АСПЕКТЫ АДАПТАЦИОННОЙ СТРАТЕГИИ МОЛЛЮСКА-ВСЕЛЕНЦА *ANADARA INAEQUIVALVIS* (BRUGÙIERE, 1789) В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГОЛОДАНИЯ

Т. И. Андреенко

Севастопольский национальный технический университет, г. Севастополь, Украина
e-mail: tatyana-andreenk@mail.ru

Введение

Живые организмы являются открытыми термодинамическими системами, существование которых требует постоянного притока вещества и энергии. Ограничение в питании и голод вызывают реорганизацию физиологических и биохимических процессов в организме, имеющую как адаптивную, так и компенсационную направленность. При этом для организмов разных систематических групп обнаружена специфика в переориентации данных процессов.

Отмечено, что среди гидробионтов наиболее чувствительными к условиям голодания являются костистые рыбы. В ответ на непродолжительную депривацию пищи (5–15 дней) происходит снижение общего и основного обмена, усиливаются процессы белкового катаболизма в тканях (Guderley et all, 2003; Shoemaker 2003), снижается индекс РНК/ДНК (Gao et all, 2004; Bowen, 2005), подавляется активность ряда ферментов (Qian, Chen, Sun, 2002; Guderley et all, 2003; Gao et all, 2004). Одновременно наблюдается резкое сокращение содержания глюкозы, гликогена, жиров т.е. энергетических ресурсов тканей (Gao et all, 2004; Hall, Short, Driedzic, 2006).

Ракообразные в отличие от представленной выше группы более устойчивые к голоданию. В условиях 14 суток депривации пищи у них также отмечается понижение как общего так и основного обмена (Thor, 2003; Comoglio et all, 2004), при этом происходит усиление гликолитических процессов в тканях (Comoglio et all, 2004). На начальных этапах голодания они активно использует углеводные ресурсы и триацилглицериды (Sanchez-Paz, 2007; Wu, 2007) и только в условиях длительного голодания (более 30 суок) наблюдается снижение содержания белка в тканях (Wen, Ku, Zhou, 2007).

Что касается моллюсков, то информация о влиянии голодания на обменные процессы в тканях у этой группы организмов крайне ограничена. Установлено снижение содержания глюкозы и гликогена в гемолимфе (Carefoot et all, 1992), уменьшение частоты сердечных сокращений (Santini, Bianchi, Chelazzi, 2002). Особый интерес представляют моллюски-фильтраторы, так как у них в естественных условиях голодание не может быть полным, а только частичным, то есть недостаточным по калорийности и качественному составу получаемой пищи.

Цель настоящего исследования – изучить особенности адаптивной реорганизации белкового и углеводного метаболизма у *Anadara inaequivalvis* в условиях полного голодания.

Материал и методы

В работе использовали особей *Anadara inaequivalvis* с длиной раковины 30–33 мм. Материал был получен одномоментно с коллекторных установок рыбодобывающего предприятия «Дон-Комп» (бухта Стрелецкая, Севастополь). Транспортировку животных осуществляли в пластмассовых контейнерах насыпью без воды в течение 1 ч от момента сбора. Перед проведением исследований животных выдерживали в стеклянных аквариумах объемом 30 л с проточной морской водой в течение 2–3 суток для снятия реакции стресса.

Морскую воду для эксперимента доставляли из 10-ти мильной зоны и подвергали термической обработке при 80–85 ^{o}C в течение 4-х часов. Затем ее пропускали через мембранный фильтр (Synpor – 2,5) под вакуумом. Экспериментальная часть работы выполнена на специ-

ально разработанном стенде, который позволял поддерживать заданную температуру и концентрацию кислорода в воде. В камеру объемом 13,5 л наливали заранее подготовленную воду и помещали 30 особей анадары. Контроль концентрации кислорода в воде осуществляли потенциометрически. В течение опыта она не снижалась ниже 7 мг $л^{-1}$. В работе применяли оксиметр ELWRO N 5123 (Польша). Температуру воды составляла 20±1 °С. Фотопериод – 12 часов день: 12 часов ночь. Экспозиция – 18 суток. Пробы тканей отбирали на 1-е, 6-е и 18-е сутки эксперимента. Ежедневно в опыте и контроле производили полную смену воды в емкостях для удаления метаболитов.

