

УДК 577.15:594.1(262.5)

**УСТОЙЧИВОСТЬ К НЕГАТИВНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ
И СООТНОШЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА
В ТКАНЯХ ЧЕРНОМОРСКИХ МОЛЛЮСКОВ
MYTILUS GALLOPROVINCIALIS LAMARCK, 1819
И *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906)**

© 2019 г. **И. В. Головина**

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Россия
E-mail: ivgolovina@mail.ru

Поступила в редакцию 11.02.2019; после доработки 16.07.2019;
принята к публикации 25.09.2019; опубликована онлайн 30.09.2019.

Определение соотношения активности ферментов энергетического обмена малатдегидрогеназы (МДГ, 1.1.1.37) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27) позволяет получить интегральную оценку физиологического состояния объекта исследования в ответ на воздействия разной природы. Цель работы — сравнить изменение величины отношения МДГ/ЛДГ в тканях двустворчатых моллюсков: аборигенной *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 и успешного вселенца *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906), в лабораторных условиях под влиянием гипоксии, аноксии, токсиканта полихлорбифенила, сероводородного заражения и длительного содержания в аквариуме без кормления. Половозрелые моллюски собраны в районе г. Севастополя. Длина раковины мидии составляла 45–62 мм, анадары — 27–49 мм. Активность ферментов измеряли спектрофотометрически (при 340 нм и 25 °С) по скорости окисления НАДН в цитоплазме тканей (мышцы, гепатопанкреас, жабры). Как правило, под воздействием негативных факторов активность ЛДГ снижалась значительно (на 36–80 %), активность МДГ оставалась стабильной, а коэффициент МДГ/ЛДГ в тканях обоих видов моллюсков увеличивался в 1,5–4 раза. Отмечено, что у гемоглобинсодержащей анадары коэффициент МДГ/ЛДГ был на порядок ниже, чем у мидии, как в контроле, так и в опыте. Сопоставление с литературными данными показало, что величина отношения МДГ/ЛДГ устойчивой к гипоксии анадары такая же низкая, как у оксифильных гидробионтов, в частности гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) и ракообразных *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758) и *Carcinus aestuarii* Nardo, 1847. По-видимому, низкое значение коэффициента МДГ/ЛДГ отражает способность анадары сохранять высокий уровень окислительных процессов в тканях благодаря значительному пулу соединений (эритроцитарный гемоглобин, каротиноиды, глутатион), поддерживающих аэробный процесс и осуществляющих антиоксидантную защиту. Величина коэффициента МДГ/ЛДГ может быть использована для оценки степени оксигенации тканей моллюсков в норме и в условиях гипоксии различного происхождения при мониторинговых исследованиях.

Ключевые слова: малатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, биомаркеры, гипоксия, моллюски, вселенцы, Чёрное море, *Mytilus galloprovincialis*, *Anadara kagoshimensis*

Глобальные климатические трансформации и загрязнение большинства водоёмов, вовлечённых в хозяйственную деятельность человека, изменяют среду обитания и влияют на выживание, размножение и развитие морских организмов. Получить интегральную оценку физиологического состояния объекта исследования в ответ на воздействия разной природы, спрогнозировать изменения в структуре распределения видов, выявить возможные причины их вымирания или успешной

натурализации позволяет применение неспецифических биомаркеров [4, 9, 16, 18, 21, 26, 28]. Двустворчатые моллюски устойчивы к различным экологическим факторам, и их традиционно используют для биомониторинга водной среды. Активность ферментов энергетического обмена — малатдегидрогеназы (МДГ, 1.1.1.37) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27) — является одним из основных показателей интенсивности и направленности обмена веществ у моллюсков при изменении кислородного режима, температуры, солёности морской воды, при воздействии поллютантов и внедрении паразитов [3, 4, 21, 28]. Соотношение активности ферментов используют для расчёта диагностических коэффициентов: МДГ/ЛДГ, коэффициента де Ритиса, фумаратредуктазы/сукцинатдегидрогеназы, ЛДГ/цитратсинтетазы, пентозного коэффициента и др. [4, 5, 6, 24, 26, 29]. Цель настоящей работы — проанализировать изменение активности ЛДГ и МДГ при воздействии различного рода негативных факторов и сравнить величину коэффициента МДГ/ЛДГ в тканях черноморских моллюсков с разными эколого-физиологическими особенностями.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили взрослые особи двустворчатых моллюсков: аборигенной мидии *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Mytilidae) и вселенца *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) (Bivalvia: Arcidae), собранные в районе г. Севастополя в весенний, летний и осенний периоды.

Мидия. Гипоксию в течение одних суток создавали путём естественного поглощения мидиями кислорода из литровых респирометров. В них помещали по 5 экз. одноразмерных мидий (длина раковины — 58–65 мм). Исходная концентрация кислорода в респирометрах составляла $5,4 \text{ мл} \cdot \text{л}^{-1}$, концентрация по окончании опыта — 2–3 % от первоначальной. Контролем служили мидии, находившиеся в проточном аквариуме. Температура воды в экспериментальных сосудах, в которых содержали мидий обеих групп, была такой же, как в море, и составляла $+18^\circ\text{C}$ (октябрь).

Токсикологический эксперимент с ПХБ (стандартный препарат Aroclor 1254) продолжительностью 21 сутки проводили при температуре воды $+21 \dots +23^\circ\text{C}$ (июнь). Мидий (длина раковины — 45–55 мм) распределяли по 90 экз. в две ёмкости объёмом 35 л каждая с постоянно аэрируемой морской водой. Подкормку обеих групп осуществляли капельным способом культурой микроводоросли *Isochrysis galbana* Parke, 1949. Ежедневно обновляли 5 % объёма воды с целью удаления продуктов обмена. Концентрацию токсиканта в воде опытной группы поддерживали на уровне $110 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$; контрольную группу моллюсков содержали без его добавления; фоновая концентрация ПХБ в воде составляла $20,6 \text{ нг} \cdot \text{л}^{-1}$.

Анадара. Опыты в условиях аутогенной гипоксии (7 и 10 суток) проводили при температуре морской воды $+18^\circ\text{C}$ (май). В респирометры помещали по 10 экз. анадары (длина раковины — 27–32 мм). Насыщение воды кислородом в контрольной группе составляло 95–97 %, в опытной группе оно снижалось до 4–8 %.

