

ВЛИЯНИЕ КРАТКОСРОЧНОЙ ГИПОКСИИ НА НЕКОТОРЫЕ РОСТОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЧЕРНОМОРСКОЙ МИДИИ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ПИЩИ

Исследованы особенности динамики содержания белка, суммарных РНК, ДНК и индекса РНК/ДНК в тканях мидий под влиянием 1- и 4-суточной гипоксии и голодания. Показано, что содержание белка и сум.РНК в жабрах и гепатопанкреасе снижалось в среднем на 30 - 50 % от контрольного уровня. 4-суточная гипоксия приводила к увеличению в 15,5 раз концентрации аммонийного азота в воде.

Имеются данные, свидетельствующие об использовании белков в аэробных и анаэробных условиях в качестве энергетических и пластических резервов у крупных таксонометрических групп беспозвоночных, в частности, моллюсков [6 - 8, 10 и др.]. Последним свойствен анаэробный катаболизм белковых соединений в условиях дефицита кислорода в воде (внешняя гипоксия). С содержанием белка и его синтезом в тканях тесно связано содержание суммарных РНК и ДНК, характеризующих уровень биосинтетической активности и одновременно являющихся индикаторами функционального состояния организма в различных условиях существования, в том числе в экстремальных [2, 6, 9]. Уровень экскреции аммонийного азота является показателем интенсивности белкового катаболизма [2, 10].

Цель настоящей работы – проанализировать особенности динамики содержания белка, РНК, ДНК и их соотношения под влиянием краткосрочной внешней гипоксии и дефицита пищи на примере черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis*.

Материал и методы. Мидий собирали с опытных коллекторов в бухте Казачья (г. Севастополь) в мае - июне 1999 г. Проведено две серии опытов – 1- и 4-суточные. Интервал между двумя сериями – 13 сут. По 8 экз. одноразмерных (40 - 42 мм) мидий черной цветовой морфы помещали в 1-литровые замкнутые респирометры. В экспериментах использовали фильтрованную морскую воду, не содержащую фитопланктон (фильтр 20 μ). Контролем служила группа мидий ($n=8$), сидящих в проточном аквариуме с такой же фильтрованной морской водой. Температура воды равнялась 17 - 18°C. Исходное содержание кислорода в воде – 5,71 мл/л, аммонийного азота – 5,9 мкг/л. Остаточное содержание O_2 в воде после 1-суточной гипоксии составляло 1,2 мл/л, после 4-суточной – 0,38 мл/л. Отбор контрольных проб проводили параллельно с отбором опытных. Содержание кислорода в воде определяли методом Винклера (в мл O_2 /л), содержание аммонийного азота – методом Сэджи-Солорзано (мкг NH_4-N /л) [5].

В гепатопанкреасе и жабрах определяли белок по методу Лоури [11], суммарное содержание РНК и ДНК – методом Спирина [4], с некоторыми модификациями. Навески сырой ткани массой от 35 до 50 мг гомогенизировали, удаляли пигментные и липидные фракции (ацетон, смесь хлороформ-метанол в соотношении 2:1). Промытые пробы доводили до сухого веса, затем обрабатывали 5 % раствором $HClO_4$, трижды центрифугировали при 6000 об/мин. Аликвоту сливали, осадок подвергали щелочному гидролизу 1N KOH. Для определения нуклеиновых кислот проводили кислотный гидролиз 42 % $HClO_4$ с последующим многократным центрифугированием, растворы спектрофотометрировали при длинах волн 270 и 290 нм. Результаты выражали в % к сухой массе тканей. По полученным значениям РНК и ДНК рассчитывали индекс РНК/ДНК. Все пробы индивидуальны. Каждому измерению соответствовал один экземпляр. Общее количество анализируемых проб – 48, определений – 144.

Результаты. Данные по влиянию краткосрочной гипоксии на ростовые показатели тканей мидий представлены в таблице. При односторонней гипоксии содержание белка в жабрах и гепатопанкреасе по сравнению с контролем достоверно снизилось ($P < 0,05$). Аналогичные результаты получены и для значений сум. РНК в жабрах и в

гепатопанкреасе, причем значительное снижение имеет место в гепатопанкреасе - с 0,42 % до 0,28 % сух. массы. В процентном содержании ДНК достоверной разницы не обнаружено ($P>0,05$).

