

ПОКАЗАТЕЛИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА И АДЕНИЛАТНАЯ СИСТЕМА ТКАНЕЙ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* (LAMARCK, 1819) В УСЛОВИЯХ УМЕРЕННОЙ ГИПОКСИИ

© 2023 г. А. С. Кохан¹, А. А. Солдатов^{1,2,*}, И. В. Головина¹,
Ю. В. Богданович¹, Н. Е. Шалагина¹, В. Н. Рычкова¹

¹Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

²Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.07.2023 г.

После доработки 12.10.2023 г.

Принята к публикации 23.10.2023 г.

Исследовали влияние режима умеренной гипоксии на процессы энергетического обмена в тканях (жабры, гепатопанкреас) средиземноморской мидии (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819). Контрольная группа моллюсков содержалась при $6.8\text{--}6.9\text{ мг О}_2\text{ л}^{-1}$, опытная при $1.9\text{--}2.0\text{ мг О}_2\text{ л}^{-1}$. В обоих случаях температура воды составляла $22 \pm 1^\circ\text{C}$, соленость — $17\text{--}18\text{‰}$. Экспозиция — 72 ч. В условиях умеренной гипоксии в организме средиземноморской мидии развивался комплекс реакций, направленных на поддержание энергетического статуса тканей. Аэробные процессы явно ограничивались, о чем свидетельствовало снижение активности сукцинатдегидрогеназы. Одновременно усиливались анаэробные процессы в тканях. Повышалась активность альдолазы, малатдегидрогеназы, увеличивалось содержание пирувата. При этом глюкозо-лактатное направление метаболизма подавлялось. Это нашло отражение в отсутствии роста активности лактатдегидрогеназы и содержания лактата в тканях. Допускается переключение метаболизма на глюкозо-опиное направление, свойственное представителям рода *Mytilus*. В работе дается развернутая характеристика состояния аденилатной системы моллюска. Показано, что содержание фракции АТФ в тканях в условиях гипоксии оставалось на уровне контрольных значений, что отражало адаптивную направленность реорганизации тканевого метаболизма. Впервые отмечена способность гепатопанкреаса аккумулировать фракции АДФ и АМФ из систем циркуляции в условиях гипоксической нагрузки. Полагаем, что это может быть основной причиной роста пула аденилатов и понижения значений АЭЗ в данном органе. Из представленных результатов следует, что реорганизация процессов углеводного обмена в тканевых структурах средиземноморской мидии в условиях умеренной гипоксии позволяет сохранять энергетический статус ее тканей. Это является одним из основных условий, позволяющих моллюску осваивать проблемные гипоксические акватории.

Ключевые слова: умеренная гипоксия, аденилатная система, сукцинатдегидрогеназа, ферменты гликолиза, *Mytilus galloprovincialis*

DOI: 10.31857/S0044452923060050, **EDN:** GIUCWX

ВВЕДЕНИЕ

Двустворчатые моллюски (сем. Bivalvia) широко представлены в шельфовой зоне Мирового океана. Большинство из них ведет малоподвижный или прикрепленный образ жизни [1]. Некоторые населяют контурные биотопы, для которых характерны значительные градиенты температуры, содержания кислорода, солености [2], а также зоны внешнего экстремума: гиперсоленые водоемы, гипоксические акватории с элементами сероводородного заражения [3, 4] и др. Функциональные основы толерантности к данным условиям среды представляют интерес, так как предполагают специфику адаптивной реорганизации метаболических про-

цессов, уникальной по отношению к другим формам жизни.

Значительное число работ посвящено биоэнергетическим аспектам существования моллюсков в условиях внешнего дефицита кислорода. Показана способность двустворок легко переходить к суббазальным скоростям метаболизма [5] посредством обратимого фосфорилирования ряда гликолитических ферментов [6] при участии цАМФ (цГМФ) протеинкиназ [7]. Отмечены существенные модификации терминальных реакций анаэробного гликолиза, которые исключают образование лактата и развитие тканевого ацидоза. К ним относится реакция трансаминирования пирувата с дезаминированием аспартата, которая приводит к образова-

нию аланина и оксалоацетата [7]. Последний в серии процессов превращается в сукцинат, что позволяет получать дополнительный ресурс АТФ [7, 8]. Определенные изменения выявлены и на уровне клеточных систем [9].

Особый интерес представляют начальные этапы перестройки тканевого метаболизма моллюсков при адаптации к условиям дефицита кислорода. Это можно исследовать только в условиях умеренной гипоксии. По общему признанию первые признаки развития гипоксического состояния у бентосных организмов наблюдаются при концентрации кислорода $2 \text{ мг O}_2 \text{ л}^{-1}$ [10]. В настоящей работе в условиях эксперимента исследуется именно этот режим.

В качестве объекта исследования выбрана средиземноморская мидия *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Представители рода *Mytilus* широко распространены по побережью Мирового океана и являются одной из самых массовых групп двусторчатых моллюсков [11]. Они являются общепризнанным объектом биоиндикации качества морских акваторий [12]. Поэтому информация, полученная на представителях данного рода, может иметь не только теоретическое, но и практическое значение.