Препарирование тканей проводили при температуре 0–4 °С. Полученные образцы гепатопанкреаса, жабр и ноги упаковывали в пищевую фольгу и хранили в жидком азоте. В последующем навески тканей гомогенизировали с использованием в качестве трансформирующей среды 1,15% KCl. Для получения супернатанта гомогенаты подвергали центрифугированию при 6000 об $мин^{-1}$ в течение 15 минут. В работе использовали рефрижераторную центрифугу K-23D (Германия). Все процедуры выполняли при 0–4 °С.

В тканях моллюсков определяли: активности аланин- и аспартатаминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) – динитрофенилгидрозиновым методом, гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) по реакции с L-γ-глутамил-n-нитроанилидом, катепсина D по кислоторастворимым продуктам ферментативного гидролиза гемоглобина (Камышников, 2004). Все измерения выполняли при 25,0±0,5 °С. Одновременно в тканях определяли содержание белка по методу Лоури, аминного азота по реакции с нингидрином, мочевины по реакции с диацетилмонооксимом, глюкозы глюкозоксидазным методом, лактата ферментативным метод по скорости восстановления $НАДН_2$ и пирувата по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (Камышников, 2004). В работе использовали стандартные наборы реактивов: «Simco, Ltd» (при определении активностей АлАТ и АсАТ), ООО НПП «Филисит диагностика» (при определении активности ГГТП и содержания глюкозы) и «Lachema» (при определении содержания мочевины и лактата).

Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm Sx^{-}$. Достоверность различий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. О нормальности распределения судили по сопоставлению абсолютных величин средней арифметической и моды.

Результаты

В условиях экспериментального голодания изменения всех исследованных параметров у моллюсков имели выраженную тканевую специфику.

Г е п а т о п а н к р е а с . Содержание глюкозы в данном органе в течение первых 6-ти суток голодания не изменялось (табл. 1). Однако затем количество этого соединения в гепатопанкреасе уменьшилось на 40,0% ($p<0,01$). Это происходило на фоне снижения содержания лактата в ткани на 32,2%. Однако, различия не были статистически выражены в виду существенной вариабельности полученных значений. Количество пирувата, напротив, в первые 6 суток голодания увеличилось на 67,3% ($p<0,05$), а затем вернулось к исходным величинам – 0,9–1,1 нмоль $мг^{-1}$.

Таблица 1. **Содержание глюкозы, лактата и пирувата в тканях анадары в условиях экспериментального голодания**

Органы моллюска	n	Показатели		
		Глюкоза, нмоль $мг^{-1}$	Лактат, нмоль $мг^{-1}$	Пируват, нмоль $мг^{-1}$
Гепатопанкреас				
Контроль	10	11,4±0,60	10,2±2,05	1,07±0,20
Голодание 6 суток	10	12,1±1,00	8,30±1,31	1,79±0,31
Голодание 18 суток	6	7,21±1,13	6,92±1,13	0,90±0,15
Жабры				
Контроль	10	3,80±0,65	6,73±1,28	0,69±0,09
Голодание 6 суток	10	3,31±0,87	5,87±0,93	1,25±0,21
Голодание 18 суток	6	0,52±0,23	3,79±0,75	1,43±0,26
Нога				
Контроль	10	1,55±0,59	2,86±0,42	3,94±0,11
Голодание 6 суток	10	1,52±0,48	2,02±0,29	0,75±0,05
Голодание 18 суток	6	1,03±0,14	1,85±0,14	1,00±0,07

Примечание: n – число особей

В условиях нашего эксперимента наблюдался рост содержания белка в гепатопанкреасе. Общий прирост, которого в течение эксперимента составил почти 40,0% ($p<0,01$) (табл. 2). Это происходило на фоне уменьшения количества свободных аминокислот и мочевины в органе соответственно на 41,0% ($p<0,01$) и 27,7% ($p<0,05$). Изменение активностей АлАТ и АсАт было слабо выражено (рис. 1). Небольшой рост был выявлен только относительно АсАТ – 17,7% ($p<0,05$). При этом происходило подавление активности γ-ГТП на 33,1% ($p<0,05$) (рис. 2). На 18-е сутки эксперимента активность лизосомального фермента катепсина D была в 3,5 раза выше ($p<0,01$), чем в начале опыта (рис. 2).