Для создания аноксии в камеру объёмом 13,5 л помещали 30 экз. анадары (длина раковины — 30–33 мм). Содержание кислорода в воде снижали в течение трёх часов с $8,5\text{--}8,7 \text{ до } 0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ прокачиванием азота [27]. Экспозиция продолжалась трое суток при температуре воды $+20^\circ\text{C}$ (октябрь). Контрольную группу моллюсков содержали при концентрации кислорода в воде $8,5\text{--}8,7 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (95–97 % насыщения). Ежедневно в опыте и контроле производили полную смену воды в ёмкостях для удаления метаболитов [1].

Воздействие гипоксии в сочетании с сероводородным заражением исследовали при температуре воды $+20^\circ\text{C}$ (октябрь) в камере объёмом 4,5 л, в которую поместили пять особей анадары (длина раковины — 43–49 мм). Содержание кислорода в воде снижали в течение 40 мин. с $8,5\text{--}8,7 \text{ до } 0,05 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ прокачиванием азота [27]. В работе применяли оксиметр DO Meter ST300D RU (США). Затем в камеру вносили маточный раствор Na_2S до финальной концентрации 4–8 $\text{мг} \text{ S}^{2-} \cdot \text{л}^{-1}$. Контроль за содержанием HS^{2-} в воде проводили с применением сульфидселективного сенсора

MSBS (Нидерланды). Компенсацию роста значений pH при растворении Na_2S в морской воде осуществляли внесением в камеру 1,0 н раствора HCl. Регистрацию значений pH осуществляли на pH-метре InoLab pH 720 (Германия). Экспозиция продолжалась 24 ч. Контрольную группу моллюсков содержали при концентрации кислорода в воде $8,5\text{--}8,7 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ (95–97 % насыщения).

Длительное содержание анадара (длина раковины — 27–32 мм) в лабораторных условиях без кормления в непроточном аквариуме (20 л) с аэрацией проводили в течение 16 суток (10 экз.) и 64 суток (12 экз.) при температуре морской воды $+20\text{...}+25 \text{ }^\circ\text{C}$ (май — июль) и концентрации кислорода в ней $6,9\text{--}7,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$. Для удаления метаболитов ежедневно производили полную замену морской воды в аквариуме.

Гибели особей мидии и анадара в ходе перечисленных экспериментов не происходило. Жизнеспособность моллюсков оценивали по рефлекторному закрытию створок в ответ на прикосновение к ноге и мантии. Контрольные и опытные группы моллюсков содержали в морской воде с солёностью 17–18 ‰.

Препарирование тканей, гомогенизацию и центрифугирование проводили при температуре $(0 \pm 4) \text{ }^\circ\text{C}$. Активность МДГ и ЛДГ измеряли спектрофотометрически при длине волны 340 нм и стандартной температуре инкубации $+25 \text{ }^\circ\text{C}$ в цитоплазме ткани ноги, мускула-замыкателя (аддуктора), жабр, гепатопанкреаса и гонад, используя в качестве среды выделения 0,2 М Трис-HCl буфер, pH 7,5 [8]. Определение активности ферментов проводили по скорости окисления восстановленной формы кофермента НАДН₂. В качестве субстрата для определения ЛДГ использовали пируват, для МДГ — оксалоацетат. Удельную активность ферментов выражали в мкмольх НАДН₂ за 1 мин. на 1 мг белка супернатанта. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента; результаты представлены как $(x \pm Sx)$; различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мидия. Установлено, что после аутогенной гипоксии в течение одних суток активность МДГ уменьшилась только в тканях ноги моллюска (на 34 %, $p < 0,05$), в то время как активность ЛДГ понизилась в трёх тканях: ноги, аддуктора и гепатопанкреаса (на 40–50 %, $p < 0,05$) (рис. 1А, В). В тканях жабр и гонад активность исследованных ферментов и соотношение её величин после краткосрочной гипоксии не изменились. В результате отношение МДГ/ЛДГ достоверно увеличилось в тканях мышцы-аддуктора, ноги и гепатопанкреаса в 1,5–2 раза (рис. 1С).

Содержание мидий в течение 21 суток в морской воде с ПХБ привело к возрастанию активности МДГ в тканях жабр на 78 % ($p < 0,05$) и к уменьшению активности ЛДГ в тканях ноги на 65 % ($p < 0,05$). Значения коэффициента МДГ/ЛДГ увеличились в 2,2 и 2,6 раза соответственно ($p < 0,05$) (рис. 1). В тканях аддуктора и гепатопанкреаса подобные реакции отсутствовали.

Анадара. Семидневная аутогенная гипоксия была предварительным экспериментом, по окончании которого у моллюска отпрепарирована только ткань ноги. Активность МДГ в ней не изменилась по сравнению с таковой контроля; активность ЛДГ уменьшилась на 55 % ($p < 0,05$); коэффициент МДГ/ЛДГ увеличился в 2,2 раза ($p < 0,05$) (рис. 2).

После десятидневной аутогенной гипоксии активность МДГ в тканях ноги и аддуктора оставалась стабильной; в жабрах — уменьшилась на 52 % ($p < 0,05$); в гепатопанкреасе снизилась несущественно (рис. 2А). Напротив, активность ЛДГ в большинстве тканей уменьшилась значительно: в ноге — на 80 %, в аддукторе и жабрах — на 57–59 %. Тенденция к снижению активности фермента установлена и для гепатопанкреаса (рис. 2В). В результате отношение активности МДГ/ЛДГ достоверно увеличилось в тканях ноги и аддуктора в 3,9 и 2,8 раза соответственно ($p < 0,05$) (рис. 2С).

Трёхдневная аноксия не повлияла на активность МДГ в тканях ноги, жабр и гепатопанкреаса, в то время как активность ЛДГ в них уменьшилась на 73–79 % ($p < 0,05$), что привело к росту коэффициента МДГ/ЛДГ в исследованных тканях в 2,7–3,9 раза ($p < 0,05$) (рис. 2С).

