

МЕХАНИЗМЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ К КРАТКОВРЕМЕННОЙ И ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОКСИИ У *MOINA MICRURA* (CLADOCERA)

Исследовано влияние концентрации кислорода на энергетический и азотистый обмен у черноморских кладоцер *Moina micrura*, выращенных в лабораторных культурах при нормо- и гипоксии. Установлено, что у неакклимизированных к дефициту кислорода моин острая гипоксия приводит к снижению общего, базального и активного обменов и переходу с белково-липидного типа катаболизма на белковый. Адаптация к длительному обитанию в обедненной кислородом среде направлена на поддержание высокого уровня активного обмена и увеличение роли липидных метаболитических субстратов.

Обитатель черноморских лиманов ветвистоусый рачок *Moina micrura* Hellich на протяжении жизненного цикла испытывает значительные изменения кислородного режима обитания [4]. Внезапное понижение концентрации кислорода моины могут переживать благодаря уменьшению скорости энергетического обмена и переходу с обычного в условиях нормоксии смешанного белково-липидного катаболизма на исключительно белковый [1, 6, 15, 16]. У многих гидробионтов понижение концентрации кислорода вызывает активацию гликолитических процессов [8]. Однако в теле ракообразных содержание углеводов, как правило, не превышает 5% сухой массы, тогда как доля белка достигает 70% [5, 10]. При постепенном ухудшении условий обитания моины, как и другие ветвистоусые, способны увеличивать кислородную емкость крови путем синтеза гемоглобина [3, 9, 13]. Энергетический эффект и направленность метаболизма при такой компенсаторной реакции до настоящего времени не исследованы.

Целью данной работы было сравнительное изучение адаптивной реакции общего энергетического обмена, его базальной и активной составляющих, а также особенностей утилизации метаболитических субстратов при понижении концентрации кислорода у *Moina micrura*, акклимизированных и неакклимизированных к гипоксии.

Материал и методика. Эксперименты выполнены в 1994-1996 гг. на самках *Moina micrura* из двух лабораторных субкультур, выращенных на смеси зеленых водорослей (*Chlorella minutissima*, *Dunaliella maritima*, *D. salina*, *Platymonas viridis*) в насыщенной кислородом воде и в условиях постоянной гипоксии ($1,4 \pm 0,5$ мг O_2 л⁻¹). Для достижения нужной концентрации кислорода воду продували газообразным азотом. Акклимизированные к гипоксии моины имели ярко-красную окраску, свидетельствующую о наличии в их теле гемоглобина. Сырую массу половозрелых самок (W, мг) рассчитывали по полученной нами эмпирической формуле $W = 0,069L^3$, где L - общая длина тела рачков (мм).

Интенсивность потребления кислорода (Q , мкг O_2 мг⁻¹ ч⁻¹) и экскреции аммонийного азота (E_N , мкг NH_3-N мг⁻¹ ч⁻¹) определяли при разных концентрациях кислорода в диапазоне от 0,44 до 8,7 мг O_2 л⁻¹ в воде с постоянными значениями температуры (18,0°C) и солености (15‰).

Параметры базального метаболизма исследовали у рачков, наркотизированных 1,0% раствором уретана [7]. Характеристики активного обмена рассчитывали по разнице между показателями общего и базального обменов.

Интенсивность дыхания и экскреции определяли по относительному изменению концентрации кислорода и аммонийного азота в опытных (с животными) и контрольных цельностеклянных шприцах объемом 2,5 мл. В каждый опытный шприц с фильтрованной водой помещали в среднем по 10 активных и до 20 наркотизированных *M. micrura*. Экспозиция составляла около 3 ч. Перед экспериментом рачков выдерживали в течение 1 ч в небольшом сосуде с фильтрованной водой для освобождения желудков от пищи.

Концентрацию кислорода измеряли при помощи оксиметра с импульсным гальваническим датчиком и ячейкой объемом 0,5 мл [16], вводя в нее пробу воды четырьмя

порциями через иглу шприца. Эту же пробу затем использовали для определения содержания аммонийного азота по методу Солорзано [14].