Ж а б р ы . Содержание глюкозы в жабрах было в 3,0 раза ниже ($p<0,001$), чем в гепатопанкреасе (табл. 1). Различие в начале и конце опыта (18-е сутки) составило 7,3 раза ($p<0,001$). Голодание вызывало в тканях жабр также снижение содержания лактата на 43,7% и рост уровня пирувата в 2,1 раза ($p<0,05$).

В сравнении с гепатопанкреасом изменение содержания белка и его метаболитов в жабрах анадары в ходе экспериментального голодания имела иную динамику (табл. 2). На 6-е сутки эксперимента содержание белка снижалось на 21,2% ($p<0,01$) и затем не претерпевало статистически значимых изменений. Одновременно в органе уменьшалось количество аминного азота на 48,9% ($p<0,001$). Это происходило на фоне роста содержания мочевины. Активности АлАТ, АсАТ, γ-ГТП и катепсина D в течение опыта не изменялись (рис. 1, 2).

Н о г а . Как и в других тканях, голодание вызывало понижение содержания глюкозы в ноге анадары. Это происходило на 18-е сутки эксперимента и составило 33,5% (табл. 1). Содержание лактата и пирувата уменьшилось на 6-е сутки наблюдений, в сравнении с контролем различия составляли 35,3 и 74,6% ($p<0,001$) соответственно.

Таблица 2. **Содержание белка, аминокислот и мочевины в тканях анадары в условиях экспериментального голодания**

Органы моллюска	n	Показатели		
		Белок, мкг мг$^{-1}$	Аминокислоты, мкг мг$^{-1}$	Мочевина, нмоль мг$^{-1}$
Гепатопанкреас				
Контроль	20	102,5±2,0	0,598±0,024	35,6±3,4
Голодание 6 суток	10	143,5±12,5	0,285±0,020	28,4±2,3
Голодание 18 суток	8	142,7±9,8	0,353±0,065	26,1±4,0
Жабры				
Контроль	20	59,5±2,0	0,378±0,014	7,81±1,12
Голодание 6 суток	10	46,9±4,0	0,193±0,013	11,8±4,15
Голодание 18 суток	8	47,2±2,8	0,199±0,026	10,3±2,89
Нога				
Контроль	20	31,9±1,0	0,102±0,003	2,65±0,43
Голодание 6 суток	10	38,7±1,2	0,068±0,003	2,68±0,24
Голодание 18 суток	8	42,3±0,4	0,089±0,007	2,66±0,47

Примечание: n – число особей

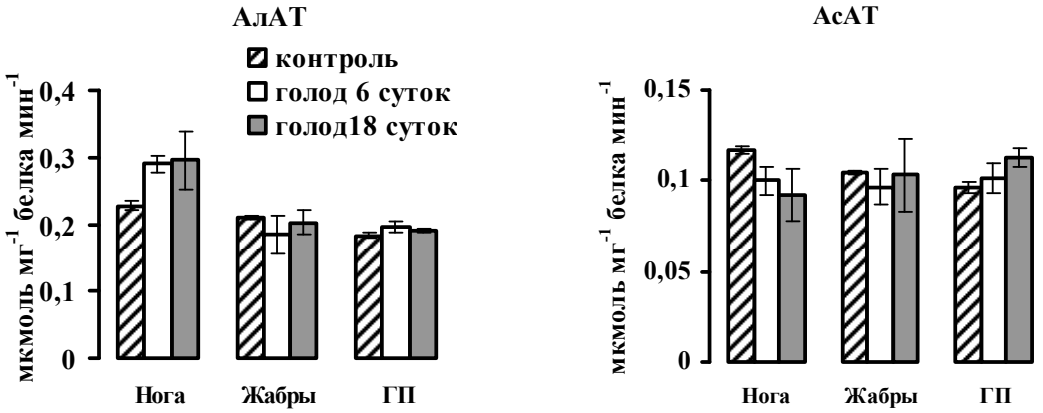

Рис. 1. **Активности аминотрансфераз (АсАТ, АлАТ) в тканях анадары в условиях экспериментального голодания**

