

## ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДНОЙ НАГРУЗКИ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА И АДЕНИЛАТНУЮ СИСТЕМУ ТКАНЕЙ МОЛЛЮСКА *Anadara kagoshimensis*

© 2022 г. А. А. Солдатов<sup>а</sup>, \*, И. В. Головина<sup>а</sup>, Е. Э. Колесникова<sup>а</sup>, И. В. Сысоева<sup>а</sup>, А. А. Сысоев<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского Российской академии наук, Севастополь, Россия

\*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.12.2021 г.

После доработки 04.02.2022 г.

Принята к публикации 27.04.2022 г.

В условиях экспериментальной  $H_2S$ -нагрузки (СН) изучали активность оксидоредуктаз и состоящие аденилатной системы тканей устойчивой к гипоксии/аноксии *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Использовали взрослых особей моллюска с высотой раковины 26–38 мм. Виды с высокой устойчивостью к гипоксии обычно отличаются повышенной  $H_2S$ -переносимостью сероводорода, однако высокий анаэробный потенциал не может служить единственным объяснением выживания в среде с повышенными концентрациями сульфидов. Контрольную группу моллюсков содержали в аквариуме с концентрацией кислорода 7.0–7.1 мг/л (нормоксия). Экспериментальную группу подвергли действию СН, создававшейся при растворении в воде донора  $H_2S$  сульфида натрия ( $Na_2S$ ) до финальной концентрации 6 мг  $S^{2-}$ /л; время экспозиции – 24 ч. После первых суток эксперимента уровень  $O_2$  в воде был 1.8 мг/л, сероводород отсутствовал. Часть моллюсков подвергали повторной сероводородной нагрузке (вторые сутки эксперимента), внесен  $Na_2S$  до финальной концентрации 9 мг  $S^{2-}$ /л; к концу вторых суток регистрировали 1.9 мг  $S^{2-}$ /л и следовую концентрацию  $O_2$  (0.03 мг/л). В первые сутки СН в тканях моллюсков сохранялась высокая активность малатдегидрогеназы (МДГ) на фоне значительного подавления активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и роста значений индекса МДГ/ЛДГ, что отражает усиление анаэробных процессов в тканях анадары при относительно высоких концентрациях  $O_2$  в воде (1.8 мг/л). После вторых суток СН активность оксидоредуктаз в тканях моллюсков не изменялась по сравнению с первыми сутками, однако на фоне относительного снижения [АТФ] сохранялась величина аденилатного энергетического заряда (АЭЗ). Удержание АЭЗ свидетельствовало о способности анадары существовать в условиях сероводородного заражения и острых форм гипоксии/аноксии.

**Ключевые слова:** моллюски, *Anadara kagoshimensis*, сероводород, малатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, аденилатная система, Черное море

**DOI:** 10.31857/S0320965222050230

### ВВЕДЕНИЕ

Образование сероводорода ( $H_2S$ ) в шельфовой зоне обычно носит не регулярный характер и в большинстве случаев сопровождается возникновением локальных зон со сниженным содержанием кислорода (гипоксией) (Заика и др., 2011), что является следствием отсутствия сквозной вертикальной конвекции и формирования локальных областей гниения мертвого органического вещества (Орехова, Коновалов, 2018). Выносу глубинных зараженных  $H_2S$  вод в прибрежную зону способствует наличие специфических вертикальных

течений (апвеллингов) (Орехова, Коновалов, 2018). Упомянутые выше явления в значительной мере распространены в пределах побережий Черного моря.

Бентосные организмы, обитающие в зонах совокупного действия острой гипоксии и сероводородного заражения, должны обладать повышенной устойчивостью к указанным факторам. К ним относится двустворчатый моллюск *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) (далее анадара). В экспериментах, выполненных на данном виде, отмечена устойчивость моллюска к гипоксии и аноксии (Isani et al., 1989; Soldatov et al., 2010; Головина, 2019), а также способность переносить присутствие  $H_2S$  (Miyamoto, Iwanaga, 2017; Nakano et al., 2017). Уровень потребления  $O_2$  анадарой не снижается даже при экстремально низкой

**Сокращения:** АЭЗ – аденилатный энергетический заряд; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; МДГ – малатдегидрогеназа; ПА – пул аденилатов; АТФ – трифосфат, АДФ – дифосфат, и АМФ – 5-моно-фосфат аденозина; СН – сероводородная нагрузка.

его концентрации в морской воде (<1.2% насыщения) (Cortesi et al., 1992).

К метаболическим аспектам устойчивости морских организмов к гипоксии следует отнести сопряжение реакции гликолиза с процессами белкового обмена. Показано, что при снижении уровня  $O_2$  в тканях повышается содержание не свойственных аэробному обмену соединений (аланина, сукцината) (Buck, 2000), усиливается продукция  $NH_4^+$  (Chew et al., 2005), растет активность аланин- и аспартат-аминотрансфераз (Soldatov et al., 2009), активизируются процессы переаминирования аминокислот (глутамата, аланина) (Hochachka, Somero, 2002), а дыхательная цепь митохондрий перестраивается на нескомпенсированный тип функционирования (Савина, 1992).

Природа устойчивости гидробионтов к сероводородному загрязнению не вполне ясна. В ряде работ отмечают симбионтные отношения моллюсков с сульфидоокисляющими бактериями (Stewart, Cavanaugh, 2006), также фиксируют наличие в гемолимфе особого  $O_2$ -транспортного белка и нескольких нечувствительных к  $H_2S$  разновидностей гемоглобина (Arg, Childress, 1981, 1983). Особое внимание уделяется присутствию в эритроидных элементах крови зернистых включений, содержащих гематин, которые позволяют моллюскам нейтрализовать повышенные концентрации сульфидов (Vismann, 1993). Участие зернистых включений эритроцитов в нейтрализации  $H_2S$  показана для анадары (Soldatov et al., 2018). Вместе с тем, несмотря на отдельные исследования, метаболические аспекты адаптации гидробионтов к повышенным концентрациям сульфидов до настоящего времени освещены недостаточно.