В качестве индикатора утилизируемых метаболических субстратов использовали атомное отношение потребленного моинами кислорода к экскретированному азоту (O:N) [14]. Количество кислорода, идущего на окисление белка, и долю белка в анаэробном обмене вычисляли, исходя из количества катаболизированного белка и его энергетического эквивалента [6].

Полученные материалы представлены в виде средних величин и их ошибок.

Результаты и обсуждение. Полученные нами данные по дыханию и аммонийной экскреции *M. micrura*, представленные в первичном виде в работе [1], свидетельствуют о различии кислородной зависимости общего энергетического и белкового метаболизма у неакклиматизированных (M_{na}) и акклиматизированных к гипоксии (M_a) рачков. В диапазоне от $\sim 7,5 \text{ мг O}_2 \text{ л}^{-1}$ до $0,4-0,5 \text{ мг O}_2 \text{ л}^{-1}$ у M_{na} скорость дыхания и экскреции понижается в 18,5 и 4,2 раза, тогда как у M_a - в 2,3 и 2,4 раза соответственно (рис. 1, А, Б).

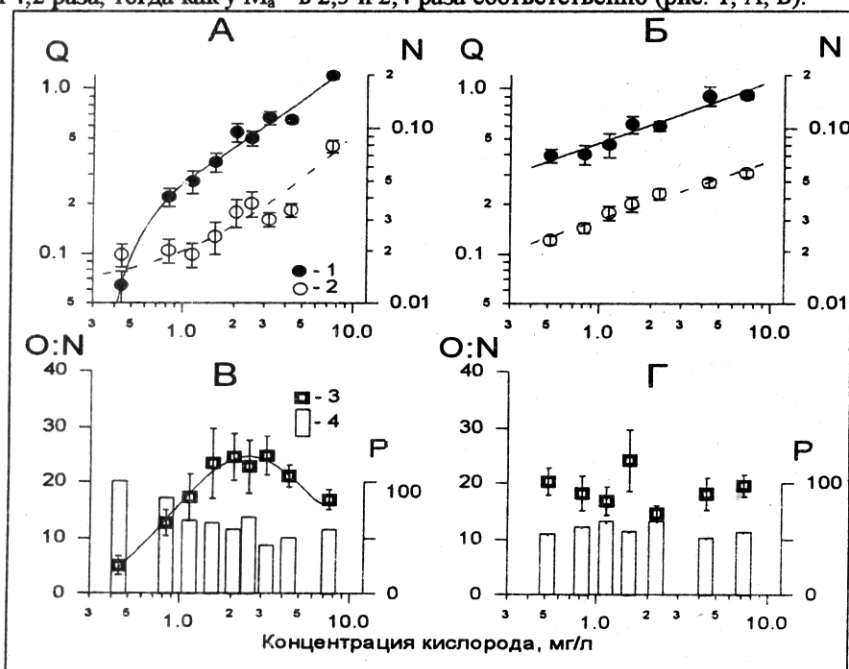


Рис. 1 Параметры общего обмена у неакклиматизированных (А, В) и акклиматизированных к гипоксии (Б, Г) *Moina micrura*.

1 - интенсивность дыхания Q, $\mu\text{г мг сыр. массы}^{-1} \text{ ч}^{-1}$; 2 - интенсивность экскреции азота N, $\mu\text{г NH}_3\text{-N мг сыр. массы}^{-1} \text{ ч}^{-1}$; 3 - атомное отношение O:N; 4 - доля кислорода, идущая на окисление белка P, %.

Fig. 1 The parameters of total metabolism in non-acclimated (A, B) and acclimated to hypoxia (Б, Г) *Moina micrura*.

1 - weight-specific respiration rate Q, $\mu\text{g mg WW}^{-1} \text{ h}^{-1}$; 2 - weight-specific ammonia excretion rate N, $\mu\text{g NH}_3\text{-N mg WW}^{-1} \text{ h}^{-1}$; 3 - atomic O:N ratio; 4 - share of oxygen used in protein oxidation P, %.