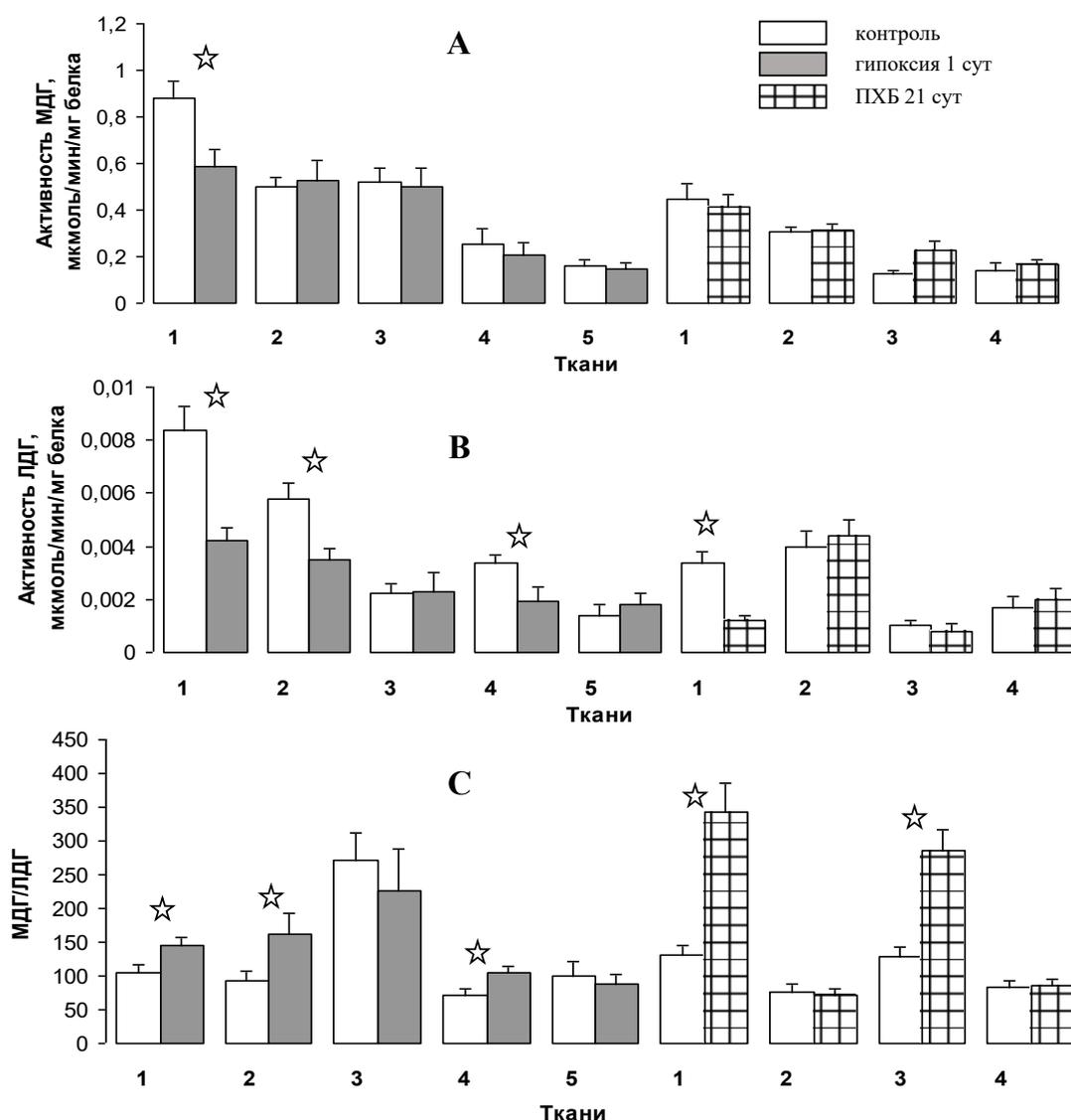


Рис. 1. Влияние гипоксии и ПХБ на активность МДГ (А) и ЛДГ (В), индекс МДГ/ЛДГ (С) в тканях *Mytilus galloprovincialis*: 1 — нога; 2 — аддуктор; 3 — жабры; 4 — гепатопанкреас; 5 — гонады. Звёздочками отмечены достоверные изменения по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Fig. 1. Effect of hypoxia and PCB on the activity of MDH (A) and of LDH (B), MDH/LDH ratio (C) in the tissues of *Mytilus galloprovincialis*: 1 – foot; 2 – adductor; 3 – gills; 4 – hepatopancreas; 5 – gonads. The asterisks indicate a significant difference compared with the control ($p < 0.05$)

Сочетанное суточное воздействие гипоксии и сероводорода практически не изменило активность МДГ (рис. 2А), однако активность ЛДГ в тканях ноги и гепатопанкреаса достоверно уменьшилась на 50 и 64 %, а коэффициент МДГ/ЛДГ в этих тканях вырос в 2,1 и 3,4 раза ($p < 0,05$) соответственно. Обычно ярко-красные ткани анадары, омываемые кровью, которая содержит эритроцитарный гемоглобин, почернели.

После длительного содержания без кормления в непроточном аквариуме с аэрацией у анадары была извлечена только мышечная ткань. В ткани ноги анадары, подвергнутой экспозиции в течение 16 суток, активность МДГ увеличилась незначительно — на 17 % ($p > 0,05$), при этом активность ЛДГ достоверно уменьшилась на 68 % ($p < 0,05$), а коэффициент МДГ/ЛДГ вырос вдвое (рис. 2). Продление экспозиции до 65 суток привело к аналогичным результатам, хотя диапазон величин уменьшился: отмечены несущественный (на 14 %) рост активности МДГ ($p > 0,05$), достоверное понижение активности ЛДГ на 36 % ($p < 0,05$), увеличение коэффициента МДГ/ЛДГ в 1,5 раза.

