

РОЛЬ ЛИПИДОВ В АДАПТАЦИИ МИДИЙ *MYTILUS EDULIS* L. БЕЛОГО МОРЕЯ К БЫСТРОМУ ИЗМЕНЕНИЮ ТЕМПЕРАТУРЫ

© 2014 г. Н. Н. Фокина, Т. Р. Руоколайнен, И. Н. Бахмет,
член-корреспондент РАН Н. Н. Немова

Поступило 24.03.2014 г.

DOI: 10.7868/S0869565214230273

Двустворчатые моллюски *Mytilus edulis* L., как и все обитатели прибрежной морской зоны, благодаря наличию адаптивных приспособлений, способны выдерживать частые перепады абиотических факторов среды, в том числе температуры, особенно во время отлива [1, 2]. С учетом того, что в температурных адаптациях пойкилотермных организмов важная роль отведена липидам [3], цель настоящей работы заключалась в изучении компенсаторных модификаций на уровне состава липидов и экспрессии некоторых генов липидного метаболизма в жабрах беломорских мидий *M. edulis* в ответ на быстрое изменение температуры окружающей среды.

Мидии были собраны с коллекторов марикультуры в бухте Круглая (Кандалакшский залив, Белое море) с глубины 1.5–2.0 м в апреле (0...+3°C) и августе (+8°C) 2012 г. Аквариальные эксперименты по изучению влияния температуры были поставлены на базе ББС “Картеш” ЗИН РАН. Предварительную акклиматизацию животных к лабораторным условиям проводили в течение 72 ч. Температура воды соответствовала природной на момент постановки экспериментов и составляла 0...+3°C и +8°C. Затем температура воды в аквариумах была увеличена от 0...+3°C до +8°C (в апреле) и снижена от +8°C до 0...+3°C (в августе). Отбор проб проводили после 1- и 24-часового воздействия. После этого мидии были возвращены к исходным температурным условиям: 0...+3°C и +8°C. Образцы жабр брали на биохимический и молекулярный анализы ($n = 5$) по истечении 1, 24 и 72 ч. Воду в аквариумах меняли ежедневно, моллюски находились в аэрируемой воде, дополнительное кормление не проводили. Состав общих липидов, отдельных фракций фосфолипидов и жирнокислотный спектр фосфолипидов жабр *M. edulis* изучали методами тонкослойной, высокоэффективной жидкостной и га-

зо-жидкостной хроматографии соответственно [4–6]. Анализ экспрессии генов таких белков липидного метаболизма, как $\Delta 5$ -, $\Delta 6$ - и $\Delta 9$ -десатураз (GB:JK480914, GH196582 и CB617498 соответственно), фосфолипазы A_2 (GB:DQ172904.1), гепатопанкреатической липазы (GB:DQ176013.1), а также белков теплового шока 90 (GB:AM236589.2) осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени на приборе iCycler (“Bio-Rad”, США). Уровень экспрессии генов был рассчитан относительно референсного гена (GB:Z29550.1) – рРНК 28S [7]. Достоверность различий оценивали непараметрическим критерием Уилкоксона–Манна–Уитни. Достоверными считали различия при $p \leq 0.05$ [8].

Сезонные особенности в контрольных группах исследуемых *M. edulis* проявились главным образом в содержании запасных липидов – триацилглицеридов (ТАГ), уровень которых был значительно выше в жабрах мидий, собранных в летний месяц (табл. 1). Известно, что август характеризуется обилием фитопланктона в Белом море [2]. Мидии в этот период находятся на постнерестовом этапе репродуктивного цикла, сопровождающегося накоплением высокоэнергетических запасных веществ (углеводов и липидов) [9]. Отличия между *M. edulis*, собранными в апреле и августе, на уровне жирнокислотного спектра фосфолипидов жабр обусловлены прежде всего составом сестона, колеблющимся в зависимости от сезона, а также разницей в температуре морской воды (близкой к 0°C в апреле и около +8°C в августе). У “апрельских” мидий отмечен повышенный уровень олеиновой 18:1n-9-кислоты и таких n-6-полиеновых кислот, как 18:3, 20:3 и 22:4 (табл. 1). В составе фосфолипидов мембран они обеспечивают необходимую жидкостность липидного бислоя для нормального функционирования мембранно-связанных белков, ионных каналов и рецепторов в условиях действия низких температур [10]. Жабры мидий, собранных в августе, отличались повышенным содержанием таких мононенасыщенных жирных кислот, как 16:1n-9, 16:1n-7 и 16:1n-5, которые

Таблица 1. Изменения на уровне липидного состава и экспрессии некоторых генов в жабрах мидий *M. edulis* Белого моря в ответ на быструю смену температуры

