

УДК [594.1:591.044]:577.1

ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ И СЕРОВОДОРОДНОГО ЗАРАЖЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И АДЕНИЛАТНЫЙ КОМПЛЕКС ТКАНЕЙ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906)

© 2024 г. А. А. Солдатов^{1, 2}, * (ORCID: 0000-0002-9862-123X),
Ю. В. Богданович¹ (ORCID: 0000-0002-8239-4968),
Н. Е. Шалагина¹ (ORCID: 0000-0001-6195-6135),
В. Н. Рычкова¹ (ORCID: 0000-0003-3797-715X)

¹Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского (ИнБЮМ) РАН, Севастополь 299011, Россия

²Севастопольский государственный университет, Севастополь 299053, Россия

*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.05.2024 г.

После доработки 30.07.2024 г.

Принята к публикации 15.08.2024 г.

В условиях эксперимента исследовано раздельное влияние острой гипоксии и сероводородной нагрузки на маркерный фермент дыхательной цепи митохондрий – сукцинатдегидрогеназу (СДГ) и аденилатный статус тканей толерантного к данной группе факторов двусторчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Работа выполнена на взрослых особях с высотой раковины – 23–34 см. Контрольную группу моллюсков содержали в воде с концентрацией кислорода 7.0–8.2 мгО₂/л. Одну экспериментальную группу подвергали воздействию острой гипоксии (0.1 мгО₂/л), а другую сероводородной нагрузке (6 мгS²⁻/л). Экспозиция в обоих случаях составляла 48 ч. Температура воды поддерживалась на уровне 17–20°C. Острая гипоксия вызывала рост активности СДГ во всех исследованных тканях (жабры, нога, гепатопанкреас). При сероводородной нагрузке этой реакции не наблюдали. Энергетический статус тканей в обоих случаях понижался. Это выражалось в снижении содержания фракций АТФ и АДФ на фоне повышения содержания АМФ, что допускает реализацию аденилаткиназной реакции. В присутствии сероводорода данные изменения были более заметны. При этом пул аденилатов и величина аденилатного энергетического заряда (АЭЗ) сохранялись на относительно высоком уровне, что отражало способность организма анадары существовать в придонных слоях воды, при низком уровне кислорода и в присутствии сероводорода. Допускается, что митохондрии анадары обладают альтернативной оксидазой, не чувствительной к присутствию сульфидов в воде.

Ключевые слова: *Anadara kagoshimensis*, сероводород, гипоксия, сукцинатдегидрогеназа, аденилатный комплекс, ткани

DOI: 10.31857/S0134347524060023

Тихоокеанский двусторчатый моллюск *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) был занесен в азово-черноморский регион с балластными водами (Шиганова, 2010). Впервые был обнаружен в 1968 г. у побережья Кавказа на глубине 20–30 м (Киселёва, 1992). В настоящее время массовые поселения моллюска отмечаются вдоль западного и восточного побережий

Черного моря (Ревков, 2016), а в последнее время и в Азовском море (Живоглядова и др., 2021). На ряде участков Крымского шельфа он превратился в одну из ценозообразующих форм бентоса (Ревков, 2016). Столь быстрое распространение анадары в азово-черноморском регионе связывают с ее эврибионтностью и, прежде всего, со способностью к существованию

в акваториях с экстремально низкой концентрацией кислорода и присутствием сероводорода (Солдатов и др., 2018). Шельфовые зоны крымского полуострова подвержены влиянию этих факторов, чему способствуют специфические вертикальные течения (апвеллинги), а также образование застойных зон с отсутствием сквозной вертикальной конвекции вод (Орехова, Коновалов, 2018).

В работах ряда авторов показано, что организм анадары может поддерживать высокий энергетический статус тканей в условиях острой гипоксии (Cortesi et al., 1992), а также переносить присутствие сероводорода в морской среде (2 ммоль/л) (Miyamoto, Iwanaga, 2017; Nakano et al., 2017). Токсичность сероводорода связывают с его способностью ингибировать цитохром-с-оксидазу дыхательной цепи митохондрий (Cooper, Brown, 2008; Cao et al., 2011), переводить гемсодержащие белки в сульф-форму (Bagarinao, 1992; Grieshaber, Völkel, 1998), подавлять экспрессию транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией (Wu et al., 2012). Вместе с тем, многие организмы проявляют выраженную устойчивость к присутствию сероводорода в воде. К ним можно отнести рыб семейства гамбузиевых (Poeciliidae), обнаруженных в сероводородных источниках на юге Мексики (Tobler et al., 2008, 2011), обитателя застойных вод Амазонки голубого сомика *Hoplosternum littorale* (Brauner et al., 1995), погонофор (*Riftia pachyptila*) (Arp, Childress, 1981; Arp, Childress, 1983) и ряд других организмов.