Изменение атомного отношения O:N у M_{na} от 16,8-24,8 до 5,0 в исследованном диапазоне концентраций O_2 (рис.1, В) указывает на переход со смешанного белково-липидного катаболизма в условиях нормоксии на белковый при дефиците кислорода, тогда как M_a (рис. 1, Г) сохраняют способность утилизировать смешанные метаболические субстраты (O:N =20,2) вплоть до $0,52 \text{ мг O}_2 \text{ л}^{-1}$ (концентрация кислорода, близкая к сублетальной для M_{na}).

Доля кислорода, идущая на окисление белка, у M_{na} при понижении концентрации O_2 от 7,49 до $0,44 \text{ мг л}^{-1}$ возрастает от 42,1-56,4 до 100% (рис.1, В), а доля белка, катаболизируемого анаэробно, достигает 63,8%. У M_a в примерно таком же диапазоне

50,5-64,8% (рис.1, Г). Таким образом, акклимированные к гипоксии моины с повышенной кислородной емкостью крови получают возможность снизить белковый обмен за счет мобилизации энергоемких липидных субстратов.

У наркотизированных неакклимированных и акклимированных к гипоксии *M. micrura* (M_{na}) в исследованном диапазоне концентраций O_2 (8,7-0,5 мг O_2 л $^{-1}$) интенсивность дыхания понижается в среднем в 6,2 раза, интенсивность экскреции – в 2,5 раза (рис.2, А).



Рис. 2 Параметры базального обмена (А, Б) у неакклимированных и акклимированных к гипоксии *Moina micrura*.

1 - интенсивность дыхания Q , мкг мг сыр. массы $^{-1}$ ч $^{-1}$; 2 - интенсивность экскреции азота N , мкг NH_3 -N мг сыр. массы $^{-1}$ ч $^{-1}$; 3 - атомное отношение $O:N$; 4 - доля кислорода, идущая на окисление белка P , %.

Fig. 2 The parameters of basal metabolism (A, Б) in non-acclimated and acclimated to hypoxia *Moina micrura*.

1 - weight-specific respiration rate Q , μg mg WW^{-1} h $^{-1}$; 2 - weight-specific ammonia excretion rate N , μg NH_3 -N mg WW^{-1} h $^{-1}$; 3 - atomic $O:N$ ratio; 4 - share of oxygen used in protein oxidation P , %.

Существенных различий в характере кислородной зависимости базального обмена, экскреции азота и $O:N$ у M_a и M_{na} не обнаружено. Уровень аммонийной экскреции у наркотизированных рачков из обеих субкультур в насыщенной кислородом воде в 4,5 и 6,3 раза, а при гипоксии (0,4-0,5 мг O_2 л $^{-1}$) в среднем в 3 раза ниже, чем у активных M_a и M_{na} соответственно. Атомное отношение $O:N$ у наркотизированных особей при понижении концентрации O_2 от 8,7 до 0,4-0,5 мг O_2 л $^{-1}$ меняется в среднем от 37,5 до 8,5 (независимо от степени акклимации рачков), что указывает на уменьшение в базальном обмене роли белково-липидных субстратов. Доля кислорода, идущая на окисление белка, возрастает от 29 до 100% (рис. 2, Б), свидетельствуя о том, что в гипоксическом режиме белок становится единственным энергетическим субстратом; при этом доля анаэробного катаболизма достигает 26%. Отсутствие акклимационных изменений метаболических показателей наркотизированных рачков согласуется с представлениями о консервативности базального обмена [2], в малой степени зависящего от внешних условий и служащего основой для развития адаптивных черт.

Сопоставление уровней общего и базального обменов показывает, что адаптация к гипоксии проявляется в увеличении доли активного обмена моин. При понижении концентрации кислорода отношение общего обмена к базальному (метаболический диапазон) у M_{na} снижается от 3,4 до 1,2, тогда как у M_a увеличивается от 2,6 до 7,4. Отметим, что полученные нами величины метаболического диапазона моин при нормоксии (2,6 – 3,4 раза) подтверждаются литературными данными [7, 11].

