

УДК 597.5(269):612.117.2:591.149.12:577.114

О.Л. Савицький¹, К.М. Даниленко², Д.Г. Луценко^{3*}

Осмоліти крові риб *Notothenia coriiceps*, *Chaenocephalus aceratus*, *Parachaenichthys charcoti* з району Аргентинських островів (Антарктика)

UDC 597.5(269):612.117.2:591.149.12:577.114

O.L. Savytskyi¹, K.M. Danylenko², D.G. Lutsenko^{3*}

Blood Osmolytes of Fish *Notothenia coriiceps*, *Chaenocephalus aceratus*, *Parachaenichthys charcoti* caught near the Argentine Islands, Antarctica

Ключові слова: природні криопротектори, осмоліти крові, антарктичні риби, *Notothenia coriiceps*, *Chaenocephalus aceratus*, *Parachaenichthys charcoti*, сечовина, глюкоза, калій.

Ключевые слова: естественные криопротекторы, осмолиты крови, антарктические рыбы, *Notothenia coriiceps*, *Chaenocephalus aceratus*, *Parachaenichthys charcoti*, мочевины, глюкоза, калий.

Key words: natural cryoprotectants, blood osmolytes, Antarctic fishes, *Notothenia coriiceps*, *Chaenocephalus aceratus*, *Parachaenichthys charcoti*, urea, glucose, potassium.

Постійна низька температура і висока концентрація кисню в антарктичних водах привели до формування специфічних адаптацій у їх мешканців. Дослідження таких адаптаційних механізмів, необхідних тваринам для виживання в екстремально холодній воді, можуть допомогти в розробці нових альтернативних методів криоконсервування клітин і тканин.

У 1969 р. А. DeVries і D. Wohlschlag вперше виявили у декількох видів антарктичних риб особливі глікопротеїнові сполуки, які запобігають льодотворенню в крові за негативних значень температури води (–1,86°C). Такі сполуки притаманні практично усім представникам підряду *Notothenioidei*, які мешкають переважно в водах Південного океану. За кількістю і видовим різноманіттям *Notothenioidei* складають абсолютну більшість серед усіх антарктичних риб. Виявлені сполуки отримали назву антифриз-глікопротеїнів (AFGP) [3]. Протягом останніх десятиріч дослідження механізмів криостійкості риб були переважно сконцентровані на виявленні нових антифризних білків. Крім AFGP, у крові різних видів риб, які постійно чи тимчасово живуть у холодній воді, виявлено ще чотири типи антифриз-протеїнів (AFP), а також антифризпотенціюючі протеїни (AFPP) [4, 6]. Коментуючи ці дослідження, J.A. Raymond зазначив: «швидкий прогрес у дослідженні антифризних білків відсунув у тінь відомий факт, що у багатьох морських

Constant low temperature and high concentration of oxygen in Antarctic waters caused the formation of specific adaptations in their inhabitants. The study of the mechanisms used by these animals for surviving in extreme cold water can help in development of novel methods to cryopreserve cells and tissues.

In 1969, A. DeVries and D. Wohlschlag discovered special glycoprotein compounds, preventing ice formation in blood of some Antarctic fishes at negative water temperature (–1.86°C). These compounds were inherent to almost all representatives of the suborder *Notothenioidei*, inhabiting the Southern Ocean. Considering the number and species diversity the *Notothenioidei* made an absolute majority of all Antarctic fish. These compounds were defined as antifreeze glycoproteins (AFGP) [3]. Over the last decades the investigations on cryostability of fish have focused primarily on the discovery of new antifreeze proteins. In addition to AFGP, four different types of antifreeze proteins (AFP) have been identified in various species of fish permanently or temporarily lived in cold water, as well as antifreeze-potentiating proteins (AFPP) [4, 6]. Commenting on these studies, Raymond J.A. said: ‘The rapid progress on the antifreeze peptides has tended to overshadow the fact that many marine fishes also increase concentrations of inorganic ions and organic osmolytes in response to cold. In some cases, these increases can

¹ Інститут гідробіології НАН України, м. Київ, Україна

² Національний антарктичний науковий центр МОН України, м. Київ, Україна

³ Відділ кріофізіології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

*Автор, якому необхідно надіслати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електрона пошта: dmytro.lutsenko@cryo.org.ua

