

Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря.
Материалы IX международной конференции
11-14 октября 2004 г., Петрозаводск, Карелия, Россия
Петрозаводск, 2005. С. 9-13.

ИЗМЕНЕНИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА МИДИЙ *MYTILUS EDULIS* L. БЕЛОГО МОРЯ ПРИ ОПРЕСНЕНИИ МОРСКОЙ ВОДЫ И ПРИ КРАТКОСРОЧНОЙ ГИПОКСИИ

Н.Н. АЛЕКСЕЕВА, З.А. НЕФЕДОВА, О.Б. ВАСИЛЬЕВА, П.О. РИПАТТИ, Н.Н. НЕМОВА

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

Проведено исследование состава жирных кислот суммарных липидов мидий *Mytilus edulis* L. при опреснении морской воды до 5 и 15‰ (25‰ - контроль), а также при воздействии краткосрочной (24 часа) гипоксии в аквариальном эксперименте. Обнаружено характерное для морских организмов высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот, выявлена обратная зависимость неметиленразделенных жирных кислот и кислот w3 серии. Обсуждаются возможные последствия количественных модификаций жирнокислотных спектров при адаптации мидий к снижению солености воды и отсутствию кислорода в окружающей среде.

N.N. Alekseeva, Z.A. Nefyedova, O.B. Vasiljeva, P.O. Ripatti & N.N. Nemova. The change in fatty acid composition in the White Sea mussels *Mytilus edulis* L. under desalination of sea water and short-term hypoxia // The study, sustainable use and conservation of natural resources of the White Sea. Proceedings of the IXth International Conference, October, 11-14, 2004. Petrozavodsk, Karelia, Russia. Petrozavodsk, 2005. P. 9-13.

Investigation of fatty acids composition of total lipids of blue mussels *Mytilus edulis* L. at marine water desalination (from 25‰ (as a control) to 15 and 5‰) and influence of short-term hypoxia (24 hours) in aquarium experiment were traced. High content of polyunsaturated fatty acids characteristic of a marine organisms and an inverse correlation of nonmethylene-interrupted fatty acids and polyene w3 were found out. Possible consequences of quantitative changes of fatty-acids spectrum under adaptations of mussels to decreased water salinity and oxygen deficiency are discussed.

Мидии *Mytilus edulis* L. в Белом море обитают как на литоральных, так и на сублиторальных территориях. Приливно-отливная среда (литораль) более изменчива по сравнению с сублиторальной за счет большей вариабельности температуры, солености, влияния гипоксии и доступности корма. Мидии выработали набор сложных поведенческих, физиологических и биохимических адаптаций, позволяющих выживать в постоянно меняющейся окружающей среде. Прикрепленный образ жизни мидий ограничивает их трофические возможности определенным ареалом, поэтому содержание липидов и жирных кислот зависит не только от кормовых условий, но и от температуры, газового режима, солености.

Жирные кислоты являются наиболее лабильными компонентами липидных молекул, быстро и четко реагирующими на всевозможные воздействия и обеспечивающие адаптивные возможности организма. Ряд авторов указывает на отсутствие различий в жирнокислотном составе, определяемых соленостью мест обитания, у морских и пресноводных двустворчатых моллюсков (Кашин, 1997, Pollero et al, 1981, Жукова, 1992). Большая вариабельность в содержании жирных кислот, наблюдаемая как у пресноводных, так и у морских видов, определена трофическими факторами и температурой среды обитания (Кашин, 1997).

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей изменения спектров жирных кислот в целом организме мидий *Mytilus edulis* L. Белого моря в ответ на воздействие гипоксии и различной солености морской воды.

Материалы и методы

Объектом исследования были мидии *Mytilus edulis* L. Белого моря. Для эксперимента по влиянию гипоксии были взяты две субпопуляции (литоральная и сублиторальная) мидий, которых помещали в аквариумы без воды при температуре 10°C - опыт, а контроль находился в аквариумах с водой при солености 25‰ и температуре 10°C, что соответствует естественным условиям обитания мидий (Бергер, 1986). Экспозиция опыта составляла 24 часа. В эксперименте по влиянию разной концентрации солености морской воды были взяты литоральные мидии, которых помещали в аквариумы с соленостью воды равной 5, 15, 25‰. Соленость воды 25‰ соответствовала естественным условиям обитания и была принята за контроль. Экспозиция опыта составляла 12 суток при 10°C. Воду периодически меняли.