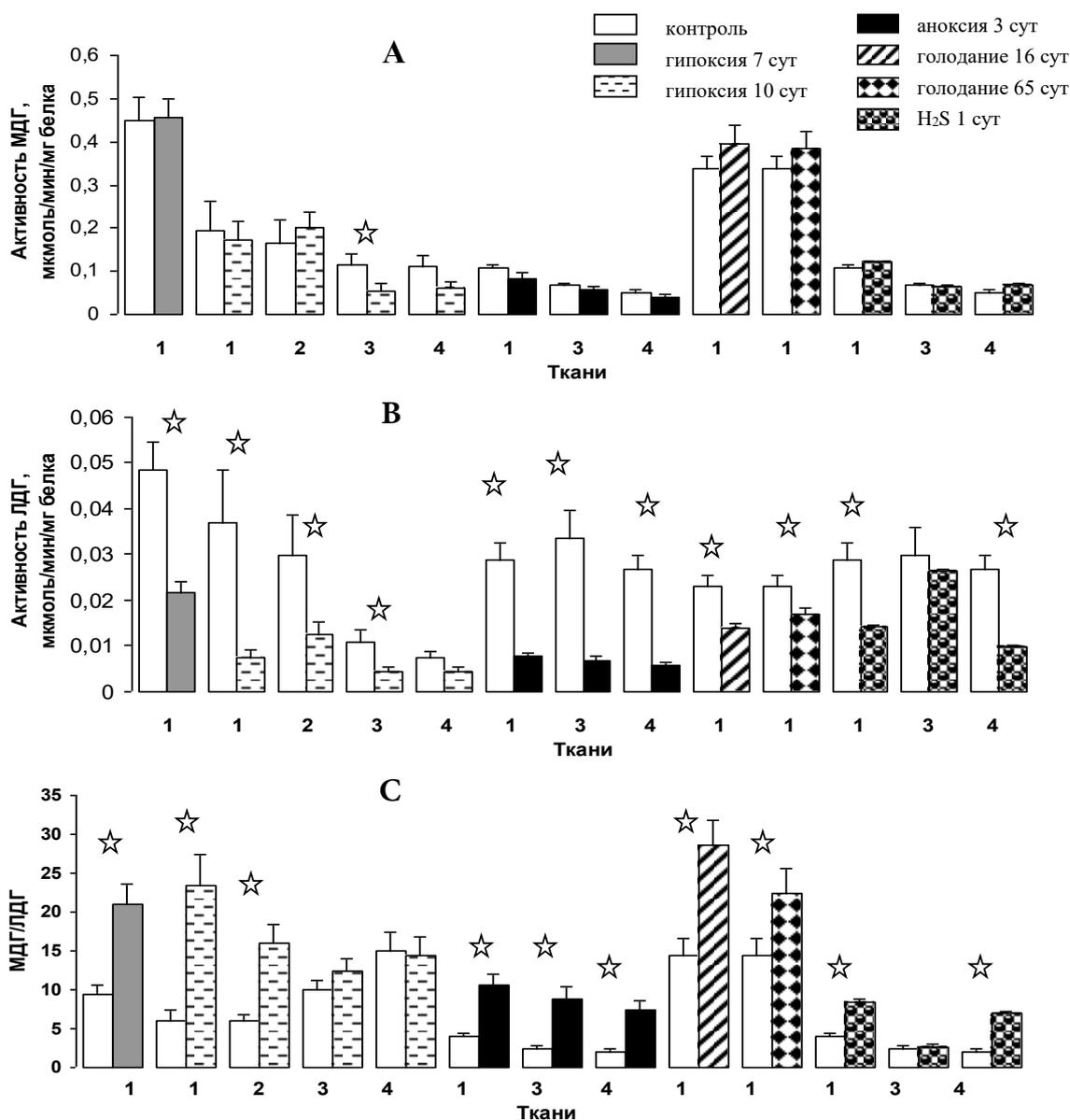


Рис. 2. Влияние гипоксии, аноксии, голодания и сероводородного заражения в сочетании с гипоксией на активность МДГ (А) и ЛДГ (В), индекс МДГ/ЛДГ (С) в тканях *Anadara kagoshimensis*: 1 — нога; 2 — аддуктор; 3 — жабры; 4 — гепатопанкреас. Звёздочками отмечены достоверные изменения по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Fig. 2. Effect of hypoxia, anoxia, starvation and hydrogen sulphide contamination in combination with hypoxia on the activity of MDH (A) and LDH (B), MDH/LDH ratio (C) in the tissues of *Anadara kagoshimensis*: 1 – food; 2 – adductor; 3 – gills; 4 – hepatopancreas. The asterisks indicate a significant difference compared with the control ($p < 0.05$)

ОБСУЖДЕНИЕ

Стратегия выживания гидробионтов в условиях депрессии метаболизма включает в себя снижение активности ЛДГ, заключительного фермента гликолиза, и усиление роли МДГ, что позволяет избегать чрезмерного накопления лактата в тканях, сохранять равновесие окислительно-восстановительного потенциала, эффективно использовать энергетические субстраты, переключаясь на альтернативные метаболические пути [4, 21, 23]. Цитоплазматическая МДГ сопряжена с гликолитическими процессами через фосфоенолпируваткарбоксикиназу, трансформирующую фосфоенолпируват в оксалоацетат. МДГ восстанавливает оксалоацетат до малата, который посредством малат-сукцинатного переносчика направляется в митохондрии и в обратном участке цикла

Кребса при помощи митохондриальной МДГ превращается в сукцинат с образованием АТФ. Цитоплазматическая МДГ двустворчатых моллюсков, в отличие от высших животных, гораздо более активна, чем митохондриальная, 70 % активности МДГ сосредоточено в цитоплазме [4]. Конкурирующие за цитоплазматический НАДН дегидрогеназы являются важной экспериментальной системой для исследователей; структура и конформационная подвижность ЛДГ и МДГ хорошо изучены [28].

В условиях опыта под влиянием гипоксии различного происхождения отмечены тканевые особенности изменения индекса МДГ/ЛДГ: в ноге мидии и анадары он всегда достоверно увеличивался, в аддукторе, жабрах и гепатопанкреасе он повышался реже (рис. 1С и 2С). В преобладающем большинстве случаев рост индекса был обусловлен снижением активности ЛДГ. Продолжительность гипоксии оказывала влияние на величину индекса МДГ/ЛДГ следующим образом: суточная гипоксия приводила к росту индекса МДГ/ЛДГ в 1,5 раза, а десятидневная гипоксия, как и аноксия, увеличивала его величину в 3,9 раза.

Наряду с гипоксией одним из самых значительных стрессов для организма является пищевой голодание, как и гипоксия различной степени, ведёт к истощению основной формы запаса углеводов у моллюсков — гликогена — и к ослаблению общего физиологического состояния [4]. Содержание анадары в аквариуме без кормления сопровождалось достоверным снижением активности ЛДГ и увеличением активности МДГ. Отклик на депрессию метаболизма выражался в двукратном увеличении индекса МДГ/ЛДГ в мышечной ткани анадары после 16 суток содержания моллюсков без кормления, а продление экспозиции до 65 суток приводило к постепенному истощению энергетических резервов и к уменьшению роста этого индекса (рис. 2).