	Общие липиды и отдельные фракции фосфолипидов, % сухой массы	Жирные кислоты фосфолипидов, % суммы ЖК	Экспрессия генов некоторых белков
Контрольные мидии апрель/август	ТАГ: 0.6/4.4 ($p = 0.02$)	16:1(n-9 + n-7 + n-5): 5.3/2.6 ($p = 0.01$) 18:1n-9:4.3/1.3 ($p = 0.01$) 20:1n-9:2.9/0.5 ($p = 0.01$) 18:3n-6:0.7/0.1 ($p = 0.01$) 20:3n-6:0.5/0.2 ($p = 0.04$) 22:4n-6:0.9/0.5 ($p = 0.04$)	Повышена экспрессия генов БТШ90 у “августовских” мидий ($p = 0.08$)
Повышение температуры в аквариуме (апрель) от 0...+3°C до +8°C			
Контроль/1 ч, +8°C	Нет изменений		
Контроль/24 ч, +8°C	ТАГ: 0.6/2.8 ($p = 0.04$)	16:0:12.0/15.1 20:1n-7:0.8/1.5 ($p = 0.04$)	Снижение: Δ6-десатураза Повышение: БТШ90 ($p = 0.04$)
Возврат к исходной температуре (0...+3°C)			
24 ч, +8°C/1 ч, 0°C	ФИ: 0.05/0.003 ФС: 0.09/0.01 ФЭА: 0.3/0.05 ($p = 0.01$) ФХ: 0.7/0.2 ($p = 0.04$) ЛФХ: 0.4/0.04 СФМ: 0.01/0.003 ($p = 0.01$)	18:1n-9:4.8/1.7 ($p = 0.04$) 18:2n-6:1.7/0.8 ($p = 0.02$)	24 ч, 8°C/24 ч, 0°C Снижение: липаза Повышение: Δ6-десатураза ($p = 0.04$)
1 ч, 0°C/24 ч, 0°C	ФС: 0.01/0.07 ($p = 0.01$) ФЭА: 0.05/0.2 ($p = 0.04$) ФХ: 0.2/1.6 ЛФХ: 0.04/0.3 ($p = 0.01$)	20:5n-3:4.2/10.6 22:6n-3:6.7/13.7 n-3 ПНЖК:17.5/32.9 n-3/n-6:2.4/3.7 ($p = 0.01$)	
24 ч, 0°C/72 ч, 0°C	ТАГ: 0.9/0.0 ($p = 0.02$)	Нет изменений	Снижение: БТШ90 Фосфолипаза A ₂ ($p = 0.04$)
Понижение температуры в аквариуме (август) от +8°C до 0...+3°C			
Контроль/1 ч, +3°C	Нет изменений	20:4n-6: 3.1/5.2 ($p = 0.04$)	Нет изменений
Контроль/24 ч, +3°C	ЭфХС: 1.8/0.3 ($p = 0.01$)	18:3n-3: 0.2/0.04 ($p = 0.01$)	Повышение: БТШ90 ($p = 0.02$)
Возврат к исходной температуре (+8°C)			
24 ч, +3°C/1 ч, +8°C	ЭфХС: 0.3/1.1 ($p = 0.01$) СФМ: 0.02/0.07 ($p = 0.04$)	16:1n-7: 1.6/3.2 18:3n-3: 0.04/0.09 ($p = 0.04$)	Нет изменений
1 ч, +8°C/24 ч, +8°C	Нет изменений	16:1n-7: 3.2/7.3 ($p = 0.01$) МНЖК: 12.3/17.7 ($p = 0.02$)	
24 ч, +8°C/72 ч, +8°C	Нет изменений		

Примечание. ТАГ – триацилглицерины, ЭфХС – эфиры холестерина, ФИ – фосфатидилинозитол; ФС – фосфатидилсерин, ФЭА – фосфатидилэтанолламин, ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СФМ – сфингомиелин; МНЖК – моновенасыщенные жирные кислоты, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; БТШ – белки теплового шока.

имеют фитопланктонное происхождение и указывают на преобладание в морской воде зеленых и диатомовых водорослей [11].

Повышение температуры в аквариумах в апреле от 0...+3°C до +8°C в течение первого часа не отразилось на составе липидов и уровне экспрессии исследуемых генов, тогда как в результате суточной экспозиции моллюсков при +8°C наряду с компенсаторным снижением активности гена Δ6-десатуразы в жабрах *M. edulis* отмечено повышение экспрессии генов белков теплового шока семейства 90 (БТШ 90) и увеличение концентрации запасных высокоэнергетических липидов –

ТАГ и некоторых жирных кислот в составе фосфолипидов: 16:0 и 20:1n-7 (табл. 1). Эти модификации свидетельствуют, по-видимому, о развитии компенсаторной реакции на уровне обмена липидов, а также об активации общего метаболизма мидий при суточном воздействии повышенной температуры морской воды. При возвращении к исходным температурным условиям, близким к 0°C, понижение концентрации всех исследуемых фракций фосфолипидов, а также олеиновой и линолевой кислот в составе фосфолипидов жабр, вероятно, является следствием физиологической реакции моллюсков на стрессовое воздействие

факторов окружающей среды: смыкание створок раковины и переход в гипометаболическое состояние (анабиоз), которое позволяет им пережить неблагоприятные условия обитания, в том числе воздействие экстремальных температур [1].