Образцы мидий (индивидуально, в нескольких параллелях (n=5) гомогенизировали в смеси хлороформ-метанол (2:1 по объему) с добавлением 0,001% антиоксиданта (ионола). Липиды экстрагировали по методу Фолча (Folch et al., 1957). Выделенные липиды подвергали прямому метанолизу

(Цыганов, 1971). Полученные эфиры жирных кислот разделяли на хроматографе «Хром-5» с пламенно-ионизационным детектором в качестве стационарной фазы использовали 15% Reoplex на Хроматоне N-AW (0,160-0,200)мм, а в качестве подвижной фазы служил гелий. Режим разделения – изотермический. На используемой колонке жирные кислоты разделяются в соответствии с числом углеродных атомов и двойных связей. Идентификацию жирных кислот проводили путем расчета эквивалента длины цепи (ЭДЦ) и сравнением его с табличными данными (Jamieson, 1975), а количественный анализ проводили при помощи компьютерной программы «Программа обчета хроматограмм». Достоверность различий данных в отдельных экспериментах оценивали с помощью дисперсионного анализа (одно- и многофакторный) с использованием компьютерной программы STATGRAPHICS Plus for Windows Version 2.1.

Результаты и обсуждение

Результаты, полученные при изучении спектров жирных кислот при опреснении морской воды до 5 и 15‰, а также при воздействии краткосрочной (24 часа) гипоксии свидетельствуют о некоторых изменениях липидного обмена.

В экспериментах по влиянию разной солености и гипоксии уровень насыщенных кислот не превышал 25% от суммы (21,2-23,5% и 21,4-24,5% соответственно), среди которых преобладала пальмитиновая кислота (16:0) – 13,0-13,8% (при опреснении морской воды) и 14,4-16,8% (при гипоксии) (таблица). Моноеновые кислоты составляли в сумме 17,1-19,4% при воздействии разной концентрации морской воды, и 20,5-24,2% от суммы при воздействии кислорода воздуха. В обоих случаях доминировали пальмитолеиновая (16:1), олеиновая (18:1) и эйкозаеновая (20:1) кислоты (2,8-9,0%; 3,4-6,1%; 3,6-6,3% соответственно). Суммарное содержание насыщенных и моноеновых жирных кислот, а также их отдельных представителей почти не изменялось, а было в пределах небольших колебаний. Исследование жирнокислотного состава липидов мидий в обоих экспериментах показало их высокую степень ненасыщенности (76,1-80,1% от суммы). Высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в мембранах обуславливает низкую вязкость этих мембран, и соответственно высокую метаболическую активность мембранных ферментов (Хочачка, Сомеро, 1977). По сравнению с насыщенными, полиненасыщенные кислоты имеют более низкие точки плавления и, когда включены в мембраны, разрушают монослой благодаря их постоянной «закрученной» ацильной цепи. Эти две характеристики полиенов увеличивают текучесть биологической мембраны (Gillis, Ballantyne, 1999). Такая структура определяет более быстрое проникновение различных молекул через мембрану, а также оптимальное функционирование мембранных ферментных сис-

тем. Отличительной особенностью полученного жирнокислотного спектра липидов мидий Белого моря явилось доминирующее содержание полиеновых жирных кислот с 2-6 двойными связями, которое составило более 50% от суммы кислот (53,9-61,7%), в основном за счет кислот w_3 ряда, таких как эйкозапентаеновая (20:5 w_3) и докозагексаеновая (22:6 w_3). Первая составляла 13,1-19,3% от суммы, вторая 14,3-20,8% от суммы в обоих экспериментах. Данные результаты согласуются с работами многих авторов (Fouad et al, 1992; Jahnke et al, 1995), в которых также показано, что жирнокислотный состав у морских беспозвоночных характеризуется доминированием двух полиеновых кислот: 20:5 w_3 и 22:6 w_3 . Показано, что жирные кислоты, которые являются алифатическими компонентами липидов, имеют определенный стандарт у морских беспозвоночных, отражающий экологические условия и источник питательного материала. Специфические жирные кислоты (или их сочетание) могут быть ассоциированы с особыми классами планктона. Диатомовые водоросли содержат в большом количестве 20:5 w_3 кислоту, а 22:6 w_3 кислота - это главный компонент морских водорослей - динофлагеллятов, а также присутствует и в диатомовых водорослях (Pollero et al, 1979; Ackman et al, 1974; Fouad et al, 1992; Joseph, 1982). По данным Fouad et al (1992) в планктоне доминируют 16:4 w_3 , 18:4 w_3 , 18:3 w_3 , 18:2 w_6 , 18:3 w_6 кислоты, причем кислоты w_3 и w_6 ряда являются фитопланктонными, а кислоты w_9 – зоопланктонные. Эти организмы используют органический материал в световой зоне, когда фитопланктон является основным продуктом питания. Однако, 22:6 w_3 кислота может быть растительного (водоросли) происхождения или же частично синтезирована из 20:5 w_3 (Ackman et al, 1974; Pollero et al, 1979). Известно (Крепс, 1981), что кислоты w_3 ряда имеют более низкую температуру плавления, т.е. они менее стабильны, чем кислоты w_6 ряда. При снижении солености от 25‰ до 15‰ заметно уменьшение содержания кислот w_3 ряда, главным образом, за счет 20:5 w_3 кислоты (табл.). Других изменений в жирнокислотном спектре при опреснении морской воды выявлено не было.

