

EFFECT OF MEDIUM SALINITY ON BIOLUMINESCENCE OF COPEPODS

Summary

Electric current-induced bioluminescence of copepods *P. borealis* has been studied under experimental hypo- and hyperosmoticity. Variations in the medium salinity affect all the parameters of bioluminescent flares of copepods but they are true at 15-20% shifts of salt concentration from the control (35%) and at expositions over 6 hours. The luminous radiation period is maximum in fresh waters and minimum in the most salty waters. Energy characteristics of luminous radiation decrease in the hypo- and hyperosmotic medium; these changes considerably depend on the time of exposure under experimental conditions.

УДК 577.1:574.652

Н. М. БЕРЕГОВАЯ, [А. З. ШАПИРО] , Е. М. ХАЗАНОВА

РОЛЬ ГЕКСОКИНАЗЫ И ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В АДАПТАЦИЯХ ГИДРОБИОНТОВ-ОБРАСТАТЕЛЕЙ

На основании двухлетних наблюдений (1986—1987 гг.) дана характеристика изменений активности ключевых ферментов начального этапа гликолиза и пентозофосфатного пути (гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) у массовых видов макрообрастания: гидроидов, ботриллюсов, мшанок. Динамика ферментативной активности изучена в периоды активного роста и угасания физиологической активности популяций, а также в условиях нормы и гипоксии. Обсуждается возможность использования параметра Г-6-ФДГ/ГК (соотношение активностей изучаемых ферментов) при биоиндикации.

Исследование особенностей метаболических процессов, отражающих состояние организмов и популяций в различных условиях обитания, весьма актуально при решении экологических проблем. Особое место в изучении адаптаций занимает исследование энергетического обмена гидробионтов в экстремальных условиях: гипоксии, антропогенной нагрузки. Основным источником энергии для гидробионтов, ведущих прикрепленный образ жизни (изучаемые виды макрообрастания), является гликолитический процесс расщепления углеводов [4]. Установлено, что пентозофосфатный путь обмена углеводов (ПФП), являющийся уязвимым звеном метаболизма, играет определяющую роль в адаптациях организмов макрообрастания [5]. В настоящей работе была сделана попытка выявить некоторые закономерности в изменении уровня активности ферментов начального этапа гликолиза и ПФП у массовых видов ценоза макрообрастания на двух физиологически различных стадиях развития популяции, а также в условиях нормы и гипоксии.

Материал и методика. Объектом исследования служили массовые виды сообщества обрастания Черного моря: гидроид (Obelia laveni), колониальная асцидия (Bothryllus schlosseri), мшанка (Lepidalia pallasiata). Наблюдение проводили в течение двух лет: гидроидов изучали на протяжении всего цикла развития с марта по май, колонии ботриллюсов и мшанок — в период массового развития с августа по декабрь. В опытах использовали гидробионтов, выращенных на стеклянных пластинках размером 4×10 см в Севастопольской бухте. Физиологическое состояние (период активного роста и старение популяции) оценивали под бинокулярным микроскопом МБС-1 по наличию или отсутствию половых продуктов, характеру разрастания тканей, ряду морфологических признаков.

Условия гипоксии создавали при экспонировании животных в течение 24 ч в закрытых сосудах с морской водой. Концентрация гидробионтов составляла 300 г на 0,5 л воды, содержание кислорода —

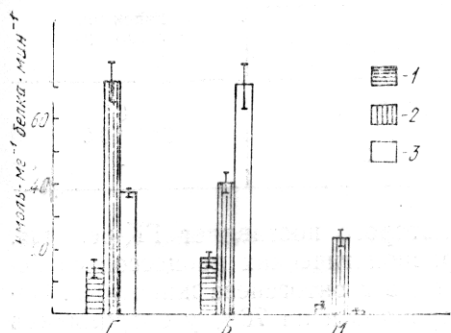


Рис. 1. Уровень активности гексокиназы у гидроида (Г), ботриллуса (Б) и мшанки (М) на двух стадиях развития и гипоксии:

1 — активный рост; 2 — старение; 3 — гипоксия

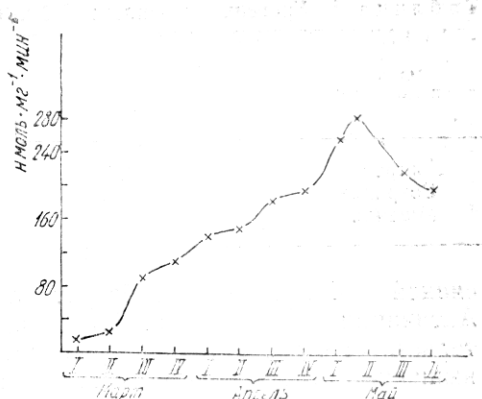


Рис. 2. Изменение активности Г-6-ФДГ у гидроидов на протяжении трехмесячного цикла развития (I—IV — недели каждого месяца)

0,4—0,5 мг/л. Контрольных животных помещали в сосуд с проточной морской водой. Ткани измельчали в гомогенизаторе при соотношении массы ткани и объема 0,2 молярного трис-НСI буфера 1:10. Гомогенаты центрифугировали при температуре от 0 до +2°C на рефрижераторной центрифуге ЦРЛ-1 при 15500 g в течение 15 мин для отделения цитоплазматической фракции, содержащей изучаемые ферменты. Исследовали активность гексокиназы (ГК) — первого фермента гликолиза, под действием которого происходит фосфорилирование гексоз, и активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы — общего фермента для гликолиза и ПФП (фермента, «запускающего» пентозофосфатный шунт). Активность ГК и Г-6-ФДГ определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм по стандартной методике (объем кюветы 3 мл, среднее содержание белка в пробе 100 мкг/мл) [6]. Активность ферментов выражали в наномолях субстрата (или продукта) реакции за 1 мин в расчете на 1 мг белка.

Результаты и обсуждение. 1. У гидроидов наблюдали значительные колебания активности гексокиназы: от 14,4 нмоль·мг⁻¹ белка·мин⁻¹ в период активного роста до 71,6 нмоль·мг⁻¹ белка·мин⁻¹ в период затухания физиологической активности (рис. 1). В условиях гипоксии отмечено более чем двукратное увеличение активности ГК по сравнению с контрольной группой животных. Для ботриллусов внешнее воздействие в большей степени, чем для гидроидов, сказывается на фосфорилировании гексоз. Процесс старения, напротив, стимулировал активность ГК в большей степени у гидроидов, чем у ботриллусов. Для представителей щупальцевых-мшанок характерны более низкие значения активности ГК: от 2,9 ед на стадии активного роста до 24 ед в период снижения метаболических процессов. В условиях гипоксии активность ГК у мшанок понизилась в 4,9 раза, в то время как у гидроидов и ботриллусов в аналогичных условиях произошло повышение активности ГК в 2,6 и 4,2 раза соответственно (см. рис. 1).

Сравнивая полученные данные с имеющимися в литературе, можно отметить, что значения активности ГК у гидроидов и ботриллусов (от 14,4 до 70 нмоль·мг⁻¹ белка·мин⁻¹) близки к таковым у мидий (от 17 до 40 нмоль·мг⁻¹ белка·мин⁻¹) [4]. Как показано ранее, активность ГК в мышцах низших позвоночных (4 нмоль·мг⁻¹ белка·мин⁻¹) значительно ниже, чем у исследуемых нами видов [3, 4]. Активность ГК у мшанок несколько ниже, чем у гидроидов и ботриллусов, однако выше, чем у подвижных гидробионтов. Наши данные согласуются с представлениями, что высокая активность ГК характерна для гликолиза прикрепленных беспозвоночных [2]. Это вызвано, по мнению авторов, интен-

Таблица 1. Уровень активности Г-6-ФДГ у массовых видов обрастания (n=14)

Объект исследования	Стадия развития		Гипоксия, активный рост
	Активный рост	Старение	
Гидроид	41,6±4,2	240,0±16,3	0
Ботриллюс	22,0±4,9	0	28,3±0,6
Мшанка	50,0±6,7	0	0

сивной работой ПФП, субстрат для которого поставляет ГК-реакция. Активация ГК на стадии затухания физиологических процессов свидетельствует о возрастающей роли углеводов в онтогенезе животных. Повышение активности ГК на 62% у гидроидов и на 76% у ботриллюсов при гипоксии, очевидно, свидетельствует об активном использовании этими животными глюкозы как энергетического субстрата во время анаэробнозиса. Возрастающая активность ГК на 30% обнаружено при гипоксии и у мидий [4]. В отличие от названных выше обрастателей, а у мшанок аноксия сопровождается уменьшением активности ГК почти в 5 раз. По-видимому, у этих животных имеются и другие механизмы адаптации к недостатку кислорода, помимо активации катаболизма глюкозы. В целом полученные нами данные подтверждают положение о высокой активности ГК у филогенетически древних видов [3].