Цель работы — в условиях эксперимента исследовать влияние режима умеренной гипоксии на активность ряда маркерных ферментов энергетического обмена, содержание метаболитов и состояние аденилатной системы тканей средиземноморской мидии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал

Исследование проводили на взрослых особях средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), собранных с коллекторных установок “Дон-Комп” (Стрелецкая бухта, Севастополь) в июне (период минимальной нерестовой активности) 2022 г. Размеры раковины составляли 65–85 мм в длину и 28–40 мм в высоту. Использовали экземпляры исключительно с черной окраской раковины. Установлено, что цветовые морфы мидии обладают различной интенсивностью тканевого метаболизма и отличаются активностью некоторых ферментов [13]. Транспортировку осуществляли в пластиковых контейнерах без воды в течение 1 ч с момента сбора. После транспортировки мидии содержались в 30-литровых стеклянных аквариумах, оборудованных системой проточной морской воды, в течение 3 дней для снятия стресса. Считается, что этого времени достаточно для восстановления функциональной нормы [14].

Моделирование умеренной гипоксии

Контрольную группу мидий ($n = 12$) содержали при $22 \pm 1^\circ\text{C}$, концентрации кислорода в воде $6.8\text{--}6.9 \text{ мг O}_2 \text{ л}^{-1}$ и солености $17\text{--}18\text{‰}$. Опытную ($n =$

$= 12$): при $22 \pm 1^\circ\text{C}$, $17\text{--}18\text{‰}$ и $1.9\text{--}2.0 \text{ мг O}_2 \text{ л}^{-1}$. Экспозиция составляла 72 ч. Фотопериод — 12 ч (день): 12 ч (ночь). Содержание кислорода в воде понижали путем барботажа газообразным азотом в течение 4–5 ч. Контроль за уровнем кислорода в воде проводили при помощи оксиметра “Ohaus Starter 300 D” (США). Ежедневно меняли воду в аквариумах для удаления метаболитов с сохранением заданной концентрации кислорода в воде.

Препарирование тканей

Для лабораторного анализа были выбраны жабры и гепатопанкреас. Жабры являются наиболее чувствительной структурой по отношению к условиям водной среды и определяют кислородный режим большинства тканей моллюска [15, 16]. Гепатопанкреас — орган, координирующий течение метаболических процессов на организменном уровне. Ткани препарировали при температуре $0\text{--}4^\circ\text{C}$. Полученные образцы хранили в морозильной камере “Farma 900 Series” (TermoScientific, США) при -80°C . Гомогенаты готовили непосредственно в день эксперимента на льду ($0\text{--}4^\circ\text{C}$). Для получения супернатанта их центрифугировали при $10\,000 \text{ об мин}^{-1}$ в течение 10 мин в центрифуге с охлаждением “Eppendorf 5424 F” (Германия).

Биохимические исследования

Активность альдолазы (4.1.2.13) определяли по методу Товарицкого—Валуйской [17]. Интенсивность окраски измеряли при длине волны 540 нм по скорости расщепления фруктозо-1,6-дифосфата (ФДФ). В качестве среды выделения использовали 1.15%-ный р-р KCl, как описано ранее [18]. Активность выражали в мкмоль ФДФ $\text{мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ белка. Активность малатдегидрогеназы (МДГ, 1.1.1.37) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27) измеряли при длине волны 340 нм по скорости окисления НАД H_2 , используя в качестве среды выделения 0.2 М Трис-HCl буфер, pH 7.5 [19]. Субстратом для определения активности ЛДГ служил пируват, а для МДГ — оксалоацетат. Активность выражали в мкмоль НАД $\text{H}_2 \text{ мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ белка. Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ, 1.3.99.1) определяли при длине волны 420 нм по скорости восстановления феррицианида калия [20]. В качестве трансформирующей среды использовали 0.1 М калий — фосфатный буфер. Активность выражали в нмоль сукцината $\text{мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ белка. Содержание белка в пробах контролировали микробиуретовым методом [21]. В качестве стандарта использовали кристаллический сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich A8806). Все измерения выполняли на двухлучевом