Надійшла 26.10.2017

Прийнята до друку 07.11.2017

© 2017 O.L. Savytskyi et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

¹ Institute of Hydrobiology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

² National Antarctic Scientific Center of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³ Department of Cryophysiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavska, Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: dmytro.lutsenko@cryo.org.ua

Received October, 26, 2017

Accepted November, 07, 2017

кісткових риб під впливом холоду також помітно збільшуються концентрації неорганічних іонів та органічних осмолітів. У деяких випадках таке підвищення може приводити до більшої криостійкості, ніж це можуть забезпечити білки» [11].

Відомо, що антифриз-протеїни не здатні проникати крізь клітинну мембрану, а низькомолекулярні сполуки (такі як сечовина або глюкоза) вільно проникають всередину клітини, забезпечуючи криозахист її внутрішнього середовища. Крім того, саме органічні осмоліти та неорганічні іони забезпечують високий рівень осмолярності крові у антарктичних риб. За таких умов температура льодоутворення у внутрішніх рідинах риб стає нижчою за температуру замерзання океанської води [11, 14]. Антифризні білки на відміну від осмолітів, з одного боку, перешкоджають подальшому росту кристалів льоду, які вже утворилися у рідині, а з іншого – запобігають таненню льоду при перевищенні відповідної температури [2]. Важливою здатністю окремих осмолітів крові у риб, які мешкають на глибинах від 0 до 800 м, є забезпечення стабілізації лігандних зв'язків білкових молекул, що запобігає їх пошкодженню під дією гідростатичного тиску [14]. До таких низькомолекулярних сполук, які виявляються у крові багатьох холодноводних риб у підвищених концентраціях і які відомі своїми криозахисними властивостями, відносять згадані вище сечовину і глюкозу. Оскільки основним джерелом утворення сечовини у більшості антарктичних риб є сечова кислота, тому важливо оцінювати її рівень. Крім того вважається, що високий рівень осмолярності крові у антарктичних риб забезпечується за рахунок збільшення концентрації іонів K^+ у сироватці крові [9].

У роботі вимірювали рівень глюкози, сечовини, сечової кислоти та іонів K^+ у крові представників трьох родин антарктичних риб підряду *Notothenioidei*: *Nototheniidae* (*Notothenia coriiceps* Richardson), *Channichthyidae* (*Chaenocephalus aceratus* Lonnberg), *Bathydraconidae* (*Parachaenichthys charcoti* Vaillant). Усі риби були впіймані на гачок із глибин 15–30 м у весняно-літній період (жовтень 2016 р. – січень 2017 р.) поблизу Української антарктичної станції «Академік Вернадський» в акваторії Аргентинських островів (65°14'S, 64°15'W). Температура води на глибині ловлі складала –1,8...–1,0°C. Кров забирали гепаринізованим шприцем із хвостової артерії риби відразу після вилову. Рівень осмолітів досліджували в цільній крові на автоматичному біохімічному аналізаторі крові «Reflotron Plus» («Roche Diagnostics GmbH», Німеччина) за кімнатної температури. Отримані показники були приведені до одиниць СІ. Для статистичної обробки даних використовували програму «Statistica 10» («StatSoft, Inc.», США), значущість

make a greater contribution to freezing resistance than do the peptides' [11].

The antifreeze proteins are known to be unable of passing through the cell membrane, but low molecular compounds (like urea or glucose) freely penetrate into the cell, providing cryoprotection of its internal environment. In addition, the organic osmolytes and inorganic ions allow maintaining a high level of blood osmolarity in Antarctic fish, which contributes to lowering the melting temperature in internal fluids below the freezing point of ocean water [11, 14]. Unlike osmolytes, antifreeze proteins on the one hand block the growth of ice crystals in the liquid, and on another hand they protect the ice against melting under overheating [2]. An important ability of certain blood osmolytes of fish, living at depths from 0 to 800 m, is providing the stabilization of ligand binding of protein molecules, that prevents their damage under the effect of hydrostatic pressure [14]. These low molecular weight compounds, which could be found in the blood of many cold-water fish in the higher concentrations and known for their cryoprotective properties, include the already mentioned urea and glucose. Whereas the uric acid is the main source of urea in most Antarctic fishes, it is important to investigate its concentration as well. Also, a high level of osmolarity in Antarctic fish blood is assumed to be provided due to an increased concentration of K^+ ions in blood serum [9].