Таблица. Влияние краткосрочной гипоксии на ростовые показатели мидии ($M\pm m$)
Table. Influences of short-term hypoxia on growth parameters of the Black sea mussels ($M\pm m$)

Показатели		Ткань	
		Жабры	Гепатопанкреас
Белок, % сырой массы:	контроль	12,09 $\pm$ 1,03	9,60 $\pm$ 0,61
	1- сут. гипоксии	7,82 $\pm$ 0,80	6,93 $\pm$ 0,95
	контроль	11,10 $\pm$ 1,70	-
	4- сут. гипоксии	7,7 $\pm$ 0,54	-
РНК, % сухой массы:	контроль	0,31 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,05
	1- сут. гипоксии	0,21 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,02
	контроль	0,39 $\pm$ 0,05	-
	4- сут. гипоксии	0,26 $\pm$ 0,03	-
ДНК, % сухой массы:	контроль	0,11 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,01
	1- сут. гипоксии	0,13 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,007
	контроль	0,05 $\pm$ 0,01	-
	4- сут. гипоксии	0,05 $\pm$ 0,06	-
РНК/ДНК:	контроль	3,53 $\pm$ 0,27	4,14 $\pm$ 0,30
	1- сут. гипоксии	1,59 $\pm$ 0,08	3,64 $\pm$ 0,70
	контроль	7,91 $\pm$ 0,82	-
	4- сут. гипоксии	5,98 $\pm$ 0,31	-

В эксперименте с 4-сут. гипоксией анализировали данные, полученные только для жаберной ткани. По сравнению с контролем содержание белка здесь также значительно снизилось, в среднем на 30%: в контроле - 11,1 $\pm$ 1,70% сырой массы, после гипоксического стресса - 7,7 $\pm$ 0,54% сырой массы ($P<0,05$), содержание РНК в среднем на 30%. Уровень ДНК не изменился.

Разница в значениях ДНК в обоих контролях (жабры) существенна - 0,11 % и 0,05 % сухой массы, однако входит в интервал допустимых величин ДНК для тканей мидий. Это объясняет и величины индексов, полученных в обоих контролях в жаберной ткани. Рассчитанный индекс РНК/ДНК для жаберной ткани в контроле и при односточной гипоксии заключен в диапазоне 1,59 - 3,53, хотя и наблюдается снижение в опыте ($P<0,05$). Для гепатопанкреаса разница полученных данных недостоверна ($P>0,05$). Практически такая же картина наблюдается и при 4-суточной гипоксии. РНК/ДНК в контроле - 7,81, в опыте - 5,98. Содержание аммонийного азота в воде в 4-суточных опытах заметно возрастало от 5,9 мкг/л (исходное количество) до 91,44 мкг/л.

Обсуждение. В обоих экспериментах, уже через 4 - 5 ч мидии начинают испытывать "внешнюю" гипоксию, обусловленную как низким содержанием кислорода в воде, так и накапливающимися продуктами азотистого обмена, как правило, блокирующего доступ кислорода к тканям [8]. Эти факторы усиливаются фактором голодания. Отметим, что для *Mytilus galloprovincialis* аналогичных линейных размеров при соответствующих температурах воды пороговыми являются концентрации 1,0 - 1,5 мл O_2 /л; переключение на анаэробные процессы метаболизма зарегистрировано при 0,5 мл O_2 /л [1, 6].

Учитывая, что недостаток пищи испытывали мидии как в контроле, так и в опытных сосудах, изменения исследуемых показателей следует рассматривать как результат влияния главным образом гипоксии. В жабрах как при 1-, так и при 4-суточной гипоксии содержание белка снижалось в среднем на 30 - 50 % от контрольного уровня. Однако в гепатопанкреасе произошла более значительная потеря белка (до 50 %), что можно объяснить высокой функциональной реактивностью этой ткани. Аналогичные особенности расхода белка в печени моллюсков и их трактовку можно найти в литературе [6, 7 и др.]. Использование белков как энергетических субстратов в гипоксической