Таким образом, у исследованных гидробионтов, ведущих прикрепленный образ жизни, активность ГК превышает таковую в тканях подвижных гидробионтов. Высокая активность ГК у массовых видов обрастания, вероятно, способствует эффективному включению глюкозы в энергетический обмен и обеспечивает ПФП его субстратом, глюкозо-6-фосфатом. Полученные нами данные позволяют заключить, что ткани гидроидов, мшанок, ботриллюсов характеризуются повышенной способностью утилизировать глюкозу.

2. У гидроидов средняя активность Г-6-ФДГ в процессе развития популяции возрастала с 41,66 до 240 нмоль·мг⁻¹ белка·мин⁻¹. После двадцатичасовой гипоксии активность фермента упала до нуля (табл. 1). У ботриллюсов средние значения активности Г-6-ФДГ были ниже, чем у гидроидов: 22 нмоль·мг⁻¹ на стадии активного роста и мало изменялись при гипоксии. При старении активность фермента не выявилась. В целом уровень активности Г-6-ФДГ у мшанок и гидроидов на ранних стадиях развития популяции характеризуется значительным сходством, причем, при гипоксии фермент полностью ингибируется. Однако у мшанок в отличие от гидроидов при старении популяции активность Г-6-ФДГ не обнаружена.

Активность Г-6-ФДГ у исследованных видов довольно высокая и колеблется в период интенсивного роста в пределах 22—50 нмоль·мг⁻¹ белка·мин⁻¹, сочетаясь с высокой активностью ГК. Данные о высокой активности Г-6-ФДГ имеются в литературе и для других беспозвоночных, в частности, у моллюсков она изменяется в тех же пределах [2, 4].

У представителя типа кишечнорастных — гидроида средняя активность фермента составила 41,7 ед на стадии активного роста, что близко к данным, приведенным в литературе для актиний [4]. Однако в процессе онтогенеза, с увеличением количества гонотек, фермент существенно активируется. В апреле, когда относительное содержание гонотек превышало 50%, среднее значение Г-6-ФДГ составило 200 нмоль·мг⁻¹ белка·мин⁻¹, а в мае, в период активного размножения, достигло максимума — 286 нмоль·мг⁻¹ белка·мин⁻¹. По мере старения колонии активность фермента несколько снижалась (рис. 2).

Полученные данные говорят о том, что у гидробионтов, как и у многих других беспозвоночных [2], ПФП принимает непосредственное участие в обмене углеводов, а высокая активность Г-6-ФДГ обеспечивает организм необходимым количеством восстановленного НАДФ,

Таблица 2. Уровень активности ферментов гликолиза и ПФП у представителей разных таксонов, нмоль·мг⁻¹ белка·мин⁻¹

Объект исследования	ГК	Г-6-ФДГ	Соотношение активностей Г-6-ФДГ/ГК *	Источник литературы
Кишечнополостные				
<i>Obelia juveni</i> — (тело)	14,4±3,5	41,7±4,2	2,9	Собственные данные
Щупальцевые				
<i>Lepralia pallasiana</i> (тело)	16,9±2,2	22,0±4,9	10,2	То же
Моллюски, пластинчатожаберные				
<i>Mytilus galloprovincialis</i> : гепатопанкреас	12,1±1,6	28,8±1,7	2,4	[4]
гонады	10,0	52,9±2,9	5,3	"
мышечная ткань	17,0	24,9±1,5	1,5	"
Брюхоногие				
<i>Murex truncularis</i> (тело)	7,0	25,0	3,6	"
<i>Nassa reticulata</i> (тело)	16,5	37,5	2,3	"
Головоногие (мышечная ткань)				
<i>Eledona moshata</i>	40,0	69,0	1,7	"
<i>Sepia officinalis</i>	17,0	17,0	1,0	"
<i>Octopus vulgaris</i>	25,0	22,0	0,9	"
Усогогие раки				
<i>Balanus improvisus</i> (тело)	48,6	100,0±2,0	2,1	"
Десятиногие раки				
<i>Crangon crangon</i> (мышечная ткань)	38,3±15,0	4,4±0,9	0,1	"
Хордовые, оболочники				
<i>Ascidia intestinalis</i> (тело)	29,3±3,4	75,5±2,1	2,6	[4]
<i>Bothrullus schlosseri</i> (тело)	16,9±2,2	22,0±4,9	1,3	Собственные данные
Позвоночные рыбы				
<i>Torpedo marmorata</i> (мышечная ткань)	4,0	3,0	0,75	[4]
Грызуны				
<i>Rattus</i> (мышечная ткань)	6,0±0,6	2,3±1,1	0,3	"

* Коэффициент Г-6-ФДГ/ГК рассчитан авторами статьи.