In this work, we measured the concentration of glucose, urea, uric acid and K^+ ions in the blood of representatives of three families of Antarctic fish from suborder *Notothenioidei*: *Nototheniidae* (*Notothenia coriiceps* Richardson), *Channichthyidae* (*Chaenocephalus aceratus* Lonnberg), *Bathydraconidae* (*Parachaenichthys charcoti* Vaillant). All fishes were caught by bait from depths of 15–30 m within the spring-summer period (October 2016 – January 2017) near the Ukrainian Antarctic Station 'Akademik Vernadsky', the Argentine Islands, Antarctica (65°14'S, 64°15'W). The water temperature at a depth of fishing was –1.8...–1.0°C. The blood was collected with a heparinized syringe from the fish caudal artery immediately after the landing. The osmolytes concentration was studied in a whole blood using an automatic biochemical blood analyzer Reflotron Plus (Roche Diagnostics GmbH) at room temperature. The data were reduced to the SI units. For statistical data processing we used Statistica 10 (StatSoft, Inc.), the significance of differences was estimated by the nonparametric Mann-Whitney U Test.

For the study, we selected the blood mainly in large specimens of *N. coriiceps* and in all representatives of *P. charcoti* and *C. aceratus* caught during this period. Our results are shown in the Table. The special attention is drawn to significant differences between the concen-



відмінностей оцінювали за непараметричним критерієм Манна-Уїтні.

Для дослідження ми відбирали кров переважно у великих екземплярів *N. coriiceps* та в усіх відловлених у цей проміжок часу представників *P. charcoti* та *C. aceratus*. Отримані результати наведено в таблиці. Звертають на себе увагу значущі розбіжності між показниками концентрації усіх досліджуваних осмолітів у *P. charcoti* та *C. aceratus*. На наш погляд, така різниця між концентраціями осмолітів у крові цих риб може бути обумовлена екологічними особливостями існування кожного з видів. Для *P. charcoti* притаманний донний спосіб життя. Вони мешкають переважно на мілководді антарктичного шельфу і тому часто контактують із донним льодом. *Notothenia coriiceps* мешкає у схожих із *P. charcoti* умовах, тому більшість досліджених показників у них близькі за значеннями, але відрізняються від показників бентопелагічного хижака *C. aceratus*, який практично не контактує з льодом.

На даний час існує дуже мало публікацій, у яких наводяться дані щодо рівня осмолітів у крові антарктичних риб. Ми не виявили жодних відомостей відносно осмолітного складу крові *P. charcoti*, а для *C. aceratus* знайшли лише публікації, в яких наведено показники рівня глюкози та її обміну у сироватці крові [1]. Тільки для *N. coriiceps* відомі дані відносно усіх досліджуваних нами осмолітів. Слід зазначити, що в літературі зустрічаються окремі відомості стосовно рівня глюкози, сечовини, K^+ -іонів та інших осмолітів у інших видів антарктичних риб [1, 5, 9, 11–13]. При цьому деякі показники навіть у досить близьких видів риб, які були відловлені в схожих умовах, іноді значно відрізняються, але це явище поки не має однозначного пояснення [5, 12]. Тому у роботі ми не порівнювали наші дані з результатами, отриманими на інших видах риб. Більшість літературних даних щодо досліджуваних нами видів були отримані на рибках, вилов яких здійснювався влітку в водах Південних Оркнейських та Південних Шетландських островів, що знаходяться значно північніше Аргентинських островів і де літня температура води складає $1...2^{\circ}C$ [1, 5, 13]. Згідно з визначником FAO [7] Аргентинські острови розташовані на найпівденнішій границі ареалів *P. charcoti* та *C. aceratus* в Антарктиці, тому наші результати ми будемо порівнювати з даними, отриманими на північних границях ареалу цих риб. Одержані нами показники виявилися в 1,5–3 рази вищими, ніж були зафіксовані у риб, виловлених біля островів Сігні та Кінг Джордж [1, 5, 13]. Одержані