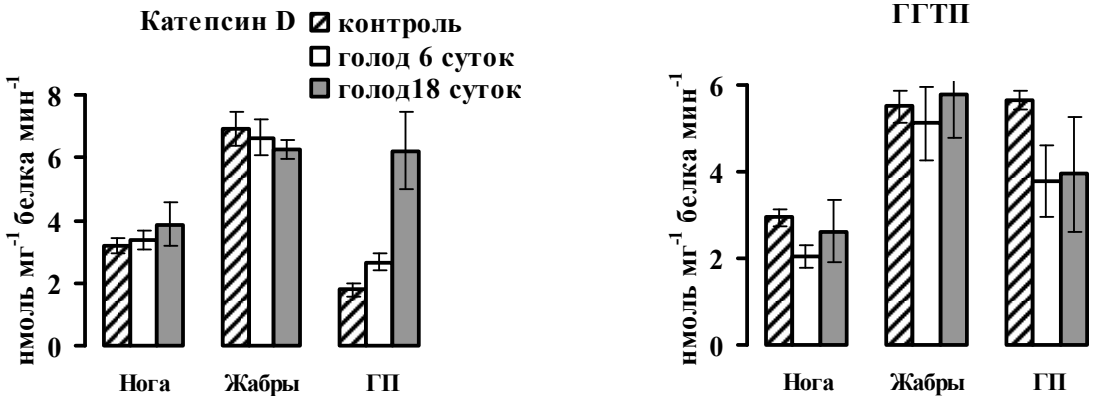

Рис. 2. **Активности катепсина D и ГГТП в тканях анадары в условиях экспериментального голодания**

Количество белка в ходе экспериментального голодания в тканях ноги анадары увеличивалось на 32,6% ($p<0,001$), что совпадало с данными, полученными для гепатопанкреаса (табл. 2). Содержание же аминного азота при этом понижалось на 33,4% ($p<0,001$), а мочевины не изменялось, оставаясь на уровне исходных величин. Изменение активностей АлАТ и АсАТ в течение опыта не совпадало (рис. 1). Активность АлАТ повышалась на 27,3% ($p<0,001$), а АсАТ, напротив, понижалась на 14,5% ($p<0,05$). Эти изменения отмечались уже на 6-е сутки эксперимента и наблюдались на фоне подавления активности γ-ГТП (рис. 2). В сравнении с исходным состоянием моллюска на 6-е сутки голодания активность γ-ГТП была на 27,6% ($p<0,05$) ниже. К концу эксперимента она оказалась близкой к исходному состоянию. В отличие от гепатопанкреаса активность катепсина D в тканях ноги анадары не изменялась на протяжении опыта (рис. 2).

Обсуждение

Результаты настоящего исследования показали, что в условиях голодания реорганизация углеводного метаболизма во всех тканях анадары протекала однонаправлено. Наблюдалось снижение содержания глюкозы и лактата при одновременном росте или отсутствии изменений уровня пирувата. Отмеченные изменения развивались на 18-е сутки эксперимента, в течение первых 6-ти суток они не были выражены.

Снижение содержания лактата во всех исследуемых тканях позволяет предположить, что организм моллюска в условиях голодания покрывал дефицит питательных субстратов за счет тканевого ресурса данного соединения. Известно, что анадара в сравнении с другими видами двустворок отличается повышенным содержанием тканевого лактата (Солдатов, Андреенко, Головина, 2008). Это позволяет моллюскам в отсутствии пищи продолжительный период времени не использовать организменный и тканевой ресурсы углеводов. Об этом свидетельствует то, что уменьшение содержания глюкозы в тканях анадары отмечалось только на 18 сутки эксперимента и не превышало 40%.

Влияние голодания на белковый метаболизм, в отличие от углеводного, привело к неоднозначным изменениям в тканях анадары.

Особый интерес вызвал рост содержания белка в тканях ноги и гепатопанкреаса моллюсков в условиях экспериментального голодания. В ряде работ также отмечается увеличение белковых ресурсов в тканях гидробионтов, но только на начальных этапах голодания (Frolov, Pankov, 1992; Qian, Chen, Sun, 2002). Это совпадает с нашими результатами. У анадары повышение содержания белка в тканях происходило в течение первых 6-ти суток эксперимента и в дальнейшем изменения не были выражены.