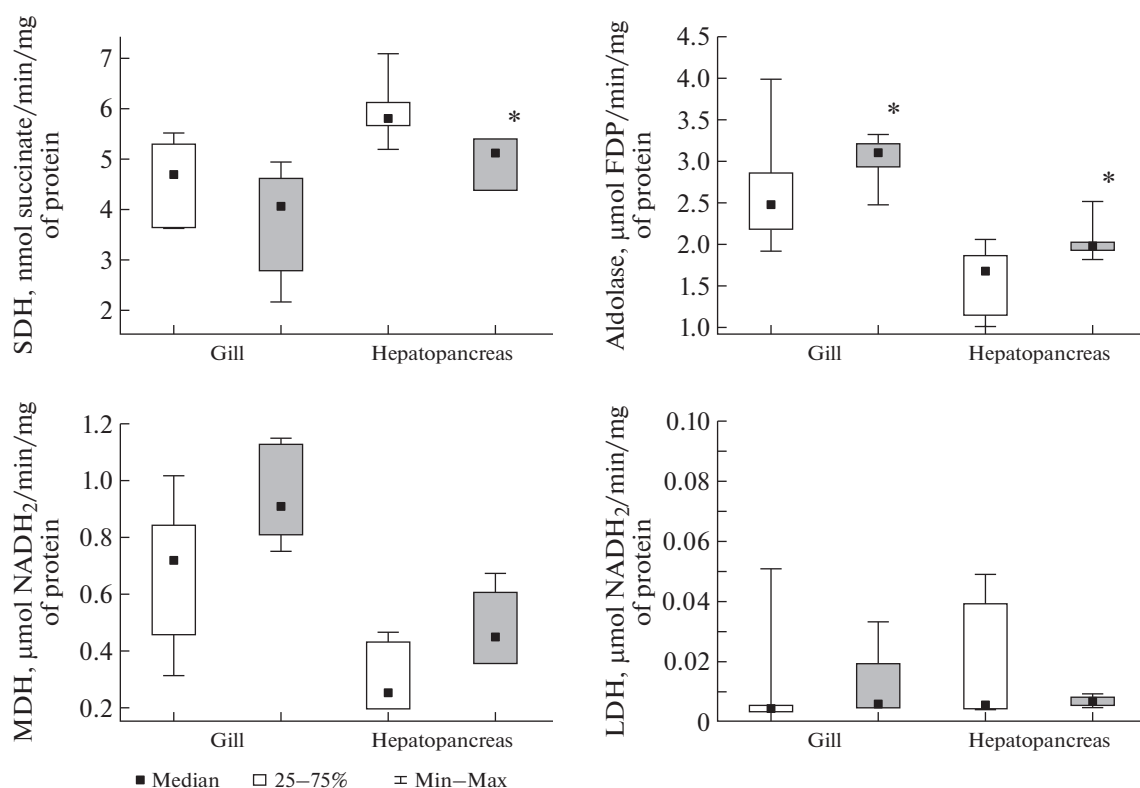


Рис. 1. Активность ферментов энергетического обмена жабр и гепатопанкреаса мидий в условиях нормоксии и умеренной гипоксии. SDH – сукцинатдегидрогеназа, MDH – малатдегидрогеназа, LDH – лактатдегидрогеназа, белый – нормоксия, серый – гипоксия, * – $p \leq 0.05$.

спектрофотометре “SPECS SSP-715” (Россия), при температуре 20°C.

Концентрацию глюкозы (моносахаридов) определяли с помощью лабораторного набора “ГЛЮКОЗА-4-ОЛЬВЕКС” при длине волны 500 нм. Лактата – с использованием набора “МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА-ОЛЬВЕКС” при длине волны 500 нм. Пирувата – с использованием набора “ПИРУВАТ UV-АБРИС+” при длине волны 340 нм. Концентрацию выражали в нмоль мг^{-1} ткани.

Содержание адениловых нуклеотидов в тканях мидии регистрировали хемилюминесцентным методом [22]. Результаты выражали в мкмоль г^{-1} ткани. Средняя масса навески жабр составляла 4.8 мг. Исследуемые ткани гомогенизировали в 0.1 М трис-ацетатном буфере, pH 7.75, на холоде (0–4°C). Аденилатный комплекс экстрагировали в кипящем буфере на водяной бане в течение 5 мин. Полученные экстракты замораживали до дальнейшего анализа (–80°C). Определение АТФ проводили по световой эмиссии с добавлением люциферин-люциферазы на приборе “TP-Luminometer 1250” (ЛКВ, Швеция). АДФ и АМФ восстанавливали до АТФ с применением пируваткиназы и аденилаткиназы. Аденилатный энергетический заряд (АЭЗ)

рассчитывали, используя концентрацию (C) нуклеотидов по формуле [23]:

$$\text{АЭЗ} = \frac{C_{\text{АТФ}} + \frac{1}{2}C_{\text{АДП}}}{C_{\text{АТФ}} + C_{\text{АДП}} + C_{\text{АМФ}}}.$$

Статистический анализ

При проведении сравнительного анализа применен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) PAST Version 4.09. Нормальность распределения выборочных совокупностей проверяли по Shapiro–Wilk (W -test). Статистические сравнения выполнены на основе непараметрического критерия U-критерия Манна–Уитни. Минимальный уровень значимости составлял $p \leq 0.05$. Объем выборочных совокупностей: 12 особей (контроль), 12 особей (опыт).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Жабры

В условиях умеренной гипоксии в данном органе отмечали снижение активности СДГ на 19–20% (рис. 1). Это происходило на фоне роста активности ряда гликолитических ферментов – альдолазы и

МДГ, на 17% ($p \leq 0.05$) и 38% ($p \leq 0.05$) соответственно. Следует отметить крайне низкую активность ЛДГ в данной структуре (0.010 ± 0.008 мкмоль НАД Н₂ мин⁻¹ мг⁻¹ белка), величина которой не изменялась в условиях экспериментальной нагрузки.

Дефицит кислорода сопровождался существенным повышением содержания в органе глюкозы (рис. 2). В сравнении с контролем различия составляли более 55% ($p \leq 0.01$). Еще более значительные изменения претерпело содержание пирувата. Уровень данного соединения увеличился в 2.5–2.6 раза ($p \leq 0.01$). При этом содержание лактата в ткани жабр не изменялось.

Состояние аденилатной системы жабр моллюска в целом совпадало с контрольными величинами. Различия в уровне АТФ, АДФ, АМФ, пуле аденилатов не были статистически значимы (рис. 3). То же наблюдалось и в отношении АЭЗ (рис. 4).

Гепатопанкреас

Характер изменения активности ферментов в данном органе был близок к отмеченному в отношении жабр (рис. 1). Активность СДГ понижалась на 16–17%, при этом альдолазы увеличивалась на 31–32% ($p \leq 0.05$). Отмечали также рост активности МДГ, однако различия в сравнении с контрольными величинами не были значимы. Активность ЛДГ также была слабо выражена и не изменялась на протяжении эксперимента.

Гепатопанкреас отличался высоким содержанием глюкозы. В сравнении с жабрами уровень данного соединения был в почти в 5 раз выше ($p \leq 0.001$) (рис. 2). Гипоксия не оказывала значимого влияния на содержание глюкозы в данном органе. При этом уровень пирувата относительно контрольных значений увеличивался более, чем в 2 раза ($p \leq 0.05$), а содержание лактата уменьшалось в 4 раза ($p \leq 0.01$).