В спектре полиеновых кислот при аэробном обмене (при отсутствии гипоксии) у литоральных мидий суммарное содержание w_6 кислот было в 1,4 раза больше, чем у сублиторальных в аналогичных условиях за счет всех идентифицированных кислот этого ряда. Среди них необходимо выделить арахидоновую кислоту (20:4 w_6), уровень которой у литоральных мидий в 2,3 раза превосходил таковой сублиторальных. Биосинтез арахидоновой кислоты из алиментарного предшественника – линолевой кислоты (18:2 w_6) в реакциях элонгации и десатурации является основным путем обеспечения ею организма. Эффективность этого биосинтеза зависит от количества 18:2 w_6 кислоты и от активности участвующих в десатурации и элонгации ферментов.

Снижение содержания арахидоновой кислоты свидетельствует о ее интенсивном использовании как в процессах ферментативного (генерация простагландинов), так и неферментативного перекисного окисления, интенсивность которого возрастает при антропогенных воздействиях (Гойвонен и др., 2001). Соотношение 20:4w6/ 18:2w6, отражающее уровень превращения линолевой кислоты в арахидоновую в нормальных условиях (аэробный обмен) и при гипоксии у литоральных мидий в 2 раза больше, чем у сублиторальных (Рис. 1).

Исходно высокое значение данного соотношения возможно обусловлено приспособленностью литоральных мидий к более суровой окружающей среде, которая не характерна для сублиторальной территории. Если учесть, что арахидоновая кислота является предшественником биологически активных веществ (простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов), то можно предположить, что ее снижение, опосредованно влияя на гормональный уровень,



Рис. 1. Изменение соотношения 20:4w6/18:2w6 при гипоксии

В настоящее время имеется немало сведений о присутствии в составе липидов морских беспозвоночных метиленазделенных жирных кислот (НМРЖК) – кислот, у которых двойные связи разделены друг от друга более чем одной метиленовой (-CH₂) группой (Жукова, 1992, Paradis et al, 1977). Все известные НМР кислоты имеют двойные связи, расположенные в нечетном положении от метильного и карбоксильного концов молекулы. Известно, что наличие двойной связи в положениях Δ5, Δ7, Δ9 и Δ11 резко снижает точку плавления жирных кислот. Необычная структура НМР кислот придает им физико-химические свойства, позволяющие компенсировать недостаток полиенов в мембране, обеспечивая необходимую жидкость. Они обладают биологической активностью, связанной с мембранно-структурной функцией (рост, липидный транспорт, поддержание водной проницаемости) (Жукова, 1992). При исследовании жирнокислотного состава мидий при влиянии солености и гипоксии были обнаружены НМРЖК, которые составляли 5,4-8,8%. Их содержание увеличилось при снижении солености воды до 15‰, что сопровождалось уменьшением уровня w3 кислот. При гипоксии уровень их снизился у сублиторальной группы. Обратная корреляция

участвует в молекулярных адаптациях мидий в условиях гипоксии. В условиях гипоксии отмечалась тенденция к повышению уровня 20:5w3 кислоты у литоральных мидий – в 1,2 раза, а у сублиторальных мидий произошел подъем в 1,3 раза 22:6w3 кислоты. Возможно, эти кислоты играют важную роль в компенсации неблагоприятного воздействия на организм. Известно, что содержание 20:5w3, 22:6w3, а также арахидоновой 20:4w6 изменяется при различных стрессовых воздействиях (Правдина, 1975). Особую роль при этом играет соотношение полиеновых кислот w3/ w6, которое является одним из важных показателей характеризующих вязкость и жидкость биомембран. У сублиторальных мидий при гипоксии этот показатель увеличился в 1,7 раза, а у литоральных – в 1,1 раза, что может свидетельствовать об изменении состояния биомембран в пределах компенсаторных возможностей организма (Рис. 2).