Исследуя природу устойчивости гидробионтов к токсическому действию сероводорода, следует обратить внимание на следующие процессы: сульфидаокисляющую микрофлору, поселяющуюся на респираторных поверхностях, и ее способность к нейтрализации сероводородной нагрузки (Stewart, Cavanaugh, 2006); способность ряда организмов переводить сульфиды в тиосульфаты (Bagarinao, Vetter, 1993); наличие в гемолимфе моллюсков особого транспортного белка, а также гемоглобинов, нечувствительных к сероводороду (Arp, Childress, 1981; Arp, Childress, 1983); присутствие в эритроцитах ряда моллюсков особых зернистых включений (Kladchenko et al., 2020), содержащих гематин, который способен окислять сульфиды (Vismann, 1993; Holden et al., 1994). Последнее

было показано и в отношении анадары (Солдатов и др., 2018).

В токсическом действии сероводорода следует выделить две составляющие: прямой эффект, о чем сказано выше, и действие острой гипоксии (аноксии), которое обычно сопровождает токсический эффект сероводорода. Ранее нами было изучено влияние сероводородной нагрузки на организм анадары, где гипоксические эффекты и действие сульфидов не разделялись (Солдатов и др., 2022). Настоящее исследование посвящено изучению раздельного действия этих факторов. При этом оценен иной комплекс показателей.

Цель работы – исследовать в условиях эксперимента раздельное влияние острой гипоксии и сероводородной нагрузки на маркерный фермент дыхательной цепи митохондрий – сукцинатдегидрогеназу, и аденилатный статус тканей толерантного к данной группе факторов двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на взрослых особях двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis*, собранных в июне 2022 г. в акватории б. Ласпи (Крым). Высота раковины моллюсков (от замка до края створки) варьировала от 23 до 34 мм.

Схема эксперимента

Контрольную группу моллюсков содержали при 7.0–8.2 мгО₂/л (группа 1). Содержание кислорода понижали путем барботажа воды азотом в течение двух часов. Финальная концентрация кислорода в опытной группе составляла 0.1 мгО₂/л (группа 2). Сероводородное заражение создавали добавляя в емкость с моллюсками Na₂S до финальной концентрации 6 мгS²⁻/л. При этом максимальная концентрация сульфидов для вод Черного моря составляет 9.6 мгS²⁻/л (Орехова, Коновалов, 2018). Содержание кислорода в воде предварительно понижали до следовых количеств (группа 3). Экспозиция в обоих случаях составляла 48 ч. Температуру воды в опытной и контрольной группах поддерживали на уровне 17–20 °C. Присутствие в воде сульфид-иона приводило к ее защелачиванию, которое компенсировали внесением 0.1н HCl. Значения pH удерживали

на уровне 8.2–8.3. Случаев гибели моллюсков в контрольной и опытных группах на протяжении 48 ч не отмечали.

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

Биохимические исследования

Препарирование и подготовку тканей (нога, жабры, гепатопанкреас) к хранению осуществляли на ледяной бане при температуре 0–4 °C. Образцы до определения активности ферментов хранили при температуре –80 °C в морозильной камере (Farma 900 Series, ThermoScientific, USA). Приготовление гомогенатов осуществляли непосредственно в день эксперимента. В качестве трансформирующей среды использовали 1.15% раствор KCl. Для получения супернатанта гомогенаты центрифугировали при 6000 об/мин в течение 15 мин. В работе использовали рефрижераторную центрифугу 5424R Eppendorf (Germany). Все операции с материалом осуществляли на холода при 0–4 °C.

Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) (КФ 1.3.99.1) определяли при длине волны 420 нм по скорости восстановления феррицианида калия (Ещенко, Вольский, 1982). В качестве трансформирующей среды использовали 0.1 М калий-фосфатный буфер. Активность выражали в нмоль сукцината/мин/мг белка. Содержание белка в пробах контролировали микробиуретовым методом (Itzhaki, Gill, 1964). В работе использовали двухлучевой спектрофотометр “SPECS SSP-715” (Россия).