Устойчивость гидробионтов в значительной мере зависит от способности поддерживать баланс между интенсивностью энергетического обмена и запросом на макроэргические соединения (Hochachka, Somero, 2002). Реакции гликолиза, которые обеспечивают ферменты малатдегидрогеназа (L-малат: НАД-оксидоредуктаза; МДГ, 1.1.1.37) и лактатдегидрогеназа (лактат: НАД-оксидоредуктаза; ЛДГ, 1.1.1.27), – неотъемлемая часть механизмов адаптации, а также важная система для проведения исследований (Somero, 2010; Bishop, Piffe, 2012). Центральное место в энергообмене клеток всех типов принадлежит аденилатной системе, включающей АТФ, АДФ и АМФ. Для оценки энергетического состояния клеток используют показатель АЭЗ, отражающий интенсивность физиологических процессов.

Цель работы – исследовать в условиях эксперимента активность оксидоредуктаз и аденилатный статус тканей анадары при сероводородной нагрузке.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на взрослых особях анадары, собранных в июне 2021 г. в акватории бухты Ласпи (44°25' с.ш., 33°42' в.д.). Высота раковины моллюсков от замка до края створки была 26–38 мм.

**Схема эксперимента.** Контрольную группу моллюсков (7 особей) содержали в аквариуме с концентрацией кислорода 7.0–7.1 мг/л (нормоксия). Экспериментальную группу (14 особей) подвергали действию сероводородной нагрузки. В воде, где находились моллюски, растворяли использовавшегося в качестве донора  $H_2S$  сульфид натрия ( $Na_2S$ ) до финальной концентрации 6 мг  $S^{2-}$ /л. Экспозиция – 24 ч (первые сутки эксперимента). В результате гидролиза  $Na_2S$  образуется гидроксид-ион ( $OH^-$ ), который дает щелочную реакцию ( $2Na^+ + S^{2-} + H_2O \rightarrow Na^+ + HS^- + Na^+ + OH^-$ ). Поскольку образование в воде  $OH^-$  приводило к ее защелачиванию, сдвиг кислотно-щелочного баланса водной среды устраняли внесением 0.1 н HCl, удерживая значения pH в пределах 8.20–8.27. Образующийся при гидролизе  $Na_2S$   $H_2S$  частично эвапорирует из раствора и окисляется при взаимодействии с  $O_2$  до  $SO_2$  (при недостатке  $O_2$  до S), что с течением времени сопровождается понижением содержания обоих газов в воде аквариума. Спустя 24 ч уровень кислорода в воде был 1.8 мг/л, а следов сероводорода обнаружено не было. У части моллюсков (7 особей) образцы тканей отбирали через 24 ч экспозиции. Оставшихся 7 особей подвергали повторной сероводородной нагрузке. В воду аквариума дополнительно вносили навеску  $Na_2S$  до финальной концентрации 9 мг  $S^{2-}$ /л. Спустя 24 ч (вторые сутки эксперимента) в воде аквариума обнаруживали следы кислорода (0.03 мг/л), уровень сульфидов был 1.9 мг  $S^{2-}$ /л. У моллюсков этой группы также брали образцы тканей для анализа.

Содержание кислорода в воде контролировали при помощи оксиметра DO Meter ST300D RU (Ohaus, США). Значения pH измеряли на pH-метре InoLab pH 720 (Германия). Величину сульфид-иона в воде определяли потенциометрически с применением сульфидселективного сенсора “MSBS” (Нидерланды).

**Биохимические исследования.** Препарирование тканей (ноги, жабр, гепатопанкреаса), гомогенизацию и центрифугирование проводили при охлаждении ( $0 \pm 4^\circ C$ ). Образцы тканей хранили при температуре  $-80^\circ C$  в морозильной камере (Farma 900 Series, TermoScientific, USA). Активность цитоплазматической МДГ и ЛДГ измеряли спектрофотометрически при длине волны 340 нм по скорости окисления восстановленной формы кофермента НАДН, используя в качестве среды выделения 0.2M Трис-HCl буфер, pH 7.5 (по: Kolesnikova, Golovina, 2020). Субстратом для

определения активности ЛДГ служил пируват, для МДГ – оксалоацетат. Активность МДГ и ЛДГ определяли при температуре инкубации реакционной смеси 25°C в трех повторностях для каждой ткани. Удельную активность ферментов выражали в мкмоль НАДН/(мин мг белка супернатанта). Содержание белка определяли микробиуретовым методом, экстинкцию измеряли при длине волны 330 нм.

Содержание адениловых нуклеотидов регистрировали хемилюминисцентным методом (Holm-Hansen, Booth, 1966), проводя две повторности измерений. Результаты выражали в мкмоль/г сырой массы ткани. Исследуемые ткани гомогенизировали в 0.1М Трис-ацетатном буфере, рН 7.75, на холоде. Аденилатный комплекс экстрагировали в кипящем буфере на водяной бане в течение 5 мин. Полученные экстракты замораживали до дальнейшего анализа. Определение АТФ проводили по стандартной методике, по световой эмиссии с добавлением люциферин-люциферазы на приборе АТР-Luminometer 1250 (ЛКВ, Швеция). АДФ и АМФ восстанавливали до АТФ с применением энзимов пируваткиназы и аденилаткиназы. На основании полученных значений рассчитывали АЭЗ (Atkinson, 1968). Средняя масса навески ткани ноги была 47 мг, жабр – 42 мг, гепатопанкреаса – 26 мг.

Результаты соответствующих повторностей усредняли, затем рассчитывали средние величины и показатели вариации. Полученные данные представлены как  $M \pm m$ . Нормальность распределения проверяли при помощи критерия Пирсона. Для сравнения использовали двусторонний *t*-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при  $p < 0.05$ ; рассчитывали линейный коэффициент корреляции ( $r$ ). Статистическую обработку и графическое оформление полученной информации проводили при помощи стандартного пакета Microsoft Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Активность оксидоредуктаз.** Максимальную активность МДГ регистрировали в ноге моллюска (контрольная группа) –  $0.575 \pm 0.067$  мкмоль НАДН/(мин мг белка), что на 34–35% ( $p < 0.05$ ) превышало активность фермента в жабрах и гепатопанкреасе (рис. 1а). Сероводородная нагрузка вызвала значительный рост активности МДГ в ноге в первые сутки эксперимента:  $0.974 \pm 0.180$  мкмоль НАДН/(мин мг белка). Различия достигали ~70% ( $p < 0.05$ ). На вторые сутки активность фермента возвращалась к контрольным величинам. В жабрах и гепатопанкреасе значительных изменений активности МДГ не происходило.