Рис. 2. Изменение соотношения w3/w6 при гипоксии

ная корреляция НМРЖК с полиеновыми w3 кислотами также была отмечена в исследованиях Н.В. Жуковой (1992). Вероятно, это связано с тем, что скорость автоокисления НМР кислот, имеющих изолированные двойные связи, ниже, чем у полиенов обычного строения. Этот эффект делает мембраны более стабильными к окислению, тогда как необходимый уровень мембранной жидкости сохраняется.

Выводы

При исследовании влияния таких экологических факторов, как соленость и гипоксия на жирнокислотный состав мидий Белого моря установлено высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот с доминированием 20:5w3 и 22:6w3, а также выявлена обратная корреляция НМРЖК и кислот w3 ряда. Как снижение солености, так и гипоксия вызывают у литоральных мидий изменение количества 20:5w3 кислоты, результатом чего является повышение вязкости биомембран и, как следствие, уменьшение ионной проницаемости и активности липид-зависимых ферментов. У литоральных и сублиторальных мидий при анаэробном обмене (пребывание на воздухе) было отмечено повышение от-

ношения w3/w6 полиеновых кислот за счет увеличения докозапентаеновой (20:5w3) и докозагексаеновой (22:6w3) кислот, соответственно. Установлено, что у литоральных мидий при опреснении воды до 15‰ уровень 20:5w3 кислоты снизился. Изменение содержания 20:5w3 и 22:6w3 кислот у мидий при неблагоприятных воздействиях, таких как опреснение и гипоксия, говорит об их важной роли и участии в процессах биохимической адаптации, прежде всего на уровне состояния биомембран.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 02-04-48451, гранта Президента РФ «Ведущие научные школы России» (НШ № 849.2003.4.), Программы Президиума РАН «Биоразнообразие».

Выражаем благодарность старшему научному сотруднику ББС «Картеи» ЗИН РАН В.В. Халаману и научному сотруднику ИБ КарНЦ РАН И.Н. Бахмету за предоставленных мидий и постановку экспериментов.

*Таблица. Изменение жирнокислотного состава мидий *Mytilus edulis* L. при опреснении воды и при гипоксии (в % от суммы)*

Жирные кислоты	Соленость (Литоральные мидии)			Гипоксия			
	5‰	15‰	25‰ (контроль)	Литоральные мидии		Сублиторальные мидии	
				Анаэробный обмен	Аэробный обмен	Анаэробный обмен	Аэробный обмен
16:0	13,8±0,6	13,3±0,6	13,±1,5	15,4±1,3	14,4±0,9	16,8±1,2	15,6±0,4
Сумма насыщенных	22,2±1,0	23,5±0,4	21,2±2,8	21,4±1,7	22,2±0,0	24,5±0,5	24,1±0,9
16:1	2,8±0,4	4,4±1,3	2,9±0,3	8,9±0,9	8,3±1,4	8,5±1,6	8,6±0,2
18:1	5,4±1,5	3,6±0,8	4,0±0,1	6,1±1,0	5,0±0,5	4,1±0,3	4,5±0,2
20:1	6,4±0,2	6,3±0,4	5,6±0,6	5,4±0,3	6,3±1,1	4,4±0,3	4,7±0,0
Сумма моноеновых	19,4±1,7	20,1±0,9	17,1±1,0	24,2±2,2	23,8±0,7	20,5±1,0	20,9±0,8
18:2w6	1,9±0,2	1,5±0,3	1,7±0,0	2,9±0,1	2,8±0,1	1,8±0,3	2,4±0,0
20:4w6	7,7±2,1	7,9±0,3	7,2±0,4	4,0±0,3	4,5±1,0	1,5±0,4	1,9±0,0
Сумма w6 кислот	12,2±2,7	12,3±0,7	13,5±2,2	8,9±0,6	10,9±1,6	5,2±0,3	8,1±0,9
20:5w3	17,8±3,0	13,1±1,2	19,3±1,6	16,0±1,5	13,2±0,9	16,9±0,8	16,4±0,6
22:5w3	1,1±0,0	1,5±0,2	1,2±0,0	1,2±0,2	1,1±0,0	0,9±0,1	1,1±0,1
22:6w3	18,2±1,1	17,9±1,9	15,8±1,1	14,3±1,7	14,5±2,3	20,8±1,8	15,9±0,2
Сумма w3 кислот	38,3±3,9	34,0±0,8	39,7±2,0	39,7±3,8	36,4±2,9	44,7±0,6	40,3±0,9
Сумма w9 кислот	1,0±0,0	1,2±0,0	0,9±0,2	0,4±0,3	0,0	0,3±0,2	0,0
Сумма НМРЖК	7,1±0,5	8,8±0,3	7,6±0,3	5,6±0,2	6,7±0,8	5,4±0,2	6,6±0,0
Сумма полиенов	58,6±0,1	56,3±0,1	61,7±0,1	54,6±0,1	53,9±0,2	55,6±0,2	54,9±0,1