Необходимо отметить, что опубликованные материалы не дают однозначного объяснения причин роста содержания белка в тканях в условиях голодания. Известно, что стресс-синдром является первой стадией адаптации организма к экстремальным воздействиям, в том числе к отсутствию пищи (Меерсон, 1981). В ответ на действие стрессорных факторов концентрация в плазме некоторых белков, которые еще называют белками острой фазы, увеличивается и, следовательно, их синтез является составной частью метаболического ответа на стресс (Меерсон, 1981). Так, некоторые авторы отмечают увеличение количества эритроцитов и содержания гемоглобина в начальный период голодания гидробионтов (Borah, Yadav, 1996). Вероятно,

депривация пищи и приводила к развитию подобных процессов в тканях моллюсков, но они реализовались не на всех уровнях. Как уже отмечалось, в жабрах анадары содержание белка несколько понижалось.

Процесс адаптации моллюска к голоданию, по-видимому, шел и по пути активного использования аминокислот, как потенциального источника энергии. Содержание аминного азота во всех исследованных органах понижалось. При этом уровень мочевины в тканях не изменялся, а в некоторых случаях уменьшался (гепатопанкреас). Это означает, что снижение тканевого пула аминокислот не было связано с процессами дезаминирования. Использование аминокислот, как источника энергии тканями анадары, в условиях голодания происходит, по-видимому, в направлении фумаратредуктазной и сукцинат-тиокиназной реакций, которые позволяют дополнительно получать гликолитические метаболиты. Об этом свидетельствует рост активностей АлАТ и АсАТ на фоне снижения активностей γ-ГТП в ряде тканей. Донором аминокислот, вероятно, выступает гепатопанкреас, так как только в этом органе отмечался существенный рост активности катепсина D. Известно, что аминокислоты могут быть использованы в углеводном обмене, а также при синтезе протеинов острой фазы. Такой механизм рассматривается в работе ряда авторов (Okuma, Watanabe, Abe, 1998).

Выводы

1. На начальных этапах голодания (6 суток) анадара покрывает дефицит питательных веществ за счет ресурсов тканевого лактата. Об этом свидетельствует снижения содержания лактата во всех тканях моллюска на 30–35%.

2. Процесс адаптации анадары к голоданию на начальных этапах (6 суток) идет по пути использования резерва аминокислот в процессах биосинтеза белка. Это отражает уменьшение количества аминного азота на 33–41% во всех исследованных тканях и рост содержания белка на 33–40% в ноге и гепатопанкреасе при отсутствии выраженных изменений концентрации мочевины в органах моллюска.

3. В условиях более длительного голодания (на 18-е сутки) аминокислоты (аспартат и аланин) использованюются, вероятно, в качестве энергетических субстратов. Об этом свидетельствует рост активности АлАТ и АсАТ в ряде тканей. Это позволяет поддерживать процессы аэробного гликолиза. Донором аминокислот выступает гепатопанкреас, именно в его тканях отмечается значительный рост активности катепсина D – в 3–5 раз.

Литература

Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 501 с.

Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. – М.: Наука, 1981. – 278 с.

Солдатов А. А., Андреенко Т. И., Головина И. В. Особенности организации тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца Anadara inaequivalvis Bruguiere // Доп. НАН України. – 2008. – N 4. – С. 161–165.

Borah S., Yadav R.N.S. Biochemical and hematological responses to starvation in an air breathing fresh water teleost Heteropneustes fossilis (Bloch) // Indian J. Fish. – 1996. – 43, № 3. – P. 307–311.

Bowen K.L., Johansson O.E., Smith R., Schlechtriem C., Arts M.T. RNA/DNA and protein Indices in Evaluating Growth and Condition of Aquatic Organisms: A Review // Ann. Conf. Great Lakes Res. – 2005. – 48. – P. 34–39.

Carefoot T.H., Qian P-Y., Taylor B.E., West T.G., Osborne J. Effect of starvation on blood-glucose and tissue-glycogen levels in the northern abalone Haliotis kamtschatkana // J. Shellfish Res. – 1992. – 11, № 2. – P. 551.