Определенные изменения отмечали и в состоянии аденилатной системы (рис. 3). Уровень АДФ и АМФ повышался почти в 2 раза ($p \leq 0.05$ – 0.01). При этом содержание фракции АТФ совпадало с контрольными величинами. Это приводило к увеличению пула аденилатов и снижению АЭЗ на 32 и 26% соответственно ($p \leq 0.05$) (рис. 3, 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из эффектов, зарегистрированных в настоящей работе, явилось снижение активности СДГ в жабрах и гепатопанкреасе в ответ на условия умеренной гипоксии. Известно, что данный фермент принимает участие в реакциях цикла трикарбоновых кислот и одновременно входит в структуру дыхательной цепи переноса электронов (комплекс II) [24]. Это позволяет констатировать факт ограничения аэробных процессов в обоих органах. Показано также участие СДГ в перераспределении

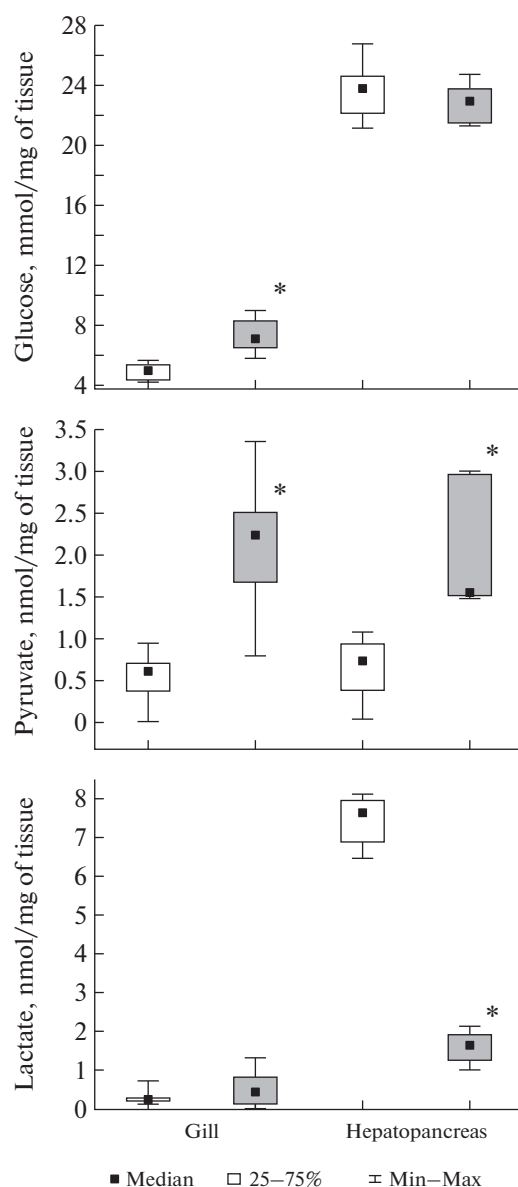


Рис. 2. Содержание глюкозы, пирувата и лактата в жабрах и гепатопанкреасе мидий в условиях нормоксии (белый) и умеренной гипоксии (серый). * – $p \leq 0.05$.

гликолитических метаболитов в направлении образования сукцината в условиях анаэробноза. Это позволяет митохондриям сохранять функциональную активность в условиях острой нехватки кислорода [25]. Подобные эффекты показаны для многих видов двустворок [7].

В настоящей работе об усилении анаэробных процессов в тканях моллюска косвенно свидетельствовали увеличение активности альдолазы, МДГ и повышение содержания пирувата. При этом роста содержания лактата не наблюдали (жабры). В гепатопанкреасе, напротив, уровень данного соединения существенно понижался. Отсутствие роста содержания лактата в тканях в условиях острой