Максимальную активность ЛДГ отмечали в жабрах контрольной группы моллюсков:  $0.040$ –

$0.047$  мкмоль НАДН/(мин мг белка) (рис. 1б). В ноге активность была минимальна –  $0.025 \pm 0.003$  мкмоль НАДН/(мин мг белка) (на 89% ниже, чем в жабрах,  $p < 0.05$ ). На сероводородную нагрузку все ткани отреагировали значительным снижением активности ЛДГ. Минимальная активность фермента зарегистрирована в тканях на вторые сутки эксперимента. По сравнению с контрольными величинами различия были в 1.9–5.7 раза ( $p < 0.05$ ).

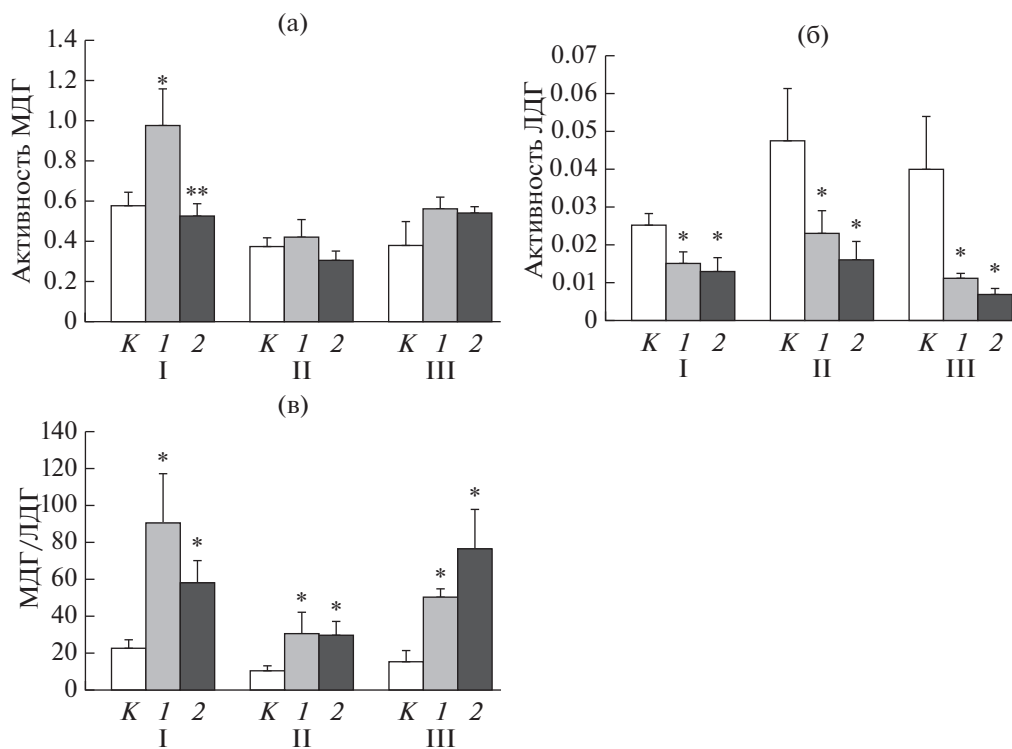
В исследованных тканях в условиях сероводородной нагрузки отмечено существенное увеличение индекса МДГ/ЛДГ (рис. 1в) – относительно контроля в 2.5–4.9 раза ( $p < 0.01$ ). Изменение величины индекса МДГ/ЛДГ, в основном, обусловлено снижением активности ЛДГ в тканях. Коэффициент корреляции ( $r$ ) между активностью ЛДГ и величиной индекса МДГ/ЛДГ в ноге (от  $-0.70$  до  $-0.86$ ) и жабрах (от  $-0.70$  до  $-0.80$ ) имел отрицательное значение в контроле и опытах ( $p < 0.05$ ).

При сероводородной нагрузке в системе МДГ–ЛДГ значительно возрос линейный коэффициент корреляции в гепатопанкреасе ( $r = 0.74$ ,  $p < 0.05$ , первые сутки;  $r = 0.84$ ,  $p < 0.05$ , вторые сутки) и ноге ( $r = 0.94$ ,  $p < 0.05$ , вторые сутки). В тканях контрольных особей корреляция между активностью МДГ и ЛДГ была незначительная.

**Аденилатная система.** Максимальный пул ПА отмечен в тканях ноги моллюска –  $13.44 \pm 0.12$  мкмоль/г сырой массы (табл. 1). В остальных тканях он был на 43–44% ниже ( $p < 0.01$ ). Данное отличие распространялось на все составляющие аденилатного комплекса (АТФ, АДФ, АМФ). Величина АЭЗ совпадала во всех тканях и находилась на уровне 0.53–0.56.

Сероводородная нагрузка снижала ПА во всех исследованных тканях. В первые сутки эксперимента его значения понижались на 13–14% ( $p < 0.01$ ). В большей степени изменения затрагивали концентрацию АТФ – [АТФ]. Ресурс данного соединения уменьшался на 24–29% ( $p < 0.05$ ). Содержание АДФ также понижалось: на 15% в гепатопанкреасе, 23% в ноге и 32% в жабрах ( $p < 0.05$ ). В отношении АМФ результаты были противоположны. Содержание этой фракции было выше на 16–25% ( $p < 0.05$ ). АЭЗ в ткани ноги моллюска сохранялся на уровне контрольных значений – 0.52. В жабрах и гепатопанкреасе отмечали снижение этого показателя на 14–17% ( $p < 0.05$ ).