Вміст осмолітів у крові антарктичних риб (*Mean ± SD*)
Contents of osmolytes in the Antarctic fish blood (*Mean ± SD*)

Показники Indices	Види риб Species		
	<i>Notothenia coriiceps</i>	<i>Chaenocephalus aceratus</i>	<i>Parachaenichthys charcoti</i>
Кількість риб Number of fishes	16	57	15
Довжина, мм Long, mm	385,94 ± 55,62	535,63 ± 38,69	476,33 ± 22,87
Маса, г Weight, g	999,19 ± 389,35	1305,39 ± 315,15	787,47 ± 284,73
Глюкоза, мМ Glucose, mM	4,03 ± 3,87	2,81 ± 1,64 #	4,33 ± 2,65
K^+ , мМ K^+ , mM	8,24 ± 6,45*	4,91 ± 1,27 #	10,33 ± 2,92
Сечова кислота, мМ Uric acid, mM	0,17 ± 0,06	0,14 ± 0,03 #	0,17 ± 0,05
Сечовина, мМ Urea, mM	13,45 ± 13,26 #	18,77 ± 13,83 #	18,36 ± 5,41

Примітки: різниця статистично значуща по відношенню до *P. charcoti*; * – $p < 0,05$, # – $p < 0,01$.

Note: * – the differences are statistically significant if compared to *P. charcoti*; * – $p < 0,05$, # – $p < 0,01$.

trations of all the studied osmolytes in *P. charcoti* and *C. aceratus*. We believe that such a difference in the concentrations of blood osmolytes of these fish can be explained by certain ecological preferences of each species. *P. charcoti* is a benthic fish and predominantly inhabit the shallow Antarctic shelf, that is why they are often forced to contact with the anchor ice. *N. coriiceps* is living under similar conditions as *P. charcoti*, so most their indices are close in values and different from *C. aceratus*, which is benthopelagic carnivore and virtually has no contact with the ice in water.

Currently there are very few reports, providing the data about the blood osmolytes of Antarctic fish. We have not found any information about the osmolyte contents in the blood of *P. charcoti*, and for *C. aceratus*, only the data on glucose concentration and its metabolism in serum were available [1]. Just for *N. coriiceps* there are data about all the osmolytes that we have investigated. There is also an information about urea, glucose, K^+ ion and other osmolytes in the other species of Antarctic fish [1, 5, 9, 11, 12, 13]. Several indices sometimes have significant differences even between relatively close species caught under similar conditions, but this phenomenon has not yet been clearly explained [5, 12]. Thus, in this study we did not compare our data with the results, obtained in other species. Most of the previously published data about the studied species was obtained in the fish, which was caught in the summer in the waters near the South Orkney and South Shetland Islands, located far to the north of the Argentine Islands,

нами результати підтверджують залежність концентрацій осмолітів крові антарктичних риб від сезонних і широтних коливань температури води [9–11].

Ми погоджуємося з думкою деяких авторів [3, 8], які пояснюють високий рівень осмолярності крові мешканців антарктичного мілководдя їх частим контактом із льодом (зокрема й із донним). Підвищений рівень усіх видів осмолітів у цих риб запобігає утворенню і росту кристалів льоду у внутрішніх рідинах. Крім того, *C. aceratus* належать до видів із ареалом зі значним перепадом глибин (0–770 м), і в цьому випадку сечовина може виконувати функцію не лише криопротектора, але й стабілізатора лігандних зв'язків у білкових молекулах при підвищенні гідростатичного тиску за умов взаємодії з триметиламіном-N-оксидом (нами не досліджувався) [14].

Таким чином, вперше отримано дані щодо складу осмолітів крові у *P. charcoti*. Крім того, нами уточнено рівень сечовини, глюкози та іонів K^+ у крові *N. coriiceps* і *C. aceratus*, виловлених на мілководді Антарктичного шельфу (Аргентинські острови) в умовах постійних негативних значень температури води. Одержані результати підтверджують припущення, що концентрації осмолітів крові антарктичних риб пов'язані з сезонними та широтними коливаннями температури води.