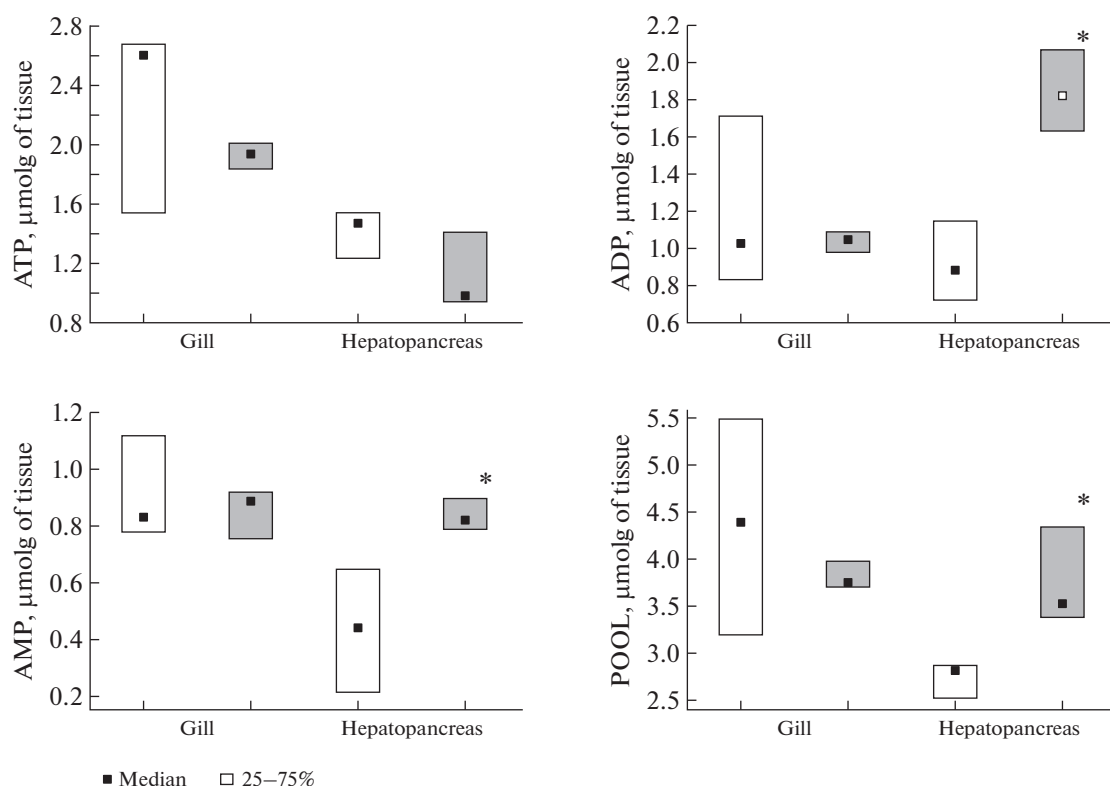


Рис. 3. Состояние аденилатной системы жабр и гепатопанкреаса мидий в условиях нормоксии и умеренной гипоксии. POOL — пул аденилатов, белый — нормоксия, серый — гипоксия, * — $p \leq 0.05$.

гипоксии показано ранее и для других видов моллюсков [26]. При этом отмечалась крайне низкая эффективность ЛДГ, что совпадает с результатами настоящей работы. Это означает, что глюкозо-лактатное направление метаболизма [27], свойственное большинству организмов, у моллюсков в условиях умеренной гипоксии явно подавлялось.

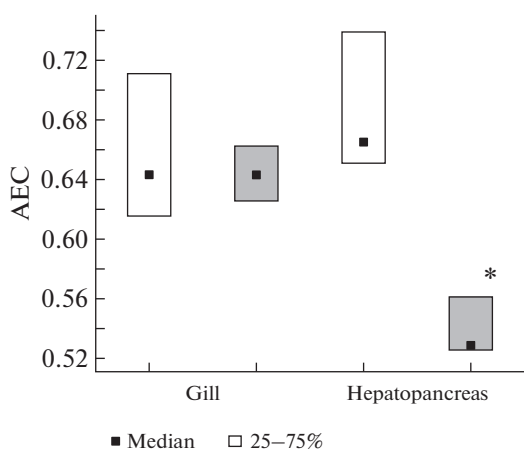
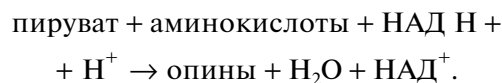


Рис. 4. Величина АЭЗ жабр и гепатопанкреаса мидий в условиях нормоксии и умеренной гипоксии. AES — аденилатный энергетический заряд, белый — нормоксия, серый — гипоксия, * — $p \leq 0.05$.

Считается, что у многих беспозвоночных терминальными гликолитическими ферментами являются опиндегидрогеназы [25]. Они сопрягают реакцию взаимодействия пирувата с аминокислотами с образованием опинов [28]:



Опины не оказывают столь выраженного влияния на величину тканевого pH, как лактат, что имеет адаптивное значение [29]. Среди опиндегидрогеназ выделяют октопиндегидрогеназу (*OcDH*) (EC 1.5.1.11), проявляющую выраженное сродство к L-аргину [30]. Показан рост ее активности в условиях дефицита кислорода [31]. Активность данного фермента была идентифицирована в тканях представителей рода *Mytilus* [31], в том числе *Mytilus galloprovincialis* [32]. Можно допустить, что глюкозо-опинное направление метаболизма [27] в условиях дефицита кислорода начинает доминировать над процессами классического анаэробного гликолиза. В этом, по-видимому, следует искать объяснение низкой эффективности ЛДГ и отсутствию изменения содержания лактата в тканях, показанную в настоящей работе.

Значительное число работ посвящено участию митохондрий морских организмов в адаптации к

условиям дефицита кислорода. Особое внимание уделяется организмам, толерантным к условиям острой гипоксии [33]. Отмечается их способность переходить к суббазальным скоростям метаболизма, с сохранением тканевого ресурса АТФ и быстрым восстановлением процессов окислительного фосфорилирования в условиях реоксигенации [34]. О состоянии аденилатной системы в основном судят по содержанию фракции АТФ [33, 34]. Особенность настоящей работы состоит в том, в ней дается развернутая характеристика аденилатного комплекса. Ранее подобная информация приводилась нами в только в отношении другого двустворчатого моллюска — анадары (*Anadara kagoshimensis*, Tokunaga, 1906) [26].

Анализ состояния аденилатного комплекса в жабрах средиземноморской мидии позволяет констатировать факт отсутствия каких-либо значимых изменений в системе в условиях умеренной гипоксии. Содержание АТФ, АДФ, АМФ сохранялось на уровне контрольных величин. То же можно сказать в отношении пула аденилатов и АЭЗ. Это свидетельствует о том, что реорганизация углеводного метаболизма, отмеченная выше в данном органе моллюска, позволяет сохранять ее энергетический статус.