используемого при синтезе половых продуктов. Из литературы известно, что активность ПФП в тканях гидробионтов коррелирует с этапами морфофункционального становления организмов, возрастая в период гаметогенеза, резко уменьшаясь по мере старения организмов [5]. Наши результаты на ботриллюсах и мшанках подтверждают это положение (см. табл. 1). Зафиксированные довольно высокие значения активности Г-6-ФДГ у гидроидов, возможно, объясняются растянутостью процессов угасания колонии, и полученные значения активности фермента относились к начальным этапам редукции колонии гидроидов. Самый низкий уровень Г-6-ФДГ обнаружен у колониальной асидии ботриллюса. По данным [4], у одиночной асидии *Ascidia intestinalis* активность Г-6-ФДГ колеблется в тех же пределах и составляет в среднем 18,7 нмоль·мг белка⁻¹·мин⁻¹.

После гипоксии у гидроидов и мшанок наблюдалось полное ингибирование фермента. Высказано мнение [5], что гипоксия создает в организме гидробионтов, в частности у мидий, как бы метаболический

Таблица 3. Соотношение активностей ферментов Г-6-ФДГ/ГК у некоторых организмов макрообрастания

Объект	Активный рост	Старение	Гипоксия
Гидроид	2,0	3,3	0
Ботриллюс	1,3	0	0,4
Мшанка	10,2	0	0

ным [3], у рыб вида *Torpedo marmorata* активность Г-6-ФДГ равна 3 нмоль·мг⁻¹ белка·мин⁻¹. Многие авторы отмечают, что высокая активность Г-6-ФДГ в сочетании с высокой активностью ГК характерна для прикрепленных видов [2, 4, 5].

Для оценки значимости ПФП наряду с гликолизом нами предложен коэффициент Г-6-ФДГ/ГК. С целью выявления роли ПФП посредством этого коэффициента в сравнительно-эволюционном аспекте приводим значения Г-6-ФДГ/ГК в тканях представителей разных таксонов (табл. 2). Можно сделать вывод о тенденции к уменьшению соотношения Г-6-ФДГ/ГК по мере филогенетического развития организмов. Например, у гидроидов, мшанок и мидий значения Г-6-ФДГ/ГК составляют соответственно 2,9; 10,2; 1,5—5,3, в то время как у рыб и грызунов — 0,75 и 0,3. Эти данные согласуются с выводами [5] о сопряженности низкого уровня гомеостаза, характерного для водных беспозвоночных и низших водных позвоночных, со значительной нагрузкой ПФП. В тканях высших животных, обладающих высокоэффективными нейрогуморальными механизмами, поддерживающими гомеостаз, роль ПФП заметно снижается [5].

По данным табл. 2 можно проследить, что у видов, близко стоящих на ступенях эволюционной лестницы, соотношение Г-6-ФДГ/ГК отличается в зависимости от экологических условий обитания и степени подвижности. У *Mytilus galloprovincialis*, являющейся типичным гидробионтом-обрастателем, значения Г-6-ФДГ/ГК равны 2,4—5,3, у брюхоногих и головоногих моллюсков, ведущих подвижный образ жизни, они снижаются с 2,3 до 0,9, а у ракообразных *Balanus improvisus* (прикрепленных к субстрату обрастателей) данное соотношение в 21 раз больше, чем у подвижных десятиногих раков *Crangon crangon*. Все это подтверждает установленную рядом авторов закономерность, согласно которой более низкому уровню энергетического обмена соответствует более высокая активность ПФП [4, 5].

Наши результаты на гидроидах, ботриллюсах и мшанках по действию гипоксии также позволяют высказать предположение, что изменения коэффициента Г-6-ФДГ/ГК отражают адаптационные возможности организмов (табл. 3). При гипоксии у ботриллюсов коэффициент Г-6-ФДГ/ГК равен 0,4 при нулевом значении у двух других изучаемых видов. Из литературы известно, что при аноксии у мидий значение пентозного коэффициента, отражающего отношение Г-6-ФДГ к суммарной активности ферментов метаболизма пентозофосфатов, снижается втрое [5]. При этом создается как бы метаболический режим экономии глюкозы. В наших экспериментах соотношение активностей ферментов Г-6-ФДГ/ГК при гипоксии снижалось до нуля. Исключение составляют ботриллюсы, отличающиеся меньшей устойчивостью в сравнении с мшанками и гидроидами.