При последующем нахождении моллюсков при 0...+3°C (24 ч) в жабрах наблюдали повышение уровня большинства фракций фосфолипидов и концентрации n-3 полиненасыщенных жирных кислот в составе общих фосфолипидов, что указывает на активацию физиологических процессов, в том числе фильтрацию, и переход на аэробный метаболизм. Повышенный уровень экспрессии гена Δ6-десатуразы подтверждает наличие у мидий ответной реакции по механизму адаптации “гомеовязкости” с участием десатураз, компенсирующих влияние низких температур на вязкость мембран. Длительное нахождение моллюсков при 0...+3°C (72 ч) сопровождается снижением концентрации ТАГ, а также активности генов БТШ 90 и фосфолипазы A₂.

Понижение температуры в аквариумах в августе от +8°C до 0...+3°C практически не отразилось на уровне экспрессии исследуемых генов, за исключением активности генов БТШ 90, уровень которых повысился при суточном воздействии температуры, равной +3°C. Это может быть обусловлено повышенным содержанием арахидоновой кислоты в составе фосфолипидов жабр, отмеченным при воздействии низкой температуры в течение первого часа (табл. 1). Известно, что арахидоновая кислота является предшественником синтеза эйкозаноидов, в том числе простагландинов, которые, в свою очередь, индуцируют синтез БТШ [12]. При возвращении моллюсков в исходные условия (+8°C) в течение первого часа отмечали увеличение концентрации эфиров холестерина — запасной формы холестерина в клетке, а также рост уровня сфингомиелина и жирных кислот фитопланктонного происхождения — 18:3n-3 и 16:1n-7, что, вероятно, указывает на активацию фильтрации у мидий в ответ на повышение температуры окружающей среды. Последующее увеличение концентрации ряда мононенасыщенных жирных кислот также свидетельствует об активации общего метаболизма мидий.

Таким образом, компенсаторные изменения на уровне состава липидов и экспрессии исследуемых генов липидного метаболизма, отмеченные

в жабрах мидий в первые сутки после резкого изменения температуры окружающей среды, направлены на защиту и восстановление структуры и функций клеточных мембран. Показатели обмена липидов отражают физиологическую реакцию моллюсков на изменение температуры и могут быть использованы для индикации их состояния в условиях стресса.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ББС “Картеш” ЗИН РАН за возможность проводить исследования на биостанции.

Результаты данного исследования получены при использовании ЦКП научного оборудования ИБ КарНЦ РАН. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 12-04-32205_мол_а, Президента РФ “Ведущие научные школы” (НШ 1642.2012.4 и НШ-1410.2014.4), а также программы Президиума РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Storey K., Storey J. // Quart. Rev. Biol. 1990. V. 65. P. 145–174.
2. Бергер В.Я. Продукционный потенциал Белого моря. СПб.: Зоол. ин-т РАН, 2007. 292 с.
3. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1988. 586 с.
4. Сидоров В.С., Лизенко Е.И., Болгова О.М., Нефедова З.А. Лососевые (Salmonidae) Карелии. Петрозаводск, 1972. В. 1. С. 150–161.
5. Цыганов Э.П. // Лаб. дело. 1971. № 8. С. 490–493.
6. Arduini A., Pescechiera A., Dottori S., Sciarroni A.F., Serafini F., Calvani M. // J. Lipid Res. 1996. V. 37. P. 684–689.
7. Livak K.J., Schmittgen N.D. // Methods. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
8. Hill T., Lewicki P. Statistics: Methods and Applications. Tulsa: StatSoft, 2007. <http://www.statsoft.com/textbook/>.
9. Gabbott P.A. In: Mollusca. V. 2. Environmental Biochemistry and Physiology. N.Y.: Acad. Press, 1983. P. 165–217.
10. Gillis T.E., Ballantyne J.S. // Lipids. 1999. V. 34. № 1. P. 59–66.
11. Viso A.C., Marty J.C. // Phytochemistry. 1993. V. 34. № 6. P. 1521–1533.
12. Fabbri E., Valbonesi P., Franzellitti S. // Invertebrate Survival J. 2008. № 5. P. 135–161.