Содержание адениловых нуклеотидов регистрировали при помощи хемилюминисцентного метода (Holm-Hansen, Booth, 1966). Результаты выражали в мкмолях/мг сырой массы ткани. Исследуемые ткани гомогенизировали в 0.1М трикс-ацетатном буфере на холода (pH 7.75). 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 ATP-Luminometer 1250 (LKB, Швеция). АДФ и АМФ восстанавливали до АТФ с применением энзимов пируваткиназы и аденилаткиназы. На основании полученных значений рассчитывали аденилатный энергетический заряд (АЭЗ) (Atkinson, 1968).

Статистическая обработка

При проведении сравнительного анализа был применен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) PAST Version 4.09 software. Статистические сравнения проводили на основе непараметрического U –критерия Манна–Уитни. Цифровой материал обработан с использованием стандартного пакета Grapher (версия 11). Результаты представлены как $M \pm m$. Минимальный уровень значимости составлял $p < 0.05$. На каждую группу моллюсков (контроль, опыт 1 и 2) приходилось по 9 особей анадары. От каждого экземпляра получали по 3 образца ткани (81 пробы). При проведении биохимических исследований каждую пробу анализировали трижды (243 анализа на СДГ и 243 анализа на аденилаты). Объем выборочных совокупностей указан на графиках.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активность СДГ

Активность СДГ в жабрах контрольной группы моллюсков, содержащихся в условиях нормоксии (7.0–8.2 мгO₂/л), составляла 10.5 ± 3.4 нмоль сукцината/мин/мг белка (рис. 1). В ноге и гепатопанкреасе она была на 32–39% ниже ($p < 0.01$). В условиях острой гипоксии (0.1 мгO₂/л) отмечали рост активности СДГ во всех тканевых структурах анадары. Наибольшие различия были отмечены для ноги – в 2.3–2.4 раза ($p < 0.01$). Для остальных тканей (жабры, гепатопанкреас) они находились на уровне 50–90% ($p < 0.05$ для гепатопанкреаса). Сероводородная нагрузка (6 мгS^{2–}/л) не вызывала заметных изменений активности СДГ. Она сохранялась на уровне контрольных значений. Имеющиеся различия не были статистически значимыми.

Аденилатный комплекс

Самый высокий пул аденилатов был отмечен в ноге моллюска – 12.6 ± 0.2 мкмоль/мг ткани

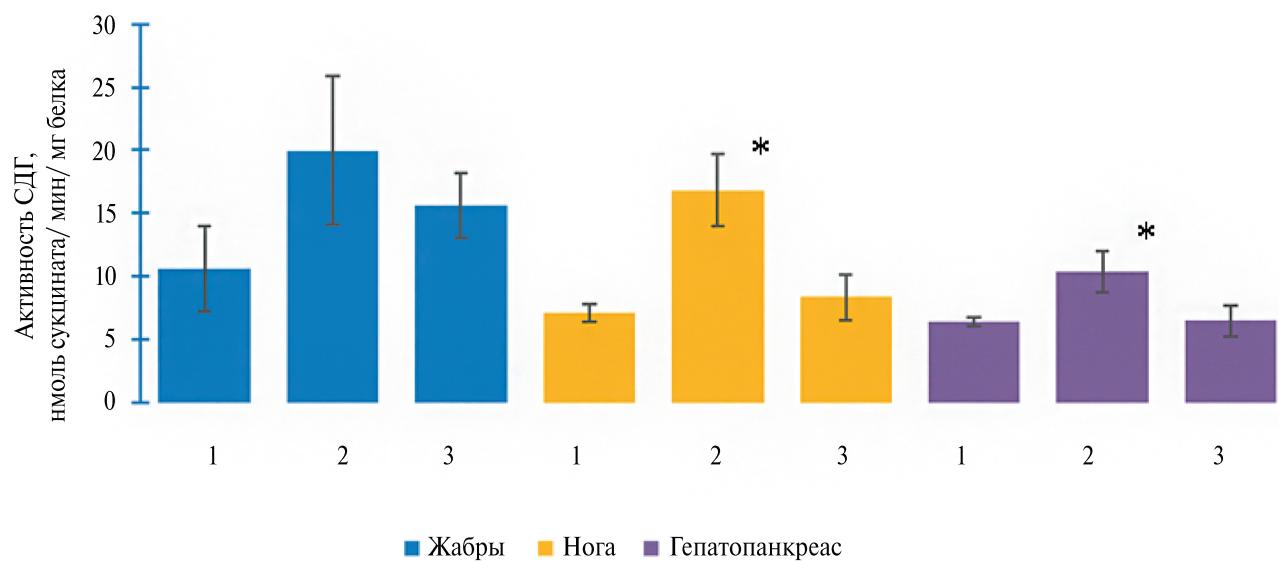


Рис. 1. Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в тканях анадары (1 – нормоксия; 2 – острая гипоксия; 3 – сероводородная нагрузка; * $p < 0.05$ относительно контроля; * $p < 0.05$ относительно контроля; $n = 9$).