В активном метаболизме акклимационные отличия у *M. micrura* проявляются особенно ярко, что свидетельствует о доминирующей роли в адаптационном процессе именно этого компонента энергетического обмена [2]. В диапазоне от 7,8

до 0,42 мг O_2 л⁻¹ у M_{na} уровень активного обмена и экскреции снижается в 80 и 6,3 раза, у M_a – всего в 1,8 и 3,1 раза соответственно (рис. 3, А, Б). Отношение O:N у M_{na} резко уменьшается от 19,1 до 1,1 (рис. 3, В) и единственным субстратом метаболизма становится белок, на 90% катаболизируемый анаэробным путем. У M_a в исследованном диапазоне концентраций O_2 O:N варьирует в пределах 13,8-22,8 (рис. 3, Г), что соответствует смешанному белково-липидному обмену (доля катаболизованного белка находится в пределах 46,4-73,3%).

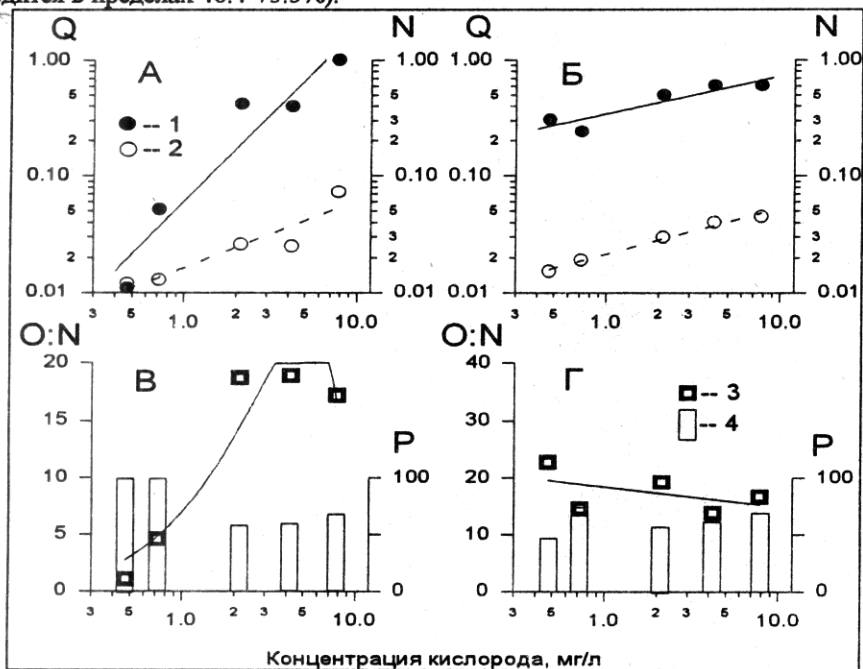


Рис. 3 Параметры активного обмена у неакклимизированных (А, В) и акклимизированных к гипоксии (Б, Г) *Moina micrura*.

1 - интенсивность дыхания Q , мкг мг сыр. массы⁻¹ ч⁻¹; 2 - интенсивность экскреции азота N , мкг NH_3 -N мг сыр. массы⁻¹ ч⁻¹; 3 - атомное отношение O:N; 4 - доля кислорода, идущая на окисление белка P , %.

Fig. 3 The parameters of activity metabolism in non-acclimated (A, B) and acclimated to hypoxia (Б, Г) *Moina micrura*.

1 - weight-specific respiration rate Q , μg mg WW^{-1} h⁻¹; 2 - weight-specific ammonia excretion rate N , μg NH_3 -N mg WW^{-1} h⁻¹; 3 - atomic O:N ratio; 4 - share of oxygen used in protein oxidation P , %.

Таким образом, можно предположить, что акклимация к гипоксии, происходящая благодаря повышению кислородной емкости крови, позволяет мойнам использовать большее количество энергоемких липидных субстратов, что необходимо для поддержания их нормальной локомоторной и фильтрационной активности.

Выводы. 1. Переживание внезапной гипоксии у *M. micrura*, выращенных в насыщенной кислородом воде, происходит благодаря резкому понижению общего, базального и особенно активного обменов, а также переходу со смешанного типа катаболизма на исключительно белковый. 2. Длительная акклимация к условиям кислородного дефицита позволяет *M. micrura* повысить уровень энергетического обмена за счет увеличения его активной составляющей и сохранять смешанный белково-липидный тип катаболизма.