На вторые сутки эксперимента принципиальных изменений не наблюдали. Почти все контролируемые показатели оставались на уровне, отмеченном в первые сутки. Исключение касалось [АТФ], которая продолжала снижаться. По сравнению с первыми сутками снижение [АТФ] во вторые сутки было на 5–6% для тканей ноги и жабр и носило, скорее всего, характер тенденции,



**Рис. 1.** Активность МДГ (а), ЛДГ (б) (мкмоль НАДН/(мин мг белка)) и индекс МДГ/ЛДГ (в) в тканях *Anadara kagoshimensis* в условиях сероводородной нагрузки. I – нога, II – жабры, III – гепатопанкреас. Условия опыта: K – контроль, I – первые сутки эксперимента, 2 – вторые сутки эксперимента; \* – достоверно по сравнению с контролем,  $p < 0.05$ , \*\* – достоверно по сравнению с другим опытом,  $p < 0.05$ .

для гепатопанкреаса падение значений этого показателя достигало 16% ( $p < 0.05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из представленных результатов следует, что сероводородная нагрузка сопровождалась значительным снижением концентрации кислорода в воде аквариума. Причем, двукратное внесение навесок  $\text{Na}_2\text{S}$  в течение двух суток эксперимента приводило к определенным изменениям в водной среде: после первых суток в воде аквариумов развивалась умеренная гипоксия (1.8 мг  $\text{O}_2/\text{л}$ ), сероводород не определялся; на вторые сутки формировалась устойчивая аноксия с сохранением сероводородного заражения (1.9 мг  $\text{S}^{2-}/\text{л}$ ).

Основные изменения активности ферментов энергетического обмена под действием  $\text{H}_2\text{S}$  отмечали после первых суток эксперимента, что выражалось в значительном понижении активности ЛДГ при сохранении активности МДГ на уровне контрольных величин в большинстве тканей. Ранее подобную реакцию отмечали у анадары в условиях аноксии (Soldatov et al., 2009), подразумевающей полное прекращение функционирования дыхательной цепи митохондрий. В настоящем исследовании сходная совокупность метабо-

лических процессов развивалась под действием  $\text{H}_2\text{S}$ -нагрузки и при наличии относительно высоких концентраций кислорода (1.8 мг/л), хотя анадара способна поддерживать окислительный метаболизм при критической степени гипоксии ( $< 0.5$  мг  $\text{O}_2/\text{л}$ ) (Cortesi et al., 1992). Принято считать, что состояние кислородного голодания развивается у гидробионтов при содержании кислорода  $< 2$  мг/л (Rosenberg et al., 2001). Очевидно, развитие пограничного с аноксией состояния ограниченной доступности кислорода (1.8 мг  $\text{O}_2/\text{л}$ ) анадары следует рассматривать как следствие токсического воздействия сульфидов. Известно, что основной токсический эффект сероводорода проявляется в результате связывания с цитохром-*c*-оксидазой, что ограничивает ее взаимодействие с кислородом (Cao et al., 2011) и фактически блокирует клеточное дыхание, останавливая функционирование дыхательной цепи митохондрий (гистотоксическая гипоксия). Кроме того, ситуация может усугубляться и при взаимодействии  $\text{H}_2\text{S}$  с элементами механизма детоксикации сульфидов у двустворчатых моллюсков и других морских беспозвоночных. Эти комплексные соединения (гематины) жаберной ткани (Powell, Agr, 1989; Kraus, 1995) связывают  $\text{H}_2\text{S}$  с двумя разновидностями гемоглобина, обнаруженными

**Таблица 1.** Аденилатная система тканей анадары в условиях сероводородной нагрузки

Компонент аденилатного комплекса	Содержание в ткани, мкмоль/г сырой массы		
	нога	жабры	гепатопанкреас
<b>ПА</b>			
Контроль	13.44 ± 0.12	7.53 ± 0.30	7.59 ± 0.19
1-е сут	11.54 ± 0.15	6.55 ± 0.06	6.77 ± 0.03
2-е сут	11.37 ± 0.02	6.26 ± 0.12	6.66 ± 0.02
<b>АТФ</b>			
Контроль	5.45 ± 0.31	2.74 ± 0.04	2.94 ± 0.20
1-е сут	4.15 ± 0.04	2.07 ± 0.03	2.08 ± 0.04
2-е сут	3.93 ± 0.03	1.94 ± 0.06	1.75 ± 0.06
<b>АДФ</b>			
Контроль	4.86 ± 0.10	2.63 ± 0.22	2.65 ± 0.06
1-е сут	3.75 ± 0.26	1.78 ± 0.05	2.26 ± 0.04
2-е сут	3.73 ± 0.11	2.05 ± 0.05	2.18 ± 0.03
<b>АМФ</b>			
Контроль	3.13 ± 0.08	2.16 ± 0.15	1.99 ± 0.11
1-е сут	3.64 ± 0.05	2.70 ± 0.10	2.44 ± 0.07
2-е сут	3.72 ± 0.10	2.27 ± 0.14	2.72 ± 0.07
<b>Величина АЭЗ</b>			
Контроль	0.53 ± 0.03	0.53 ± 0.07	0.56 ± 0.03
1-е сут	0.52 ± 0.02	0.45 ± 0.05	0.47 ± 0.08
2-е сут	0.51 ± 0.04	0.47 ± 0.01	0.44 ± 0.01

Примечание. ПА – пул аденилатов; АТФ – трифосфат аденозина; АДФ – дифосфат аденозина; АМФ – 5-моно-фосфат аденозина; АЭЗ – аденилатный энергетический заряд. Контрольная группа  $n = 7$  особей; экспериментальная группа 14 особей (по 7 на каждой стадии эксперимента).

в гемолимфе анадары (Doeller et al., 1988), что приводит к развитию прогрессирующей гипоксемии. По нашему мнению, сероводородная нагрузка определяет сочетаемость/сопряженность своих прямых токсических эффектов с фактором гипоксии в водной среде, а также с развитием кислородного голодания различного генеза на уровне отдельно взятого организма гидробионта. По-видимому, с учетом вышеупомянутых фактов 48-часовая сероводородная нагрузка в нашем эксперименте с анадарой уже не имела дополнительного влияния на проявившиеся после 24 ч экспозиции изменения процессов энергетического обмена.