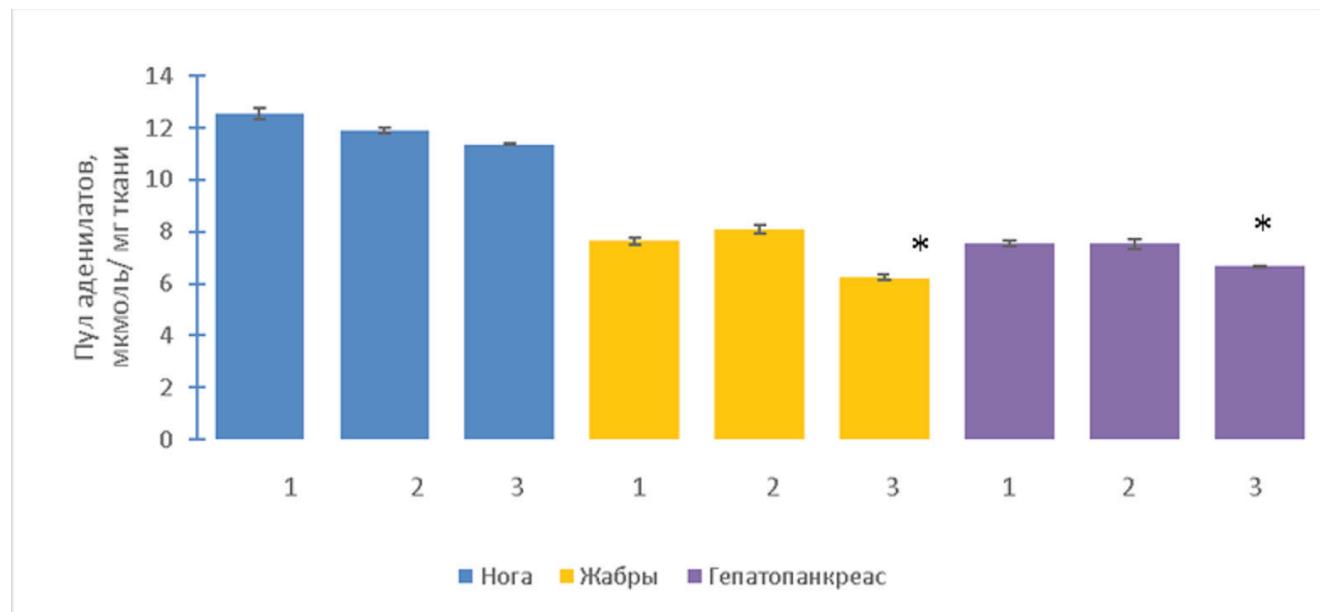


Рис. 2. Пул аденилатов в тканях анадары (1 – нормоксия; 2 – острая гипоксия; 3 – сероводородная нагрузка; $n = 9$).

(рис. 2). В жабрах и гепатопанкреасе он не превышал 8 мкмоль/мг ткани. Острая гипоксия не вызывала изменений значений данного показателя. При сероводородной нагрузке пул аденилатов был минимальен. По сравнению с контролем различия составляли 8–11%, что можно считать несущественным ($p > 0.05$).

Анализ содержания отдельных фракций показал снижение уровня АТФ во всех тканях моллюска при гипоксии и в присутствии

сероводорода. Максимальный уровень АТФ наблюдали в ноге – 5.87 ± 0.15 мкмоль/мг ткани (рис. 3). При гипоксии значения понижались на 20% ($p < 0.05$), а в присутствии сероводорода – на 33% ($p < 0.05$). Аналогичные изменения отмечали в отношении жабр и гепатопанкреаса ($p < 0.05$). Особенностью реакции аденилатной системы анадары на экспериментальные воздействия было также понижение содержания фракции АДФ на фоне увеличения доли АМФ.