Примечание: Также были идентифицированы в следовых количествах 9:0; 10:0; 11:0; 12:0; 13:0; 14:0; 15:0; 17:0; 18:0; 20:0; 21:0; 22:0; 9:1; 10:1; 11:1; 12:1; 13:1; 14:1; 15:1; 17:1; 18:3w6; 20:2w6; 20:3w6; 22:2w6; 22:4w6; 22:5w6; 18:3w3; 18:4w3; 20:4w3; 22:2w3; 16:2w9; 18:3w9; НМР-20:2 и НМР-22:2 кислоты, но различия при их изменениях не достоверны.

Литература

- Бергер В.Я. 1986. Адаптации морских моллюсков к изменениям солености среды. Ленинград, Наука, 21 с.
- Жукова Н.В. 1992. Неметиленразделенные жирные кислоты морских двустворчатых моллюсков: распределение по тканям и классам липидов // Ж. эволюц. биохим. и физиол. Т. 28, №4. С. 434-440.
- Кашин А.Г. 1997. Влияние солености среды обитания на состав липидов некоторых водных беспозвоночных / Автореферат канд. дисс. Самара.
- Крепс Е.М. 1981. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. Л., 339 с.
- Правдина Н.И. 1975. Значение жирнокислотных радикалов в структурной гетерогенности и метаболизме фосфолипидов. Т. 79, вып. 2. С. 205-224.
- Тойвонен Л.В., Нефедова З.А., Сидоров В.С., Шарова Ю.Н. 2001. Адаптационные изменения в спектрах жирных кислот тканевых липидов сига *Coregonus lavaretus* L. при влиянии антропогенных нагрузок / Прикладная биохимия и микробиология. Т. 37, №3. С. 364-368.
- Хочачка П., Сомеро Дж. 1977. Стратегия биохимической адаптации. М., 396 с.
- Цыганов Э.П. 1971. Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагелем. // Лабор. дело, №8. С. 490-493.

- Ackman R.G., Epstein S., Kelleher M.* 1974. A composition of lipids and fatty acids of the ocean quahaug, *Arctica islandica*, from Nova Scotia and New Brunswick / *J. Fish. Res. Board Can.* V. 31(11). P. 1803-1811.
- Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G.H.* 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids animal tissue (for brain, liver and muscle) // *J. Biol. Chem.* V. 226. P. 497-509.
- Fouad B-M., Marty J-C, Fiala-Medioni A.* 1992. Fatty acid composition in deep hydrothermal vent symbiotic bivalves / *J. of Lipid Res.* V.33. P. 1797-1806.
- Gillis T.E., J.S. Ballantyne.* 1999. Mitochondrial membrane composition of two arctic marine Bivalve Mollusks, *Serripes groenlandicus* and *Mya truncate* / *Lipids.* V. 34, №1. P. 53-57.
- Jahnke L.L., R.E. Summons, L.M. Dowling, K.D. Zahiralis.* 1995. Identification of methanotrophic lipid biomarkers in cold-seep mussel gills: chemical and isotopic analysis / *Applied and environmental microbiology.* V. 61, №2. P. 576-582.
- Jamieson G.R.* 1975. *J. Chromatogr. Sci.* V. 13, №3. P. 491-497.
- Joseph J. D.* 1982. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II: Mollusca / *Prog.Lipid Res.* V. 21. P. 109-153.
- Paradis M., Ackman R.G.* 1977. Potential for employing the distribution of anomalous non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in several marine invertebrates as part of food web studies / *Lipids.* V. 12, №2. P. 170-176.
- Pollero R.J., R.R. Brenner, E.G. Gros.* 1981. Seasonal changes in lipid and fatty acid composition of the freshwater mollusk, *Diplodom patagonicus* / *Lipids.* V. 16, №2. P. 109-113.
- Pollero R.T., Re Maria E., Brenner R.R.* 1979. Seasonal changes of the lipids of the mollusc *Chlamys tehuelcha* / *Comp. Biochem and Physiol., A64,* №2. P. 257-263.