Comoglio L. I., Gaxiola G., Roque A., Cuzon G., Amin O. The effect of starvation on refeeding, digestive enzyme activity, oxygen consumption, and ammonia excretion in juvenile white shrimp Litopenaeus vannamei // J. Shellfish Res. – 2004. – 23, № 1. – P. 243–249.

Frolov A.V., Pankov S. L. The effect of starvation on the biochemical composition of the rotifer Brachionus plicatilis // J. Mar. Biol. Assocc. U.K. – 1992. – 72, N 2. – P. 343–356.

Gao L., Chen L., Zhao X. Zhuang P. Starvation and compensatory growth of Acipenser schrenckii juveniles – effects on digestive organs structure and digestive enzymes activity // J. Fish. Sci. China. – 2004. – 11, № 5. – P. 413–419.

Guderley H., Lapointe D., Bedard M., Dutil J-D. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, Gadus morhua L. // Comp. Biochem. Physiol., – 2003. – 135A, № 2. – P. 347–356.

Hall J.R., Short C.E, Driedzic W. R. Sequence of Atlantic cod (Gadus morhua) GLUT4, GLUT2 and GPDH: developmental stage expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose // J. Exp. Biol. – 2006. – 209, № 22. – P. 4490–4502.

Okuma E., Watanabe K., Abe H. Distribution of free D-amino acids in bivalve mollusks and the effects of physiological conditions on the levels of D- and L-alanine in the tissues of the hard clam, Meretrix lusoria // Fish. Sci. – 1998. – 64, N 4. – P. 606–611.

Qian Y., Chen H., Sun J. Effects of starvation on the hematological and blood biochemical indices in cultured Lateolabrax japonicus // J. Fish. Sci. China. – 2002. – 9, № 2. – P. 133–137.

Sanchez-Paz A., Garcia-Carreno F., Hernandez-Lopez J., Muhlia-Almazan A., Yepiz-Plascencia G. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 2007. – 340, № 2. – P. 184–193.

Santini G., Bianchi T., Chelazzi G. Metabolic responses to food deprivation in two limpets with different foraging regimes, revealed by recording of cardiac activity // J. Zool. – 2002. – 256, № 1. – P. 11–15.

Shoemaker C.A., Klesius P.H., Lim C., Yildirim M. Feed deprivation of channel catfish, Ictalurus punctatus (Rafinesque), influences organosomatic indices, chemical composition and susceptibility to Flavobacterium columnare // J. Fish Dis. – 2003. – 26, № 9. – P. 553–561.

Thor P. Elevated respiration rates of the neritic copepod Acartia tonsa during recovery from Starvation // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 2003. – 283, № 1–2. – P. 133–143.

Wen X., Ku Y., Zhou K. Starvation on changes in growth and fatty acid composition of juvenile red swamp crawfish, Procambarus clarkii // Chin. J. Oceanol. Limnol. – 2007. – 25, № 1. – P. 97–105.

Wu L., Liu Yu., Wang X., Deng H. The effects of starvation and refeeding on metabolism in shrimp (Marspenaeus japonicus) // J. Dalian Fish. Univ. – 2007. – 22, № 2. – P. 109–112.

ASPECTS OF ADAPTABLE STRATEGY OF THE MOLLUSK-INVADER *ANADARA INAEQUIVALVIS* (BRUGÙIERE, 1789) UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL STARVATION

T.I. Andreenko

Sevastopol national technical university, Sevastopol, Ukraine
e-mail: tatyana-andreenk@mail.ru

The effect of starvation on the orientation of metabolic processes in mollusk- invader *Anadara inaequivalvis* (Black sea) was investigated under experimental conditions. The experiment lasted up to 18 days. It was shown that during initial stages of starvation (6 day) *Anadara inaequivalvis* used a resource of tissue lactate in direction of oxidative decarboxylation reactions. The process of *Anadara inaequivalvis* adaptation to starvation involves using the amino acids reserves during tissue biosynthesis. Using of amino acids as an energy source for tissue during starvation occurs in the from fumarate reductase and succinate thiokinase reactions which allow to obtain additionally glycolytic metabolites. Hepatopancreas is found to be a donor of amino acids.