Можно предположить, что фактор гипоксии/аноксии, развивающейся при сероводородной нагрузке под воздействием сульфидов, играет определяющую роль в формировании метаболической реакции анадары и переходе энергетического обмена моллюска на анаэробный путь. Двусторчатые моллюски признаны одной из наиболее устойчивых к гипоксии и аноксии групп организмов, для которых характерна наиболее высокая ферментативная активность гликолитических энзимов – прежде всего, фосфофруктокиназы, пируваткиназы и МДГ (Hand, Somero,

1983). Вместе с тем, у моллюсков отмечена крайне низкая активность ЛДГ, поскольку именно МДГ, осуществляющей двойственную функцию, отводится ведущая роль в реакциях гликолитического окислительно-восстановительного баланса при анаэробном метаболизме (Hand, Somero, 1983). Считают (Yusseppone et al., 2018), что при аноксии индукция активности МДГ и накопление сукцината служат значимыми признаками активации анаэробных митохондриальных путей для поддержания выживаемости моллюсков

Подавление активности ЛДГ в условиях острой гипоксии и аноксии у моллюсков имеет особое адаптивное значение. Подобная реакция отмечена в ряде работ (Larade, Storey, 2002a; Washizu et al., 2002), в том числе для анадары (Soldatov et al., 2009; Головина, 2019). Следует отметить, что снижение активности ЛДГ при дефиците  $O_2$  служит своего рода отражением принципиальной реорганизации тканевого метаболизма, которое исключает накопление токсических продуктов в виде лактата в тканях моллюска. Претворение появления лактата осуществляется еще на стадии образования пирувата, когда под действием аланинаминотрансферазы и при участии глутамата синтезируются аланин и  $\alpha$ -кетоглута-

рат. В свою очередь  $\alpha$ -кетоглутарат доводится ферментами цикла Кребса до сукцината, что позволяет получать дополнительный ресурс макроэргов (ГТФ).

Кроме образующегося из  $\alpha$ -кетоглутарата глутамата его резерв может возникать при трансформации *D*-аспартата. Отмечено, что раковины представителей рода *Anadara* содержат значительный резерв *D*-аспартата (Larade, Storey, 2002b; Watanabe, 2005). Реакция его трансформации в глутамат катализируется аспартатаминотрансферазой. Образующийся оксалоацетат восстанавливается до малата, который посредством специального переносчика попадает в митохондрии и доводится до сукцината, что также позволяет осуществлять ресинтез АТФ. Впервые подобная последовательность событий рассмотрена в работе Оуэна и Хочачки (Owen, Hochachka, 1974). В пользу такой последовательности преобразований в условиях гипоксии свидетельствуют накопления в тканях моллюсков в качестве конечных продуктов сукцината и аланина (De Zwaan et al., 1991; Larade, Storey, 2002a). Кроме того, в ряде работ также отмечается протекторная роль сукцината в отношении мембран митохондрий (Bacchiocchi, Principato, 2000), противодействующего избыточной продукции активных форм кислорода в условиях гипоксии (Grivennikova, Vinogradov, 2013; Cadenas, 2018). Одновременно в рамках предлагаемой схемы находят свое место усиление процессов переаминирования аминокислот (глутамата, аланина) (Hochachka, Somero, 2002) и рост активности аланин- и аспартатаминотрансфераз, зарегистрированные в тканях анадары при аноксии (Soldatov et al., 2009). Следует отметить, что одним из ключевых субстратов, определяющих рассмотренную выше совокупность процессов, наряду с аминокислотами, является гликоген. Истощение его запасов существенно повышает вероятность гибели моллюсков в условиях сероводородного заражения (Miyamoto, Iwanaga, 2017).

Виды с высокой резистентностью к гипоксии обычно отличаются повышенной  $H_2S$ -переносимостью (Grieshaber, Völkel, 1998). Вместе с тем высокий анаэробный потенциал не может служить единственным объяснением длительного выживания в среде с повышенными концентрациями сульфидов (Völkel et al., 2001). Многие устойчивые к гипоксии виды обладают способностью к снижению скорости метаболизма, которое обеспечивается за счет обратимого фосфорилирования, активации или дезактивации ключевых регуляторных ферментов гликолиза, таких как гликогенфосфоорилаза, пируваткиназа (фосфоенолпируваткарбоксикиназа (ФЕПКК) (Yusseppone et al., 2018). К ингибирующим агентам можно отнести фруктозо-2,6-бисфосфат (аллостерический активатор фосфофруктокиназы), аланин (подавляет активность пируваткиназы). Повышение содер-

жания данных факторов способствует подавлению гликолитической активности тканей в целом (Oeschger, Storey, 1990).

Примечательная особенность митохондрий двустворчатых моллюсков – наличие альтернативной оксидазы (alternative oxidase, AOX) (van Hellemond et al., 2003). Нечувствительная к ингибированию сульфидами АОХ окисляет убихинол и восстанавливает  $O_2$  до воды и, следовательно, поддерживает транспорт электронов, когда цитохромоксидаза дыхательной цепи митохондрий ингибируется в присутствии сульфидов (Yusseppone et al., 2018). АОХ способна защищать “анаэробные” митохондрии от респираторного отравления сероводородом. В системе транспорта электронов (ETS) АОХ отклоняет электроны от классических сайтов фосфорилирования в комплексах III и IV (цитохромоксидаза) и восстанавливает кислород без перекачки протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану при «остановке» привычных путей метаболизма. Отмечено, что реакция АОХ носит гораздо более выраженный характер в жабрах по сравнению с тканью мантии (Yusseppone et al., 2018), поскольку жабры служат органом, через который  $H_2S$  попадет в организм животных и где его воздействие на цитохром-с-оксидазу будет максимальным. Более того, не имеющая заметных запасов гликогена жаберная ткань снижает потребность своих клеток в энергии (частоту биений ресничек), одновременно координируя отключение активности ETS и выработку АТФ для сохранения потенциала митохондриальной мембраны при низком уровне кислорода. Дополнительную защиту целостности митохондрий в периоды кислородного истощения обеспечивает и повышение экспрессии белка теплового шока HSP90 (Yusseppone et al., 2018).