Роботу виконано в рамках «Державної цільової науково-технічної програми проведення досліджень в Антарктиці на 2011–2020 роки» за підтримки НАНЦ України.

Автори висловлюють подяку Національному Антарктичному науковому центру при МОН України за надану можливість провести дослідження в Антарктиці, а також усім членам 21-ї Української антарктичної експедиції за допомогу у виллові риби для дослідження.

Література

1. Bacila M., Rosa R., Rodrigues E. et al. Tissue metabolism of the ice-fish *Chaenocephalus aceratus* Lonnberg // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1989. – Vol. 92B, №2. – P. 313–318.
2. Cziko P.A., DeVries A.L., Evans C.W., Cheng C.-H.C. Antifreeze protein-induced superheating of ice inside antarctic nototheniid fishes inhibits melting during summer warming // *PNAS*. – 2014. – Vol. 111, №40. – P. 14583–14588.
3. DeVries A.L., Wohlschlag D.E. Freezing resistance in some antarctic fishes // *Science*. – 1969. – Vol. 163, №3871. – P. 1073–1075.
4. Duman J.G. Animal ice-binding (antifreeze) proteins and glycolipids: an overview with emphasis on physiological function // *J. Exp. Biol.* – 2015. – Vol. 218, Pt. 12. – P. 1846–1855.
5. Egginton S., Taylor E.W., Wilson R.W. et al. Stress response in the Antarctic teleosts (*Notothenia neglecta* Nybelin and *N. rossii* Richardson) // *J. Fish. Biol.* – 1991. – Vol. 38. – P. 225–235.

where the summer water temperature was 1...2°C [1, 5, 13]. According to the FAO identification guide [7], the Argentine islands are located on the most southern boundary of the *P. charcoti* and *C. aceratus* habitats in Antarctica, so we compared our results with the data one obtained on the northern boundaries of these fishes habitats. Our results were found to be 1,5–3 times higher than data in fish caught near Signy and King George islands [1, 5, 13]. In our opinion, the results obtained by us confirm the dependence of blood osmolyte concentrations of Antarctic fish with seasonal and latitudinal water temperature fluctuations [9–11].

We have agreed with the explanations of several authors on a high osmolarity of blood in the shallow-water Antarctic fishes which often have a contact with ice (including anchor ice). Higher concentration of all osmolytes in the internal fluids of these fishes can prevent the formation and growth of ice crystals [3, 8]. Moreover, representatives of *C. aceratus* could be found at a significant depth (0–770 m) [7]. In these fish, urea can perform the function of either a cryoprotectant, or a stabilizer of ligand bonds in protein molecules during interaction with trimethylamine-N-oxide (not investigated by us) at increased hydrostatic pressure [14].

Thus, for first time we obtained the data on the composition of blood osmolytes in *Parachaenichthys charcoti*. We also updated the data on the level of urea, glucose and K^+ ions in the blood of *Notothenia coriiceps* and *Chaenocephalus aceratus* caught in the shallow waters of Antarctic shelf at the Argentine Islands under constant negative water temperature. Our data supported the assumption about the seasonal and latitudinal variations of osmolyte concentrations in the blood of Antarctic fish related to water temperature.

The work was carried out within the frames of the State Targeted Scientific and Technical Program of Research in Antarctica for 2011–2020 and supported by the National Antarctic Scientific Center of Ministry of Education and Science of Ukraine.

The authors acknowledge the National Antarctic Scientific Center of Ukraine for the opportunity to carry out the investigations in Antarctica, as well as to all the members of the 21st Ukrainian Antarctic expedition for their assistance in collecting fish.

References

1. Bacila M., Rosa R., Rodrigues E. et al. Tissue metabolism of the ice-fish *Chaenocephalus aceratus* Lonnberg. *Comp. Biochem. Physiol* 1989; 92B (2): 313–318.
2. Cziko P.A., DeVries A.L., Evans C.W., Cheng C.-H.C. Antifreeze protein-induced superheating of ice inside Antarctic nototheniid fishes inhibits melting during summer warming. *PNAS* 2014; 111 (40): 14583–14588.
3. DeVries A.L., Wohlschlag D.E. Freezing resistance in some antarctic Fishes. *Science* 1969; 163 (3871): 1073–1075.