Хронический эксперимент с ПХБ вызвал рост величины индекса МДГ/ЛДГ в тканях жабр и ноги мидии в 2,2 и 2,6 раза соответственно ($p < 0,05$) (рис. 1). По-видимому, в этих тканях произошло развитие гипоксии гистотоксического типа, поскольку воздействие токсичного Aroclor 1254 ингибирует митохондриальные дыхательные комплексы и вызывает избыточное продуцирование свободных радикалов [13]. Именно в тканях жабр и ноги мидии в данном эксперименте установлены статистически значимые отличия в динамике аккумуляции Aroclor 1254, содержание которого повысилось на 57 и 160 % ($p < 0,05$) соответственно [2]. Стойкие органические загрязнители с низкой растворимостью в воде, такие как ПХБ, сорбируются на поверхности тканей моллюсков, затрудняя газообмен. Под воздействием ПХБ и других нефтеуглеводородов исследователи отмечают наряду с низкой активностью ЛДГ повышение концентрации в тканях рыб и моллюсков сукцината и аланина, что свидетельствует о сопряжении реакций гликолиза с белковым обменом при дефиците кислорода [4, 30]. На этот же процесс указывает возрастание активности аминотрансфераз в тканях ноги и жабр анадары при аноксии, вследствие чего реализуются сукцинаттиокиназная и фумаратредуктазная реакции и пополняется ресурс макроэргов в анаэробных условиях без накопления токсичных метаболитов в тканях [1].

После суточной экспозиции анадары в условиях гипоксии в сочетании с сероводородным заражением в тканях ноги и гепатопанкреаса моллюска установлено значительное снижение активности ЛДГ, тенденция к увеличению активности МДГ и рост индекса МДГ/ЛДГ в 2,1–3,4 раза ($p < 0,05$), что является, очевидно, адаптивной реакцией в ответ на подавление тканевого дыхания (рис. 2). Сероводород, взаимодействуя с ионами железа гемоглобина анадары, образует сульфид железа чёрного цвета, кровь теряет способность транспортировать кислород, блокируется работа цитохромов и ферментов (цитохромоксидазы, сукцинатдегидрогеназы и др.). Кроме того, изменяются морфометрические характеристики эритроцитов анадары, в гемолимфу моллюска поступают содержащие гематин гранулярные включения, которые могут вступать в реакцию с H_2S с образованием Fe_2S_3 , нейтрализуя токсический эффект сероводорода [27]. Нарушение окислительного фосфорилирования в клетке под воздействием сероводорода и влияние сульфидов на биологические системы были предметом многочисленных исследований, тем не менее о точной роли H_2S в гомеостазе известно относительно мало [19, 20, 22, 25]. Грань между физиологическими и токсическими

эффектами влияния H_2S тонкая: отмечены как стимулирующее действие на потребление кислорода при низких сульфидных концентрациях, так и ингибирующий эффект при высоких концентрациях. Толерантность к растворённому сероводороду у морских беспозвоночных коррелирует со степенью аноксических условий, которые встречаются в естественной среде обитания вида.

Сульфид водорода является не только мощным токсином аэробного дыхания, но и сигнальной молекулой и субстратом для производства АТФ [20]. Установлено, что сероводород фактически синтезируется тканями сульфидтолерантных моллюсков и служит источником энергии в электронно-транспортной цепи митохондрий. H_2S наряду с NO стимулирует биение жаберных ресничек. H_2S представляет собой сезонный эндогенный модулятор сокращения жаберных мышц [17]. Возможно, наличием данных функций объясняется бóльшая устойчивость жабр анадары по сравнению с мышцами и гепатопанкреасом к экспериментальному воздействию сероводорода. Многие двустворчатые моллюски, которые обитают в мягких грунтах, содержат в своих жабрах симбиотические бактерии, метаболизирующие H_2S , и эти моллюски используют ряд биохимических, поведенческих и анатомических приспособлений для поддержания своих симбионтов [17]. Например, *Lucina pectinata* sp., защищаясь от токсичности H_2S , применяет гемоглобин для связывания и транспортировки сульфидов к симбиотическим бактериям [22]. Растворённый сероводород является составной частью почти всех морских осадочных грунтов, которые *Anadara kagoshimensis* успешно колонизирует в Азово-Черноморском бассейне. Некоторые участки обитания дальневосточной *Anadara broughtoni* (Schrenck, 1867), также имеющей эритроцитарный гемоглобин, совпадают с зонами сероводородного загрязнения [10].

При определении активности ферментов, как и других биохимических показателей, необходимо учитывать сезонную динамику состояния гидробионтов, чтобы избежать ложных заключений при мониторинге. В связи с этим в зимний период покоя коэффициент МДГ/ЛДГ не рассчитывали: по нашим и литературным данным, активность ЛДГ у теплолюбивых черноморских рыб и моллюсков является в это время низкой [4, 16]. Падение осенью температуры воды в море с +18 до +6 °С приводит к снижению активности ЛДГ в тканях мидий до следовой, а также к уменьшению скорости дыхания и фильтрации [11, 15]. В то же время понижение температуры существенно не влияет на активность цитоплазматической МДГ, возмещающей низкую активность ЛДГ у моллюсков, и сопровождается значительным ростом активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, фермента пентозофосфатного пути (ПФП). На протяжении годового цикла у черноморских рыб и моллюсков изменяется скорость гликолиза и ПФП, альтернативных систем реакций обмена углеводов, конкурирующих за общий субстрат (глюкозо-6-фосфат) и продуцирующих общие метаболиты: фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат [4, 16].

Своеобразные устойчивые состояния, через которые в течение года проходит анадара, также свидетельствует о циклическом изменении интенсивности метаболизма. Наблюдения за анадарой в естественных условиях обитания показали, что в конце осени, при охлаждении придонного слоя до критически низкой температуры (+2...+4 °С), анадара впадает в зимнюю спячку [10]. С начала декабря по март моллюски смыкают створки и не проявляют каких-либо признаков фильтрационной или двигательной активности, постепенно погружаясь в толщу ила. Весной, в преднерестовый период, когда придонный слой прогревается до +7...+16 °С, особи анадары выбираются на поверхность грунта и возобновляют фильтрационную активность. Нерест происходит летом (+17...+24 °С), посленерестовый период начинается в августе-сентябре и заканчивается при температуре +4 °С. В аквариальных условиях исследователи выявили ту же сезонную динамику, тот же эндогенный ритм в поведении анадары, несмотря на то, что в течение всего года в аквариуме поддерживали постоянную температуру +15...+17 °С.