Анализ состояния аденилатной системы анадары под действием  $H_2S$  показал отсутствие критических изменений энергетического статуса моллюска. Исходно АЭЗ контрольной группы моллюсков был 0.53–0.56 (в зависимости от изучаемой ткани), что по сравнению с высшими позвоночными может отражать умеренный уровень интенсивности физиологических процессов (Atkinson, 1968; Лукьянова, 2004) и высокую степень приспособления к постоянно сниженному содержанию  $O_2$  в придонных слоях водной среды при диапазоне глубин обитания анадары от 3 до 60 м (Sahin et al., 2019; Ревков, 2016). Следует отметить, что данная особенность характерна для анадары, которая в условиях нормоксии потребляет в 5–6 раз меньше кислорода, чем *Mytilus galloprovincialis* Lam (Soldatov et al., 2009). Двустворчатым моллюскам присуща низкая активность цитохромоксидазы по сравнению с другими видами животных (Hand, Somero, 1983), что также может

в значительной мере определять величину показателей энергетического статуса тканей моллюска.

В условиях сероводородной нагрузки и сопутствующей острой гипоксии АЭЗ анадары несколько понижался в жабрах и гепатопанкреасе (в тканях, принимавших участие в связывании/детоксикации сульфидов), однако в тканях ноги АЭЗ не претерпевал существенных изменений, что в целом отражает высокую степень толерантности данного вида к указанным условиям среды. Аналогичное наблюдаемому у анадары снижение ресурса АТФ при воздействии сероводорода отмечено в условиях гипоксии у *Mytilus edulis* L. (Wijisman, 1976) и *Lima hians* (Gmelin, 1791) (Gäde, 1983), что может свидетельствовать о подобии биохимических проявлений при повышении концентрации сульфидов и кислородном голодании.

**Выводы.** При сероводородной нагрузке в тканях анадары сохранялась высокая активность МДГ на фоне значительного подавления активности ЛДГ и роста значений индекса МДГ/ЛДГ, что отражает усиление анаэробных процессов в тканевых структурах данного вида при относительно высоких концентрациях кислорода в воде (1.8 мг/л), рассматриваемое как следствие токсического влияния  $H_2S$  на дыхательную цепь митохондрий. На вторые сутки эксперимента заметных изменений активности оксидоредуктаз не наблюдали. Одновременно уровень аденилатов в тканях несколько понижался, но уровень АЭЗ не претерпевал критических изменений, что свидетельствует о способности моллюска существовать в условиях сероводородной нагрузки и острых форм гипоксии.

Результаты исследования позволяют поддерживать положение, что средовое действие  $H_2S$  аналогично эффекту аноксии по своим последствиям для энергетического метаболизма гидробионтов (Oeschger, Storey, 1990). Очевидно, сероводородная нагрузка *per se* служит источником развития гипоксии/аноксии различного генеза (средовой/гипоксической гипоксии, гемической, вследствие инактивации гемоглобина, тканевой или гистотоксической), т.е. смешанной разновидности гипоксии у беспозвоночных животных. Основным эффектом от сероводородной нагрузки — это переход организма анадары к анаэробному гликолизу с вовлечением МДГ. Для анадары воздействие  $H_2S$  не имеет дополнительных или специфических эффектов на уровне гликолитических ферментов и энергетического статуса тканей по сравнению с гипоксией/аноксией. Вместе с тем, у любого гидробионта под действием сероводорода возможно более интенсивное угнетение отдельных ферментов, в частности сопровождающееся резким снижением уровня фруктозо-2,6-бисфосфата (аллостерический активатор фосфофруктокиназы) и ингибированием

пируваткиназы аланином, что способствует дальнейшему снижению активности фосфофруктокиназы и гликолитической активности в целом (Oeschger, Storey, 1990).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Госзадания (№ регистрации 121041400077-1) и проекта Российского фонда фундаментальных исследований № 20-04-00037.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Головина И.В. 2019. Устойчивость к негативным воздействиям и соотношение активности ферментов энергетического обмена в тканях черноморских моллюсков *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 и *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // Мор. биол. журн. Т. 4. № 3. С. 37.  
<https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.3.04>
- Заика В.Е., Коновалов С.К., Сергеева Н.Г. 2011. Локальные и сезонные явления гипоксии на дне севавтопольских бухт и их влияние на макробентос // Мор. экол. журн. Т. 10. № 3. С. 15.
- Лукьянова О.Н. 2004. АТФ-азы как неспецифические молекулярные биомаркеры состояния гидробионтов при антропогенном загрязнении // Биотехнология — охране окружающей среды. II Междунар. науч. конф.: Тез. докл. Москва: МГУ. С. 124.
- Орехова Н.А., Коновалов С.К. 2018. Кислород и сульфиды в донных отложениях прибрежных районов севавтопольского региона Крыма // Океанология. Т. 58. № 5. С. 739.  
<https://doi.org/10.1134/S0030157418050106>
- Ревков Н.К. 2016. Особенности колонизации Черного моря недавним вселенцем — двустворчатым моллюском *Anadara kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae) // Мор. биол. журн. Т. 1. № 2. С. 3.  
<https://doi.org/10.21072/mbj.2016.01.2.01>
- Савина М.В. 1992. Механизмы адаптации тканевого дыхания в эволюции позвоночных. Санкт-Петербург: Наука.
- Arp A.J., Childress J.J. 1981. Blood function in the hydrothermal vent vestimentiferan tube worm // Science. V. 213. P. 342.  
<https://doi.org/10.1126/science.213.4505.342>
- Arp A.J., Childress J.J. 1983. Sulfide binding by the blood of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* // Science. V. 219. P. 295.  
<https://doi.org/10.1126/science.219.4582.295>
- Atkinson D.E. 1968. The energy charge of the adenylate pools as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers // Biochemistry. V. 7. Is. 11. P. 4030.  
<https://doi.org/10.1021/bi00851a033>