Заключение. На основании выполненной работы можно сделать следующие выводы: 1) гидроиды, ботриллюсы, мшанки, несмотря на различный уровень развития в филогенезе, характеризуются значительным сходством организации начальных этапов катаболизма углеводов; 2) высокая активность ГК в сочетании с высокой активностью Г-6-ФДГ дает возможность предположить существенный вклад катаболизма углеводов в энергетический и пластический обмена; 3) возра-

режим экономии глюкозы и этим, очевидно, объясняется снижение активности пускового фермента ПФП. У ботриллюсов после гипоксии активность фермента оставалась близкой к контрольному значению. Уровень Г-6-ФДГ у исследованных видов оказался намного выше, чем у подвижных гидробионтов. Например, по дан-

стание активности ГК на стадии старения изучаемых видов позволяет судить об увеличении роли гликолиза в онтогенезе гидробионтов-обрастателей; 4) изменение соотношения активностей ферментов Г-6-ФДГ/ГК в эволюционном ряду и при аноксии допускает предположение об отражении этим коэффициентом адаптационных возможностей гидробионтов.

1. Бобкова А. Н. Адаптации организмов ценоза обрастания к экстремальным воздействиям: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Севастополь, 1980 — 24 с.
2. Вержбинская Н. А., Савина М. В. Эволюция гликолитической системы в тканях моллюсков // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. — 1971. — Вып. 7, № 4. — С. 337—345.
3. Вержбинская Н. А. Функциональная организация ферментной системы гликолиза в мышечной и нервной тканях у головоногих моллюсков и низших рыб // Там же. — 1972. — Вып. 8, № 3. — С. 260—268.
4. Горомосова С. А., Шапиро А. З. Основные черты биохимии энергетического обмена мидий. — М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1984. — 119 с.
5. Кудрявцева Г. В. Эколого-физиологические особенности и роль пентозофосфатного пути обмена углеводов в адаптациях гидробионтов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 1990. — 39 с.
6. Методы биологии развития. Экспериментально-эмбриологические и цитологические закономерности. — М.: Наука, 1974. — 619 с.

Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского
АН Украины, Севастополь

Получено
09.07.91

N. M. BEREGOVAYA, [A. Z. SHAPIRO], E. M. KHAZANOVA

ROLE OF HEXOKINASE AND GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE IN ADAPTATIONS OF HYDROBIONTIC FOULINGS

Summary

Mass hydromiontic foulings: hydroids, bothrilluses, pearlwrts, have been analyzed for the dynamics of activity of the key enzymes at the first stage of glycolysis and pentophosphate path (hexokinase and glucose-6-phosphatedehydrogenase). Results are presented. A comparative analysis of the enzymes' activity was carried out at different developmental stages of the populations (active growth, ageing) as well as in norm and under hypoxia. It is supposed to use activity of the mentioned enzymes for description of the homeostasis in the studied species of hydrobionts under natural conditions of the habitat. It is supposed as possible to use the relation of activities of the enzymes T-6-FDGGK) in bioindication.

УДК 597:591.111.1 (262.5±262)

Л. В. ТОЧИЛИНА, Ю. С. БЕЛОКОПЫТИН

КОЛИЧЕСТВО ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У РЫБ ЧЕРНОГО И СРЕДИЗЕМНОГО МОРЕЙ

Проведено количественное изучение лейкоцитов у 26 видов рыб, принадлежащих к 5 отрядам. Отмечены различия в содержании лейкоцитов по видовым, эколого-физиологическим и сезонным признакам. Установлена обратная зависимость между количеством эритроцитов и лейкоцитов.

При анализе эколого-физиологических особенностей рыб практическое значение имеет изучение не только красной, но и белой крови. Количество элементов белой крови характеризует физиологическое состояние особи не только на организменном уровне, но может служить показателем функциональных возможностей для вида как такового и для более широких систематических категорий. Цель настоящей работы — сравнительное изучение количества лейкоцитов у рыб, различающихся своей экологией и принадлежащих к разным систематическим группам.

© Л. В. Точилина, Ю. С. Белокопытин, 1992