Существует связь между устойчивостью моллюсков и ракообразных к гипоксии и индексом МДГ/ЛДГ: величина его выше у организмов, проявляющих бóльшую выносливость к недостатку кислорода [4, 14, 21, 28]. В рамках этой стратегии индекс МДГ/ЛДГ в тканях анадары увеличивается

при негативных воздействиях, что показали наши эксперименты. Изменения, происходящие в мышечной ткани моллюсков, наиболее значительны, поскольку интенсивность гликолиза в ней самая высокая. Примечательным является тот факт, что абсолютная величина коэффициента устойчивой к гипоксии *Anadara kagoshimensis* такая же низкая, как у оксифильных гидробионтов — гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) и ракообразных (рис. 3).

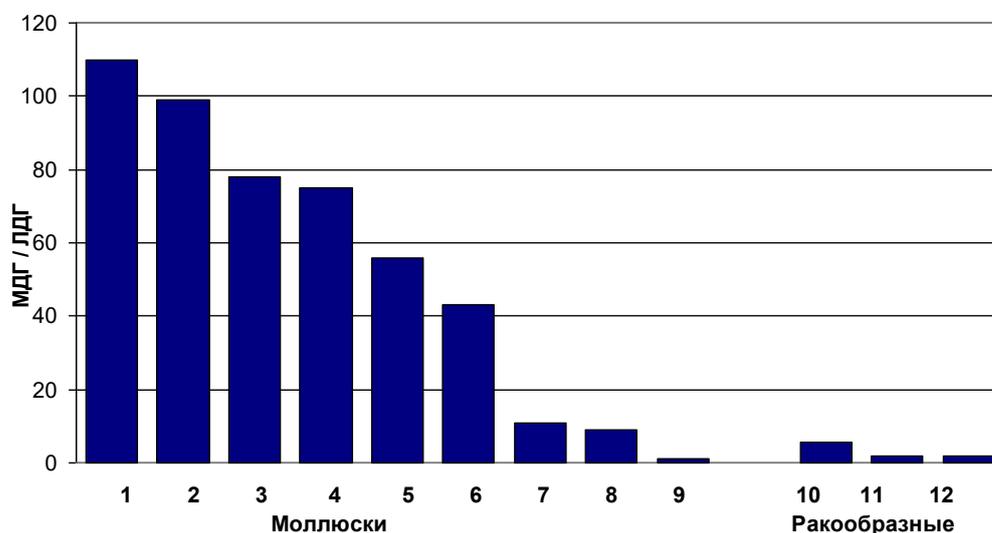


Рис. 3. Величина коэффициента МДГ/ЛДГ в условиях нормоксии в мышечной ткани морских беспозвоночных по литературным [4] и собственным [3]* данным: 1 — *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758); 2* — *Mytilus galloprovincialis*; 3 — *Spisula sachalinensis* (Schrenck, 1862); 4 — *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853); 5 — *Mytilus galloprovincialis*; 6 — *Glycymeris yessoensis* (G. B. Sowerby III, 1889); 7 — *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857); 8* — *Anadara kagoshimensis*; 9* — *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846); 10 — *Amphibalanus improvisus* (Darwin, 1854); 11 — *Carcinus aestuarii* Nardo, 1847; 12 — *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758)

Fig. 3. MDH/LDH ratio in muscle tissue of marine invertebrates in normoxia conditions according to literature [4] and own [3]* data: 1 – *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758); 2* – *Mytilus galloprovincialis*; 3 – *Spisula sachalinensis* (Schrenck, 1862); 4 – *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853); 5 – *Mytilus galloprovincialis*; 6 – *Glycymeris yessoensis* (G. B. Sowerby III, 1889); 7 – *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857); 8* – *Anadara kagoshimensis*; 9* – *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846); 10 – *Amphibalanus improvisus* (Darwin, 1854); 11 – *Carcinus aestuarii* Nardo, 1847; 12 – *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758)

Изменение отношения МДГ/ЛДГ в сторону уменьшения у подвижных гидробионтов связано с увеличением активности ЛДГ в их тканях [4]. Анадара имеет массивную ногу и может быстро передвигаться, активность ЛДГ в её тканях в 2–6 раз больше, чем у мидии [3]. Более низкий индекс МДГ/ЛДГ по сравнению с мидией сохраняется и при гипоксии, что отражает, по видимому, способность анадары поддерживать необходимый уровень окислительных процессов в тканях благодаря значительному пулу соединений, обеспечивающих аэробный процесс и осуществляющих антиоксидантную защиту. Моллюск-вселенец имеет гемоглобинсодержащие эритроциты, содержание каротиноидов в жабрах и ноге больше в 2–6 раз, глутатиона — в 3–4 раза, уровень ПОЛ в тканях вдвое ниже, чем у аборигенной мидии [12]. Многие другие биохимические, физиологические и морфологические характеристики также указывают на готовность анадары к анаэробному метаболизму [18]. *Anadara kagoshimensis* принадлежит к видам, достигшим значительной «степени свободы и независимости от условий своего существования и колебаний внешней среды» [7].

Заключение. Проведённое исследование показало, что под влиянием негативных факторов разной природы в тканях двустворчатых моллюсков *Mytilus galloprovincialis* и *Anadara kagoshimensis* происходили адаптивные перестройки активности ЛДГ и МДГ — ферментов энергетического обмена, конкурирующих за цитоплазматический НАДН. Как правило, активность ЛДГ значительно

