids has as its basis some changes in activity of the appropriate enzymes. Fluctuations in fluidity of membrane lipids activate transcription of the genes for the suitable enzymes.

W [E0]
W [E0]
W [E0]