- Bacchiocchi S., Principato G. 2000. Mitochondrial contribution to metabolic changes in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* during anaerobiosis // J. Exp. Zool. V. 286. P. 107.  
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(20000201\)286:2<107::aid-jez1>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(20000201)286:2<107::aid-jez1>3.0.co;2-8)
- Bishop R.E., Iliffe T.M. 2012. Ecological physiology of the anchialine shrimp *Barbouria cubensis*: a comparison of epigeal and hypogean populations // Marine Biodiversity. V. 42. Is. 3. P. 303.  
<https://doi.org/10.1007/s12526-012-0113-8>
- Buck L.T. 2000. Succinate and alanine as anaerobic end-products in the diving turtle *Chrysemys picta bellii* // Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. Biochem. Mol. Biology. V. 126. Is. 3. P. 409.  
[https://doi.org/10.1016/s0305-0491\(00\)00215-7](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(00)00215-7)
- Cadenas S. 2018. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. V. 1859. Is. 9. P. 940.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.05.019>
- Cao Y., Wang H.G., Cao Y.Y. et al. 2011. Inhibition effects of protein-conjugated amorphous zinc sulfide nanoparticles on tumor cells growth // Nanopar. Res. V. 13. P. 2759.  
<https://doi.org/10.1007/s11051-010-0163-4>
- Chew S.F., Gan J., Ip Y.K. 2005. Nitrogen metabolism and excretion in the swamp eel, *Monopterus albus*, during 6 or 40 days of estivation in mud // Physiol. Biochem. Zool. V. 78. № 4. P. 620.  
<https://doi.org/10.1086/430233>
- Cortesi P., Cattani O., Vitali G. 1992. Physiological and biochemical responses of the bivalve *Scapharca inaequivalvis* to hypoxia and cadmium exposure: erythrocytes versus other tissues // Marine coastal eutrophication. Proceedings of an Intern. Conf. Bologna, Italy, 21–24 March 1990. P. 1041.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-89990-3.50090-0>
- De Zwaan A., Cortesi P., Thillart G. et al. 1991. Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia-tolerant marine molluscs: A biochemical analysis // Mar. Biology. V. 111. Is. 3. P. 343.
- Doeller J.E., Kraus D.W., Colacino J.M., Wittenberg J.B. 1988. Gill Hemoglobin May Deliver Sulfide to Bacterial Symbionts of *Solemya velum* (Bivalvia, Mollusca) // Biol. Bull. V. 175. P. 388.
- Gäde G. 1983. Energy production during anoxia and recovery in the adductor muscle of the file shell, *Lima hians* // Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochem. Mol. Biology. V. 76. № 1. P. 73.  
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(83\)90173-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(83)90173-6)
- Grieshaber M.K., Völkel S. 1998. Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide // Annu. Rev. Physiol. V. 60. P. 33.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.33>
- Grivennikova V.G., Vinogradov A.D. 2013. Mitochondrial production of reactive oxygen species // Biochemistry (Moscow). V. 78. № 13. P. 1490.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297913130087>
- Hand S.C., Somero G.N. 1983. Energy metabolism pathways of hydrothermal vent animals: adaptations to a food-rich and sulfide-rich deep-sea environment // Biol. Bull. V. 165. P. 167.
- Hochachka P.W., Somero G.N. 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. New York: Oxford University Press.
- Holm-Hansen O., Booth C.R. 1966. The measurement of adenosine triphosphate in the Ocean and its ecological significance // Limnol., Oceanogr. V. 11. Is. 4. P. 510.  
<https://doi.org/10.4319/lo.1966.11.4.0510>
- Isani G., Cattani O., Tacconi S. 1989. Energy metabolism during anaerobiosis and recovery in the posterior adductor muscle of *Scapharca inaequivalvis* (Bruguère) // Comp. Biochem. Physiol. B. V. 93. P. 193.
- Kolesnikova E.E., Golovina I.V. 2020. Oxidoreductase Activities in Oxyphilic Tissues of the Black Sea Ruff *Scorpaena porcus* under Short-term Hydrogen Sulfide Loading // J. Evol. Biochem. Physiol. V. 56. Is. 5. P. 459.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093020050099>
- Kraus D.W. 1995. Heme Proteins in Sulfide-oxidizing Bacteria/Mollusc Symbioses // Amer. Zool. V. 35. P. 112.  
<https://doi.org/10.1093/icb/35.2.112>
- Larade K., Storey K.B. 2002a. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates // Cell and Molecular Responses to Stress. V. 3. Sensing, Signaling and Cell Adaptation. Amsterdam: Elsevier Science B.
- Larade K., Storey K.B. 2002b. Reversible suppression of protein synthesis in concert with polysome disaggregation during anoxia exposure in *Littorina littorea* // Mol. Cell. Biochem. V. 232. № 1–2. P. 121.  
<https://doi.org/10.1023/a:1014811017753>
- Miyamoto Y., Iwanaga C. 2017. Effects of sulphide on anoxia-driven mortality and anaerobic metabolism in the ark shell *Anadara kagoshimensis* // J. Mar. Biology. Assoc. UK. V. 97. Is. 2. P. 329.  
<https://doi.org/10.1017/S0025315416000412>
- Nakano T., Yamada K., Okamura K. 2017. Duration rather than frequency of hypoxia causes mass mortality in ark shells *Anadara kagoshimensis* // Mar. Pollut. Bull. V. 125. № 1–2. P. 86.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.073>
- Oeschger R., Storey K.B. 1990. Regulation of glycolytic enzymes in the marine invertebrate *Halicryptus spinulosus* (Priapulida) during environmental anoxia and exposure to hydrogen sulfide // Mar. Biology. V. 106. P. 261.
- Owen T.G., Hochachka P.W. 1974. Purification and properties of dolphin muscle aspartate and alanine transaminases and their possible roles in the energy metabolism of diving mammals // Biochem. J. V. 143. P. 541.  
<https://doi.org/10.1042/bj1430541>
- Powell M.A., Arp A.J. 1989. Hydrogen sulfide oxidation by abundant nonhemoglobin heme compounds in marine invertebrates from sulfide-rich habitats // J. Exp. Zool. V. 249. Is. 2. P. 121.  
<https://doi.org/10.1002/jez.1402490202>
- Rosenberg R., Nilsson H.C., Diaz R.J. 2001. Response of benthic fauna and changing sediment redox profiles over a hypoxic gradient // Estuarine, Coastal and Shelf Science. V. 53. P. 343.  
<https://doi.org/10.1006/ecss.2001.0810>
- Sahin C., Erbay M., Kalayci F. et al. 2019. Life-history traits of the Black Scorpionfish (*Scorpaena porcus*) in south-eastern Black Sea // Turk. J. Fish. Aquat. Sci. V. 19. № 7. P. 571–584.  
[https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19\\_7\\_04](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_7_04)