снижалась (на 36–80 %), активность МДГ оставалась стабильной, а коэффициент МДГ/ЛДГ в тканях обоих видов моллюсков увеличивался в 1,5–4 раза. Наибольшие изменения происходили в мышечной ткани, для данных ферментов она может быть рекомендована как индикаторная. Величина индекса МДГ/ЛДГ у анадары в условиях нормы и депрессии метаболизма была меньше по сравнению с мидией, что обусловлено наличием у вселенца ряда механизмов энергообеспечения клеток при гипоксии (эритроцитарный гемоглобин, высокий уровень активности ферментов энергетического обмена и содержания низкомолекулярных оксидантов и др.). Полученные изменения активности исследованных оксидоредуктаз отражают значительные различия в энергетическом обмене мидии и анадары, а также особенности компенсаторного ответа организма моллюсков на воздействие гипоксии, аноксии, голодания, ПХБ и сероводородной интоксикации. Коэффициент МДГ/ЛДГ может быть использован в мониторинге и марикультуре для оценки физиологического состояния моллюсков при различных условиях обитания.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом» (№ гос. регистрации АААА-А18-118021490093-4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Андреев Т. И., Солдатов А. А., Головина И. В. Адаптивная реорганизация метаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequivalvis* Bruguiere в условиях экспериментальной аноксии // *Доповіді НАН України*. 2009. № 7. С. 155–160. [Andreenko T. I., Soldatov A. A., Golovina I. V. Adaptivnaya reorganizatsiya metabolizma u dvustvorchatogo mollyuska *Anadara inaequivalvis* Bruguiere v usloviyakh eksperimental'noi anoksii. *Dopovidi NAN Ukrainy*, 2009, no. 7, pp. 155–160. (in Russ.)]
2. Бочко О. Ю., Солдатов А. А. Распределение полихлорированных бифенилов в тканях мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. в естественных и экспериментальных условиях // *Экология моря*. 2006. Вып. 71. С. 68–72. [Bochko O. Yu., Soldatov A. A. Polychlorinated biphenyls distribution in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. from natural population and under experimental conditions. *Ekologiya morya*, 2006, iss. 71, pp. 68–72. (in Russ.)]
3. Головина И. В. Особенности активности ферментов энергетического обмена в тканях черноморских моллюсков разной подвижности в норме и при патологии // *Морской биологический журнал*. 2016. Т. 1, № 1. С. 14–23. [Golovina I. V. Peculiarities of energy metabolism enzymes activity in tissues of Black Sea molluscs of different mobility in norm and at pathology. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2016, vol. 1, no. 1, pp. 14–23. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2016.01.1.02>
4. Горомосова С. А., Шапиро А. З. *Основные черты биохимии энергетического обмена у мидий*. Москва : Лёгкая и пищевая промышленность, 1984. 120 с. [Goromosova S. A., Shapiro A. Z. *Osnovnye cherty biokhimii energeticheskogo obmena u midii*. Moscow: Legkaya i pishchevaya promyshlennost', 1984, 120 p. (in Russ.)]
5. Ильин В. С., Замосковская Г. А., Усатенко М. С. Влияние денервации и реиннервации на лактатдегидрогеназу и малатдегидрогеназы в скелетных мышцах кролика // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 1974. Т. 10, № 1. С. 10–16. [Il'in V. S., Zamoskovskaya G. A., Usatenko M. S. The effect of denervation and reinnervation on lactate and malate dehydrogenases in rabbit skeletal muscles. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii*, 1974, vol. 10, no. 1, pp. 10–16. (in Russ.)]
6. Кудрявцева Г. В., Шишкин В. И. *Надёжность и качество ферментативных функциональных систем*. Санкт-Петербург : Изд-во СПб ун-та, 1996. 68 с. [Kudryavtseva G. V., Shishkin V. I. *Nadezhnost' i kachestvo fermentativnykh funktsional'nykh sistem*. Saint Petersburg: Izd-vo SPb un-ta, 1996, 68 p. (in Russ.)]
7. Кулаев Б. С. Эволюция систем поддержания гомеостаза клетки – основа прогрессивной эволюции клетки // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 1997. Т. 33, № 1. С. 82–99. [Kulaev B. S. Evolution of cell homeostasis supporting systems as the basis of progressive evolution

- of organisms. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii*, 1997, vol. 33, no. 1, pp. 82–99. (in Russ.)]
8. Мильман Л. С., Юровецкий Ю. Г., Ермолаева Л. П. Определение активности важнейших ферментов углеводного обмена // *Методы биологии развития*. Москва : Наука, 1974. С. 346–364. [Mil'man L. S., Yurovetskii Yu. G., Ermolaeva L. P. Opredelenie aktivnosti vazhneishikh fermentov uglevodnogo obmena. In: *Metody biologii razvitiya*. Moscow: Nauka, 1974, pp. 346–364. (in Russ.)]
 9. Немова Н. Н., Мещерякова О. В., Лысенко Л. А., Фокина Н. Н. Оценка состояния водных организмов по биохимическому статусу // *Труды КарНЦ РАН*. 2014. № 5. С. 18–29. [Nemova N. N., Meshcheryakova O. V., Lysenko L. A., Fokina N. N. The assessment of the fitness of aquatic organisms relying on the biochemical status. *Trudy KarNTs RAN*, 2014, no. 5, pp. 18–29. (in Russ.)]
 10. Олифиренко А. Б. Условия формирования поселений двустворчатого моллюска *Anadara broughtoni* в заливе Петра Великого (Японское море) // *Известия ТИНРО*. 2007. Т. 149. С. 122–137. [Olifirenko A. B. Usloviya formirovaniya poselenii dvustvorchatogo mollyuska *Anadara broughtoni* v zalive Petra Velikogo (Yaponskoe more). *Izvestiya TINRO*, 2007, vol. 149, pp. 122–137. (in Russ.)]
 11. Финенко Г. А., Аболмасова Г. И. Особенности энергетического бюджета мидий в Севастопольской бухте // *Биология моря*. 1992. Т. 18, № 1–2. С. 43–51. [Finenko G. A., Abolmasova G. I. Osobennosti energeticheskogo byudzheta midii v Sevastopol'skoi bukhte. *Biologiya morya*, 1992, vol. 18, no. 1–2, pp. 43–51. (in Russ.)]
 12. *Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии* / под ред. Г. Е. Шульмана, А. А. Солдатова ; Ин-т биологии южных морей НАН Украины. Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2014. 323 с. [*Black Sea mollusks: Elements of comparative and environmental biochemistry*. G. E. Shul'man, A. A. Soldatov (Eds) ; In-t biologii yuzhnykh morei NAN Ukrainy. Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika, 2014, 323 p. (in Russ.)]
 13. Aly H. A. A., Domènech Ò. Aroclor 1254 induced cytotoxicity and mitochondrial dysfunction in isolated rat hepatocytes. *Toxicology*, 2009, vol. 262, iss. 3, pp. 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.05.018>
 14. Bishop R. E., Kakuk B., Torres J. J. Life in the hypoxic and anoxic zones: Metabolism and proximate composition of Caribbean troglobitic crustaceans with observations on the water chemistry of two anchialine caves. *Journal of Crustacean Biology*, 2004, vol. 24, iss. 3, pp. 379–392. <https://doi.org/10.1651/C-2459>
 15. Emeretli I. V. Influence of hypoxia of varying duration on malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities in the tissues of mussel. *Hydrobiological Journal*, 2002, vol. 38, iss. 3, pp. 50–56. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v38.i3.50>
 16. Emeretli I. V., Rusinova O. S. The activities of enzymes of the main pathways of carbohydrates oxidation in fish tissues. *Hydrobiological Journal*, 2002, vol. 38, iss. 2, pp. 70–79. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v38.i2.70>
 17. Gainey L. F. Jr., Greenberg M. J. Hydrogen sulfide is synthesized in the gills of the clam *Mercenaria mercenaria* and acts seasonally to modulate branchial muscle contraction. *The Biological Bulletin*, 2005, vol. 209, no. 1, pp. 11–20. <https://doi.org/10.2307/3593138>
 18. Golovina I. V., Gostyukhina O. L., Andreyenko T. I. Specific metabolic features in tissues of the ark clam *Anadara kagoshimensis* Tokunaga, 1906 (Bivalvia: Arcidae), a Black Sea invader. *Russian Journal of Biological Invasions*, 2016, vol. 7, iss. 2, pp. 137–145. <https://doi.org/10.1134/S2075111716020065>
 19. Grieshaber M. K., Völkel S. Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annual Review of Physiology*, 1998, vol. 60, pp. 33–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.33>
 20. Hildebrandt T. M., Grieshaber M. K. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *The FEBS Journal*, 2008, vol. 275, iss. 13, pp. 3352–3361. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06482.x>
 21. Hochachka P. W., Somero G. N. *Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution*. Oxford: Oxford University Press, 2002, 356 p.
 22. Kabil O., Motl N., Banerjee R. H₂S and its role in redox signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, vol. 1844, iss. 8, pp. 1355–1366. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.01.002>
 23. Larade K., Storey K. B. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. In: *Cell and Molecular Responses to Stress*. Vol. 3. *Sensing, Signaling and Cell Adaptation* / K. B. Storey, J. M. Storey (Eds). Amsterdam: Elsevier Science B. V., 2002, 346 p.