В гепатопанкреасе ситуация была иной. При сохранении содержания АТФ в органе повышался ресурс АДФ и АМФ, что определяло увеличение пула аденилатов и снижение АЭЗ. Такая ситуация возможна только в случае поступления АДФ и АМФ в гепатопанкреас извне. Можно допустить участие в этом процессе системы циркуляции гемолимфы, которая насыщается фракциями АДФ и АМФ в условиях гипоксии со стороны других органов и тканей. Способность гепатопанкреаса моллюсков избирательно накапливать фракции АДФ и АМФ ранее не обсуждалась. Эта информация является новой.

Следствием роста содержания АМФ в гепатопанкреасе может быть образование повышенных количеств цАМФ. Последний является аллостерическим регулятором протеинкиназы А (ПКА) [35]. Протеинкиназа А зарегистрирована в тканях двустворчатых моллюсков и часто используется в качестве маркера в экодиагностике [36]. Показано ее активное участие в адаптации моллюсков к условиям внешней гипоксии [37, 38]. Данный фермент является триггером катаболических путей, направленных на активную продукцию АТФ [35]. Как показали наблюдения, действие протеинкиназы А направлено на поддержание окислительных процессов в тканях в условиях внешнего дефицита кислорода [38]. Установлено, что активация ПКА индуцируется ростом отношения АМФ/АТФ [39, 40]. В нашем случае действительно происходит рост индекса АМФ/АТФ в гепатопанкреасе за счет поступления АМФ из систем циркуляции, о чем говорилось выше. Этот факт позволяет допустить рост активности

ПКА и у средиземноморской мидии в условиях внешнего дефицита кислорода.

Одним из результатов настоящей работы явилось существенное повышение содержания глюкозы в жабрах моллюска, что также свидетельствует об усилении анаэробных процессов [7]. Процесс, по-видимому, контролируется со стороны гепатопанкреаса. Данный орган располагает организменным ресурсом гликогена [41] и имеет повышенный уровень глюкозы, которая распределяется в организме моллюска при участии системы циркуляции гемолимфы. В настоящей работе различия в содержании глюкозы между жабрами и гепатопанкреасом превышали 5 раз. Прямое участие в этом процессе может также принимать ПКА, активность которой в условиях повышенных значений индекса АМФ/АТФ в гепатопанкреасе должна быть высокой. Данный фермент принимает непосредственное участие в обмене углеводов, в частности гидролизе молекул гликогена в условиях энергетического дефицита [42], что имеет прямое отношение к процессам, наблюдаемым в гепатопанкреасе моллюска. Действие ПКА на углеводный обмен может быть опосредовано и через увеличение экспрессии генов глюкозного транспортера (GLUT-4) и гексокиназы [43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из представленной информации следует, что в условиях умеренной гипоксии в организме средиземноморской мидии развивался комплекс реакций, направленных на поддержание энергетического статуса тканей. Аэробные процессы явно ограничивались, о чем свидетельствовало снижение активности СДГ. Одновременно усиливались анаэробные процессы в тканях. Повышалась активность альдолазы, МДГ, увеличивалось содержание пирувата. При этом глюкозо-лактатное направление метаболизма явно подавлялось. Об этом свидетельствовало отсутствие роста активности ЛДГ и содержания лактата в тканях. Допускается переключение метаболизма на глюкозо-опинное направление, свойственное представителям рода *Mytilus*. Развернутая характеристика состояния аденилатной системы позволяет констатировать, что ткани моллюска сохраняли исходный энергетический статус. Содержание фракции АТФ оставалось на уровне контрольных значений, что отражало адаптивную направленность реорганизации тканевого метаболизма. Впервые отмечена способность гепатопанкреаса аккумулировать фракции АДФ и АМФ из систем циркуляции в условиях гипоксической нагрузки. Полагаем, что это может быть основной причиной роста пула аденилатов и понижения значений АЭЗ в данном органе. Из представленных результатов следует, что реорганизация процессов углеводного обмена в тканевых структурах средиземноморской мидии в усло-