1. Губарева Е. С., Светличный Л. С. Особенности изменения метаболизма у ветвистоусого рачка *Moina micrura* при адаптации к гипоксии // Доповіді НАНУ. - 1998. - 9. - С. 195 - 199.
2. Ивлев В. С. Опыт оценки эволюционного значения уровней энергетического обмена // Журн. общ. биол. - 20, N 2. - С. 94 - 103.
3. Ивлева И. В. Биологические основы и методы массового культивирования кормовых беспозвоночных. - М.: Наука, 1969. - 170 с.
4. Определитель фауны Черного и Азовского морей. - Т. 2. - Свободноживущие беспозвоночные. Ракообразные. - К.: Наук. думка, 1969. - 536 с.
5. Раймонт Дж. Планктон и продуктивность океана. - М.: Агропромиздат, 1988. - 2, 2. - 356 с.
6. Светличный Л. С., Юнева Т. В., Шульман Г. Е. и др. Использование белка в энергетическом обмене ветвистоусого рачка *Moina micrura* при различном содержании кислорода в воде // Докл. РАН. - 1994. - 337, N 3. - С. 428 - 430.
7. Филиппова Т. Г., Постнов А. Л. Взаимосвязь энергетических затрат и процесса питания у ветвистоусых ракообразных (Cladocera, Crustacea) // Журн. общ. биол. - 1988. - 42, N 4. - С. 540 - 551.
8. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. - М.: Мир, 1977. - 398 с.
9. Engle D. The production of haemoglobin by small pond *Daphnia pulex*: Intraspecific variation and its relation to habitat // Freshwater Biol. - 1985. - 15. - P. 631 - 638.
10. Ikeda T. Nutritional ecology of zooplankton // Mem. Fac. Fish., Hokkaido Univ. - 1974. - 22, N 1. - 97 p.
11. Ivanova M. B., Klekowski R. Z. Respiratory and filtration rates in *Simocephalus vetulus* (O. F. Müller) (Cladocera) at different pH // Polskie Arch. Hydrobiol. - 1972. - 19, N 3. - P. 303 - 318.
12. Kring R.L., O'Brien W.J. Effect of varying oxygen concentration on the filtering rate of *Daphnia pulex* // Ecology. - 1976. - 57. - P. 808 - 814.
13. Landon M. S., Stasiak R. H. *Daphnia* hemoglobin concentration as a function of depth and oxygen availability in Arco Lake, Minnesota // Limnol. Oceanogr. - 1983. - 28. - P. 731 - 737.
14. Omori M., Ikeda T. Methods in Marine Zooplankton Ecology. - New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore: Wiley-Interscience publication, John Wiley & Sons. - 1984. - 332 p.
15. Shulman G. E., Love M. R. The biochemical ecology of marine fishes // Adv. Mar. Biol. - 1999. - 36. - 351 p.
16. Svetlichny L. S., Hubareva E. S., Arashkevich E. G. Physiological and behavioural response to hypoxia in active and diapausing stage V copepodites of *Calanus euxinus* // Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol. - 1998. - 52. - P. 507 - 519.

Институт биологии южных морей НАНУ,
г. Севастополь

Получено 21.09.2000

E. S. HUBAREVA

THE MECHANISMS OF PHYSIOLOGICAL ADAPTATION TO SHORT- AND LONG-TERM HYPOXIA IN MOINA MICRURA (CLADOCERA)

Summary

The effect of oxygen concentration on the parameters of energy and nitrogen metabolism in the Black Sea cladoceran *Moina micrura* cultured separately under normo- and hypoxia was investigated. Under acute hypoxia non-acclimated to oxygen deficiency individuals decreased their total, basal and activity metabolism and used pure proteins as metabolic substrates. The adaptation to long-term hypoxia in *M. micrura* trends to maintaining high level of scope of activity and increasing the role of lipids in metabolism.