24. Lebedeva I. Yu., Leibova V. B., Ernst L. K. Activity of protein and carbohydrate metabolism enzymes in black pied heifer blood in relation to subsequent reproductive intensity. *Russian Agricultural Sciences*, 2012, vol. 38, iss. 3, pp. 247–250. <https://doi.org/10.3103/S1068367412030123>
25. Olson K. R. Mitochondrial adaptations to utilize hydrogen sulfide for energy and signaling. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, vol. 182, iss. 7, pp. 881–897. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0654-y>
26. Rinke C., Lee R. W. Pathways, activities and thermal stability of anaerobic and aerobic enzymes in thermophilic vent paralvinellid worms. *Marine Ecology Progress Series*, 2009, vol. 382, pp. 99–112. <https://doi.org/10.3354/meps07980>
27. Soldatov A. A., Kukhareva T. A., Andreeva A. Yu., Efremova E. S. Erythroid elements of hemolymph in *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) under conditions of the combined action of hypoxia and hydrogen sulfide contamination. *Russian Journal of Marine Biology*, 2018, vol. 44, iss. 6, pp. 452–456. <https://doi.org/10.1134/S1063074018060111>
28. Somero G. N. The physiology of climate change: How potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine ‘winners’ and ‘losers’. *Journal of Experimental Biology*, 2010, special iss. 213, pp. 912–920. <https://doi.org/10.1242/jeb.037473>
29. Washizu T., Nakamura M., Izawa N., Suzuki E., Tsuruno S., Washizu M., Nakajo S., Arai T. The activity ratio of the cytosolic MDH/LDH and the isoenzyme pattern of LDH in the peripheral leukocytes of dogs, cats and rabbits. *Veterinary Research Communications*, 2002, vol. 26, iss. 5, pp. 341–346.
30. Zwaan A., Eertman R. H. M. Anoxic or aerial survival of bivalves and other euryoxic invertebrates as a useful response to environmental stress – A comprehensive review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1996, vol. 113, iss. 2, pp. 299–312. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02101-9](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02101-9)

**RESISTANCE TO NEGATIVE EFFECTS
AND THE RATIO OF ENERGY METABOLISM ENZYME ACTIVITY
IN TISSUES OF THE BLACK SEA MOLLUSCS
MYTILUS GALLOPROVINCIALIS LAMARCK, 1819
AND *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906)**

I. V. Golovina

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: ivgolovina@mail.ru

Determining the ratio of energy metabolism enzyme activity of malate dehydrogenase (MDH, 1.1.1.37) and lactate dehydrogenase (LDH, 1.1.1.27) allows getting the cumulative assessment of the physiological condition of the object of study in response to the impact of different nature. The aim of the study was to compare the change of value of MDH/LDH ratio in the tissues of bivalve molluscs: native mussel *Mytilus galloprovincialis* and successful invader *Anadara kagoshimensis* – in laboratory conditions under the effect of hypoxia, anoxia, PCBs, hydrogen sulfide contamination and long-term maintenance in the aquarium without feeding. Sexually mature molluscs were collected near Sevastopol. Shell length of a mussel was 45–62 mm, of anadara – 27–49 mm. Enzyme activity was measured spectrophotometrically (at 340 nm and 25 °C) by the rate of NADH oxidation in the cytoplasm of tissues (muscles, hepatopancreas, gills). Under the effect of negative factors, as a rule, LDH activity decreased significantly (by 36–80 %), MDH activity remained stable, and MDH/LDH ratio in the tissues of both species of molluscs increased 1.5–4 times. However, in the tissues of hemoglobin-containing anadara the ratio was 10 times lower than that of mussels, both in control and in the experiment. Comparison with literature data showed that tolerant to hypoxia mollusc-invader had the same low MDH/LDH ratio as oxyphilic hydrobionts: scallop *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857), crustaceans *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758) and *Carcinus aestuarii* Nardo, 1847. Apparently, the low MDH/LDH ratio reflects the ability of anadara to maintain a high level of oxidizing processes in the tissues due to the content in them of a significant pool of erythrocyte hemoglobin, carotenoids, glutathione, which support the aerobic process and implement antioxidant protection. The ratio of the activity of MDH/LDH can be used in monitoring studies to assess the degree of oxygenation of molluscs tissues in normal and hypoxic conditions of different origin.

Keywords: malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, biomarkers, hypoxia, molluscs, invaders, Black Sea, *Mytilus galloprovincialis*, *Anadara kagoshimensis*