виях умеренной гипоксии позволяет сохранять энергетический статус ее тканей. Это является одним из основных условий, позволяющих моллюску осваивать проблемные гипоксические акватории.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания: “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” (№ 121041400077-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента — А.А.С., К.А.С.; сбор данных — К.А.С., Г.И.В., Б.Ю.В., Ш.Н.Е.; обработка данных — А.А.С., К.А.С., Г.И.В., Б.Ю.В., Ш.Н.Е.; написание и редактирование манускрипта — А.А.С., К.А.С.; постановка эксперимента — Р.В.Н.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность с.н.с., к.б.н. И.Н. Сысоевой, и н.с. А.А. Сысоеву за методическую помощь в определении параметров состояния аденилатной системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Haszprunar G, Wanninger A* (2012) Molluscs. *Current Biol* 22 (13): R510–514. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.039>
2. *Zaitsev YP* (1986) Contourionts in ocean monitoring. *Environ Monit Assess* 7 (1): 31–38. <https://doi.org/10.1007/BF00398026>
3. *Berger VJ, Kharazova AD* (1997) Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. *Hydrobiologia* 355: 115–126.
4. *Miyamoto Y, Iwanaga C* (2017) Effects of sulphide on anoxia-driven mortality and anaerobic metabolism in the ark shell *Anadara kagoshimensi*. *J Mar Biol Assoc UK* 97 (2): 329–336. <https://doi.org/10.1017/S0025315416000412>
5. *Storey KB, Storey JM* (2004) Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biol Rev* 79: 207–233. <https://doi.org/10.1017/s1464793103006195>
6. *Storey KB* (2004) Gene regulation in physiological stress. *Inter Congress Ser* 1275: 1–13.
7. *Larade K, Storey KB* (2002) A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. *Cell and molecular responses to stress*. Vol. 3. Sensing, signaling and cell adaptation. 2002.
8. *Tielens A, Van Hellemond J* (1998) The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* 1365: 71–78. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(98\)00045-0](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(98)00045-0)
9. *Kladchenko ES, Andreyeva AY, Kukhareva TA, Soldatov AA* (2020) Morphologic, cytometric and functional characterisation of *Anadara kagoshimensis* hemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 98: 1030–1032.
10. *Rosenberg R, Nilsson HC, Diaz RJ* (2001) Response of benthic fauna and changing sediment redox profiles over a hypoxic gradient. *Estuar Coast Shelf S* 53 (3): 343–350.
11. *Hilbish TJ, Mullinax A, Dolven SI, Meyer A, Koehn RK, Rawson P* (2000) Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus spp.*): routes and timing of transequatorial migration. *Mar Biol* 136: 69–77. <https://doi.org/10.1007/s002270050010>
12. *Benali I, Boutiba Z, Merabet A, Chèvre N* (2015) Integrated use of biomarkers and condition indices in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for monitoring pollution and development of biomarker index to assess the potential toxic of coastal sites. *Marine Pollution Bull* 95: 385–394.
13. *Kulikova AD, Soldatov AA, Andreenko TI* (2015) Tissue transaminase activities in the black-sea mollusc *Mytilus galloprovincialis* Lam. with different shell color. *J Evol Biochem Physiol* 51 (1): 23–31. <https://doi.org/10.1134/S0022093015010044>
14. *Ribera D, Narbonne JF, Michel X, Livingstone DR, O'Hara S* (1991) Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp Biochem Physiol* 100C: 177–181. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90149-n](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90149-n)
15. *Soldatov AA, Gostyukhina OL, Golovina IV* (2008) State of the antioxidant enzyme complex in tissues of the Black Sea mollusc *Mytilus galloprovincialis* under natural oxidative stress. *J Evol Biochem Physiol* 44 (2): 175–182. <https://doi.org/10.1134/S0022093008020047>
16. *Soldatov AA, Gostyukhina OL, Golovina IV* (2014) Functional states of antioxidant enzymatic complex of tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. under conditions of oxidative stress. *J Evol Biochem Physiol* 50 (3): 206–214.
17. *Kamyshnikov VS* (2004) Handbook of Clinical and biochemical studies and laboratory diagnostics. M. MEDpress-inform. 494 p.
18. *Lantushenko AO, Vodiasova EA, Kokhan AS, Meger YaV, Soldatov AA* (2023) Aldolase of *Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819: Gene structure, tissue specificity of expression level and activity. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Molecular Biol* 267: Art. no. 110862 (8 p.). <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2023.110862>
19. *Kolesnikova EE, Golovina IV* (2020) Oxidoreductase Activities in Oxyphilic Tissues of the Black Sea Ruff *Scorpaena porcus* under Short-term Hydrogen Sulfide Loading. *J Evol Biochem Physiol* 56 (5): 459–470. <https://doi.org/10.1134/S0022093020050099>
20. *Rezyapkin VI, Slyshenkov VS, Zavodnik IB, Burd VN, Sushko LI, Romanchuk EI, Karaedova LM* (2009) Laboratory workshop on biochemistry and biophysics. Grodno. GrSU.