среде у разных видов мидий подтверждено экспериментальными данными [напр., 6]. Интенсивность белкового катаболизма можно оценить по уровню экскреции его конечных азотистых продуктов (аммонийного азота). В наших экспериментах по окончании 4-суточной гипоксии наблюдается значительное увеличение (в 15,5 раз) содержания аммонийного азота в воде. Кроме того, известно, что белок может расходоваться как пластический материал клеток и энергетический субстрат в условиях нормального (для данного вида) снабжения кислородом, в особенности для животных с прикрепленным образом жизни [8, 10]. Этот факт важен для объяснения того, что в нашем эксперименте снижение содержания белка наблюдалось как при концентрации O_2 в воде 0,38 мл/л (4-х суточная гипоксия), так и при концентрации в воде 1,2 мл/л (~32% насыщения кислородом). Вероятно, могло произойти и дальнейшее изменение содержания белка, если продолжительность гипоксии увеличить до 7-10 суток. Отсутствие отличий в падении концентрации белка при гипоксии и 4-суточном голодании, возможно, связано с тем, что в первую очередь тратится основной энергетический резерв мидий, которым является гликоген [3].

Снижение концентрации РНК в среднем на 30% по сравнению с контрольными величинами в обоих экспериментах говорит о резком замедлении белкового синтеза при гипоксии.

1. Боровинский А.Г. Влияние концентрации кислорода в морской воде на интенсивность дыхания черноморских мидий // Моллюски, результаты и перспективы их исследований. – Ленинград. – 1987. – №8. – С. 272 - 273.
2. Вялова О.Ю. Особенности энергетического и азотистого метаболизма неполовозрелых мидий *Mytilus galloprovincialis* в условиях эксперимента : Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Севастополь, 2000. – 16 с.
3. Горомосова С.А., Шапиро А.З. Основные черты биохимии энергетического обмена мидий. – М.: Легкая и пищевая пром-ть, 1984. – 120 с.
4. Спиринов А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. – 1958. – 23, 5. – С. 656 - 662.
5. Справочник гидрохимика: рыбное хозяйство. – М: Агропромиздат, 1991. – С. 23 - 36, 55 - 65.
6. Шапиро А.З., Звездовская Н.М. Об изменении содержания белка в тканях мидий при экстремальных воздействиях (в условиях эксперимента) // Экология моря. – 1986. – Вып. 24. – С. 96-102.
7. Шульман Г.Е. Изменение состава печени кальмара *Sthenoteuthis onaliansis* (Lesson) при выдерживании в протоке // Экология моря. – 1982. – вып. 10. – С. 87 - 90.
8. Шульман Г.Е., Аболмасова Г.И., Столбов А.Я. Использование белка в энергетическом обмене гидробионтов // Успехи совр. биологии. – 1993. – 113, 5. – С. 576 - 586.
9. Щербань С.А. Эколого-физиологические особенности и биохимические индикаторы роста черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis*: Автореф. дисс. канд. биол. наук. – С.-Петербург, 1995. – 27 с.
10. Gabbott P.A. Energy metabolism / In: Marine mussels: their ecology and physiology. – Cambridge, London, New York. Press., 1976. – P. 293 - 317.
11. Lowry O. H., Rosebrough A. L., Forr A. L. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, 1. – P. 265 - 275.

Институт биологии южных морей НАНУ
г. Севастополь

Получено 19.10.2001

S. A. SHCHERBAN, O. Yu. VYALOVA

INFLUENCE OF SHORT-TERM HYPOXIA ON SOME GROWTH PARAMETERS OF BLACK SEA MUSSELS UNDER THE FOOD DEFICIT

Summary

The features of dynamic of protein content, total RNA, DNA and index RNA/DNA in the gill and hepatopancreas tissues of *Mytilus galloprovincialis* (40-42 mm) under short-term (1 day and 4 days) hypoxia and nutrition stress have been studied. Decreasing of protein content and RNA was observed both at oxygen concentration of 1,2 ml/l (~32% of oxygen saturation, 1 day hypoxia) and at oxygen concentration of 0,38 ml/l (~20% of oxygen saturation, 4 day hypoxia) by 30-50% from the control concentration. The 4-day hypoxia resulted in the increase of ammonia content by 15,5 times.