- Soldatov A.A., Andreenko T.I., Sysoeva I.V., Sysoev A.A. 2009. Tissue specificity of metabolism in the bivalve mollusc *Anadara inaequalis* Br. under conditions of experimental anoxia // J. Evol. Biochem. Physiol. V. 45. № 3. P. 349.  
https://doi.org/10.1134/S002209300903003X
- Soldatov A.A., Andreenko T.I., Golovina I.V., Stolbov A.Ya. 2010. Peculiarities of organization of tissue metabolism in mollusks with different tolerance to external hypoxia // J. Evol. Biochem. Physiol. V. 46. № 4. P. 341.  
https://doi.org/10.1134/S0022093010040022
- Soldatov A.A., Kukhareva T.A., Andreeva A.Y., Efreanova E.S. 2018. Erythroid Elements of Hemolymph in *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) under Conditions of the Combined Action of Hypoxia and Hydrogen Sulfide Contamination // Rus. J. Mar. Biology. V. 44. Is. 6. P. 452.  
https://doi.org/10.1134/S1063074018060111
- Somero G.N. 2010. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers' // J. Experimental Biology. Special is. 213. P. 912.  
https://doi.org/10.1242/jeb.037473
- Stewart F.J., Cavanaugh C.M. 2006. Bacterial endosymbioses in *Solemya* (Mollusca: Bivalvia) – model systems for studies of symbiont-host adaptation // Antonie van Leeuwenhoek. V. 90. P. 343.  
https://doi.org/10.1007/s10482-006-9086-6
- van Hellemond J.J., van der Klei A., van Weelden S. W., Tielens A.G. 2003. Biochemical and evolutionary aspects of anaerobically functioning mitochondria // Philos. Trans. R. Soc. Lond. Soc. B. 358, 205.  
https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1182
- Vismann B. 1993. Hematin and sulfide removal in hemolymph of the hemoglobin-containing bivalve *Scapharca inaequalis* // Mar. Ecol. Prog. Ser. V. 98. P. 115.
- Volkel S., Berenbrink M., Heisler N., Nikinmaa M. 2001. Effect of sulfide on K<sup>+</sup> flux pathways in red blood cells of crucian carp and rainbow trout // Fish Physiol. Biochem. V. 24. P. 213.  
https://doi.org/10.1023/A:1014050001585
- Washizu T., Nakamura M., Izawa N. et al. 2002. 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. V. 26. Is. 5. P. 341.  
https://doi.org/10.1023/a:1016278409138
- Watanabe T. 2005. Effects of hypoxic and osmotic stress on the free D-aspartate level in the muscle of blood shell *Scapharca broughtonii* // Amino Acids. V. 28. № 3. P. 291.  
https://doi.org/10.1007/s00726-005-0188-7
- Wijsman T.C.M. 1976. Adenosine phosphates and energy charge in different tissues of *Mytilus edulis* under aerobic and anaerobic conditions // J. Comp. Physiol. V. 107. № 1. P. 129.
- Yusseppone M.S., Rocchetta I., Sabatini S.E. et al. 2018. Inducing the Alternative Oxidase Forms Part of the Molecular Strategy of Anoxic Survival in Freshwater Bivalves // Front Physiol. V. 9. P. 100.  
https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00100

## Impact of Experimental Hydrogen Sulfide Loading on the Activity of Enzymes of Energy Metabolism and Adenylate System in Tissues of Clam *Anadara kagoshimensis*

A. A. Soldatov<sup>1</sup>, \*, I. V. Golovina<sup>1</sup>, E. E. Kolesnikova<sup>1</sup>, I. V. Sysoeva<sup>1</sup>, and A. A. Sysoev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia

\*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Hypoxia-tolerant species are usually characterized by increased hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) tolerance; however, a high anaerobic potential cannot serve as the only explanation for survival in an environment with increased sulfide concentrations. The activity of oxidoreductases, as well as parameters of adenylate system were studied in the tissues of hypoxia/anoxia-tolerant clam *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) under conditions of experimental H<sub>2</sub>S loading (HSL). This study was performed on adult specimens of clam with a shell height of 26–38 mm. The control group of clams was kept in the aquarium with oxygen concentration of 7.0–7.1 mg/L (normoxia). Experimental group was exposed to HSL created by dissolving of H<sub>2</sub>S donor, sodium sulfide (Na<sub>2</sub>S) in water to the final concentration 6 mg S<sup>2-</sup>/L; the time of exposure was 24 hours. At the fall of 1st day of the experiment, the O<sub>2</sub> level was 1.8 mg/L, and no H<sub>2</sub>S was detected. Some of the clams were subjected to repeated HSL (2nd day of the experiment) by adding Na<sub>2</sub>S to a final concentration of 9 mg S<sup>2-</sup>/L; by the end of 2nd day, 1.9 mg S<sup>2-</sup>/L and a trace O<sub>2</sub> concentration (0.03 mg/L) were observed. On the 1st day of HSL, the clam tissues retained a high activity of malate dehydrogenase (MDH) against the background of a significant suppression of lactate dehydrogenase (LDH) activity and an elevation in the values of MDH/LDH index, which reflected a gain of anaerobic processes in anadara tissues at relatively high O<sub>2</sub> concentrations in water (1.8 mg/L). On 2nd days of HSL, the activity of oxidoreductases in the clam tissues did not change in comparison with the 1st day, however, against the background of a relative drop in [ATP], the value of the adenylate energy charge (AEC) was preserved. AEC retention indicates the ability of anadara to survive under conditions of H<sub>2</sub>S contamination and acute hypoxia/anoxia.

**Keywords:** clams, *Anadara kagoshimensis*, hydrogen sulfide, malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, adenylate system, Black Sea