21. *Itzhaki RF, Gill DM* (1964) A micro-biuret method for estimating proteins. *Analytical Biochemistry* 9 (4): 401–410.
22. *Holm-Hansen O, Booth CR* (1966) The measurement of adenosine triphosphate in the Ocean and its ecological significance. *Limnol Oceanogr* 11 (4): 510–519.
<https://doi.org/10.4319/lo.1966.11.4.0510>
23. *Atkinson DE* (1968) The energy charge of the adenylate pools as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7 (11): 4030–4034.
<https://doi.org/10.1021/bi00851a033>
24. *Iverson TM* (2013) Catalytic mechanisms of complex II enzymes: A structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta* 1827 (5): 648–657.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2012.09.008>
25. *Bacchiocchi S, Principato G* (2000) Mitochondrial contribution to metabolic changes in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* during anaerobiosis. *J Exp Zool* 286: 107–113.
26. *Soldatov AA, Andreenko TI, Sysoeva IV, Sysoev AA* (2009) Tissue specificity of metabolism in the bivalve mollusc *Anadara anaequivalvis* Br. under conditions of experimental anoxia. *J Evol Biochem Physiol* 45 (3): 349–355.
<https://doi.org/10.1134/S002209300903003X>
27. *Harcet M, Perina D, Pleše B* (2013) Opine dehydrogenases in marine invertebrates. *Biochem Genet* 51 (9): 666–676.
<https://doi.org/10.1007/s10528-013-9596-7>
28. *Vázquez-Dorado S, De Carlos A, Comesaña AS, Sanjuán A* (2013) Phylogenetic comparison of opine dehydrogenase sequences from marine invertebrates. *Biochem Genet* 51 (1–2): 54–65.
<https://doi.org/10.1007/s10528-012-9551-z>
29. *Zammit VA* (1978) Possible relationship between energy metabolism of muscle and oxygen binding characteristics of haemocyanin of cephalopods. *J Mar Biol Assoc UK* 58:421–424.
<https://doi.org/10.1017/S0025315400028083>
30. *Vázquez-Dorado SSanjuan A, Comesaña AS, Carlos A* (2011) Identification of octopine dehydrogenase from *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Biochem Physiol Part B* 160: 94–103.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.07.003>
31. *Storey KB, Dando PR* (1982) Substrate specificities of octopine dehydrogenases from marine invertebrates. *Comp Biochem Physiol B Comp Biochem* 73: 521–528.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90069-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90069-4)
32. *Gosling E* (1981) Ecological genetics of the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on Irish coasts. *Marine Ecology Progress Series* 4 (2): 221–227.
<https://doi.org/10.3354/meps004221>
33. *Sokolova IM, Sokolov EP, Fouzia Haider F* (2019) Mitochondrial Mechanisms Underlying Tolerance to Fluctuating Oxygen Conditions: Lessons from Hypoxia-Tolerant Organisms. *Integr Comp Biol* 59 (4): 938–952.
<https://doi.org/10.1093/icb/icz047>
34. *Ivanina AV, Irina Nesmelova I, Leamy L, Sokolov EP, Sokolova IM* (2016) Intermittent hypoxia leads to functional reorganization of mitochondria and affects cellular bioenergetics in marine molluscs. *J Exp Biol* 219 (Pt 11): 1659–1674.
<https://doi.org/10.1242/jeb.134700>
35. *Hardie DG* (2003) Minireview. The AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144: 5179–5183.
<https://doi.org/10.1210/en.2003-0982>
36. *Goodchild CG, Frederich M, Zeeman SI* (2015) AMP-activated protein kinase is a biomarker of energetic status in freshwater mussels exposed to municipal effluents. *Sci Total Environ* 512–513: 201–209.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.065>
37. *Guévelou E, Huvet A, Sussarellu R, Milan M, Guo X, Li L, Zhang G, Quillien V, Daniel JY, Quéré C, Boudry P, Corporeau C* (2013) Regulation of a truncated isoform of AMP-activated protein kinase α (AMPK α) in response to hypoxia in the muscle of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Comp Physiol B* 183 (5): 597–611.
<https://doi.org/10.1007/s00360-013-0743-6>
38. *Sokolov EP, Markert S, Hinzke T, Hirschfeld C, Becher D, Ponsuksili S, Sokolova IM* (2019) Effects of hypoxia-reoxygenation stress on mitochondrial proteome and bioenergetics of the hypoxia-tolerant marine bivalve *Crassostrea gigas*. *J Proteomics* 194: 99–111.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.009>
39. *Longnus SL, Wambolt RB, Parsons HL, Brownsey RW, Allard MF* (2003) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis by allosteric mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R936–R944.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00319.2002>
40. *Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA* (2005) The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* 280: 29060–29066.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M503824200>
41. *Vodáková B, Douda K* (2019) Variation in Glycogen Distribution among Freshwater Bivalve Tissues: Simplified Protocol and Implications. *J Aquat Anim Health* 31 (1): 107–111. Epub 2019 Feb 4.
<https://doi.org/10.1002/aah.10057>
42. *Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, Chen Z-P, Murthy S, Walter M, Gupta A, Adams JJ, Katsis F, van Denderen B, Jennings IG, Iseli T, Michell BJ, Witters LA* (2003) AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans* 31: 162–168.
<https://doi.org/10.1042/bst0310162>
43. *Barnes BR, Marklund S, Steiler TL, Walter M, Hjälrm G, Amarger V, Mahlapuu M, Leng Y, Johansson C, Galuska D, Lindgren K, Abrink M, Stapleton D, Zierath JR, Andersson L* (2004) The 5'-AMP-activated protein kinase 3 isoform has a key role in carbohydrate and lipid metabolism in glycolytic skeletal muscle. *J Biol Chem* 279: 38441–38447.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M405533200>

PARAMETERS OF ENERGY METABOLISM AND ADENYLATE SYSTEM OF MYTILUS GALLOPROVINCIALIS TISSUES (LAMARCK. 1819) IN CONDITIONS OF MODERATE HYPOXIA

A. S. Kokhan^a, A. A. Soldatov^{a,b,#}, I. V. Golovina^a, Yu. V. Bogdanovich^a,
N. E. Shalagina^a, and V. N. Rychkova^a

^a*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russia*

^b*Sevastopol State University, Sevastopol, Russia*

[#]*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru*

The effect of moderate hypoxia on the processes of energy metabolism in the tissues (gills, hepatopancreas) of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819) was studied experimentally. The control group of mollusks contained 6.8–6.9 mgO₂ l⁻¹, the experimental group at 1.9–2.0 mgO₂ l⁻¹. In both cases, the water temperature was 22 ± 1°C, the salinity was 17–18‰. The exposition – 72 hours. The oxygen content in the water was lowered by bubbling with nitrogen gas for 4–5 hours. In conditions of moderate hypoxia, a complex of reactions aimed at maintaining the energy status of tissues developed in the body of the Mediterranean mussel. Aerobic processes were clearly limited, as evidenced by a decrease in succinate dehydrogenase (SDH) activity. At the same time, the processes of anaerobic glycolysis intensified. The activity of aldolase, malate dehydrogenase (MDH) increased, the content of pyruvate in tissues increased. This was not accompanied by an increase in lactate dehydrogenase (LDH) activity and an increase in lactate content. The tissues retained their original energy status. The content of the ATP fraction remained at the level of control values, which reflected the adaptive orientation of the reorganization of tissue metabolism. The ability of hepatopancreas to accumulate ADP and AMP fractions from circulation systems under experimental hypoxic load was noted.

Keywords: moderate hypoxia, adenylate system, succinate dehydrogenase, glycolysis enzymes, glycolytic metabolites, gills, hepatopancreas, *Mytilus galloprovincialis*