6. Fields L.G., DeVries A.L. Variation in blood serum antifreeze activity of Antarctic Trematomus fishes across habitat temperature and depth // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* – 2015. – Vol. 185. – P. 43–50.
7. Fisher W., Hureau J.C. (Eds.) FAO species identification sheets for fishery purpose. Southern ocean (Fishing areas 48, 58, and 88) (CCAMLR Convention Area), Vol. 2. – Rome, FAO, 1985. – P. 233–470.
8. Helfman G.S., Collette B.B., Facey D.E., Bowen B.W. The diversity of fishes, 2 ed. – John Wiley & Sons, 2009.
9. O'Grady S.M., DeVries A.L. Osmotic and ionic regulation in polar fishes // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* – 1982. – Vol. 57. – P. 219–228.
10. Raymond J.A. Seasonal variations of trimethylamine oxide and urea in the blood of a cold-adapted marine teleost, the rainbow smelt // *Fish Physiol. Biochem.* – 1994. – Vol. 13, №1. – P. 13–22.
11. Raymond J.A. Responses of marine fishes to freezing temperatures: a new look at colligative mechanisms in: *Advances In Molecular And Cell Biology*, Vol. 19 / Ed. by E. Edward Bittar, John S. Willis. – Elsevier, 1997. – P. 33–55.
12. Raymond J.A., DeVries A.L. Elevated concentrations and synthetic pathways of trimethylamine oxide and urea in some teleost fishes of McMurdo Sound, Antarctica // *Fish. Physiol. Biochem.* – 1998. – Vol. 18. – P. 387–398.
13. Rodrigues E., Feijo-Oliveira M., Gannabathula S.V. et al. A baseline studies on plasmatic constituents in the *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica // *INCT-APA Annual Activity Report.* – 2012. – Vol. 1. – P. 144–147.
14. Yancey P.H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses // *J. Exp. Biol.* – 2005. – Vol. 208. – P. 2819–2830.
4. Duman J.G. Animal ice-binding (antifreeze) proteins and glycolipids: an overview with emphasis on physiological function. *J Exp Biol* 2015; 218 (12): 1846–1855.
5. Egginton S., Taylor E.W., Wilson R.W. et al. Stress response in the Antarctic teleosts (*Notothenia neglecta* Nybelin and *N. rossii* Richardson). *J Fish Biol* 1991; 38: 225–235.
6. Fields L.G., DeVries A.L. Variation in blood serum antifreeze activity of Antarctic Trematomus fishes across habitat temperature and depth. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2015; 185: 43–50.
7. Fisher W., Hureau J.C. (Eds.) FAO species identification sheets for fishery purpose. Southern ocean (Fishing areas 48, 58, and 88) (CCAMLR Convention Area), Vol. 2. – Rome: FAO; 1985.
8. Helfman G.S., Collette B.B., Facey D.E., Bowen B.W. The diversity of fishes, 2nd ed. – John Wiley & Sons; 2009.
9. O'Grady S.M., DeVries A.L. Osmotic and ionic regulation in polar fishes. *J Exp Mar Biol Ecol* 1982; 57: 219–228.
10. Raymond J. A. Seasonal variations of trimethylamine oxide and urea in the blood of a cold-adapted marine teleost, the rainbow smelt. *Fish Physiol Biochem* 1994; 13(1): 13–22.
11. Raymond J.A. Responses of marine fishes to freezing temperatures: a new look at colligative mechanisms. In Bittar E.E., Willis J.S. Editors. *Advances in Molecular and Cell Biology*, Vol. 19. Elsevier; 1997. p. 33–55.
12. Raymond J.A., DeVries A.L. Elevated concentrations and synthetic pathways of trimethylamine oxide and urea in some teleost fishes of McMurdo Sound, Antarctica. *Fish Physiol Biochem* 1998; 18: 387–398.
13. Rodrigues E., Feijo-Oliveira M., Gannabathula S.V. et al. A baseline studies on plasmatic constituents in the *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *INCT-APA Annual Activity Report* 2012; 1: 144–147.
14. Yancey P.H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* 2005; 208: 2819–2830.