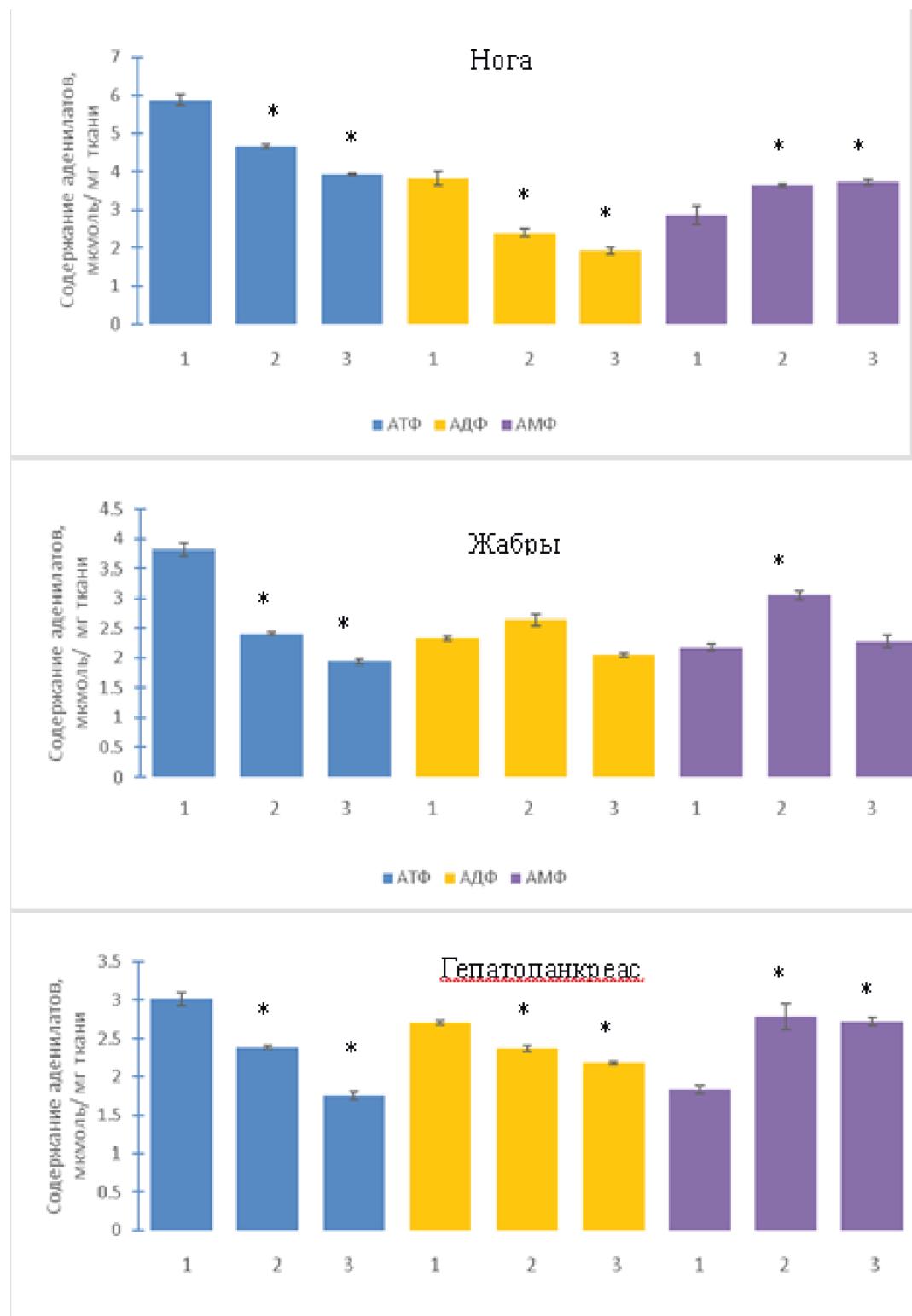


Рис. 3. Содержание отдельных фракций аденилатов (АТФ, АДФ, АМФ) в тканях анадары (1 – нормоксия; 2 – острая гипоксия; 3 – сероводородная нагрузка; $*p < 0.05$ относительно контроля; $n = 9$).

Это отмечали в ноге и гепатопанкреасе моллюска ($p < 0.05$). Наиболее выраженные изменения наблюдали в условиях сероводородной нагрузки. В жабрах реакция была не столь однозначна. В условиях острой гипоксии отмечали одновременный рост фракций АДФ и АМФ

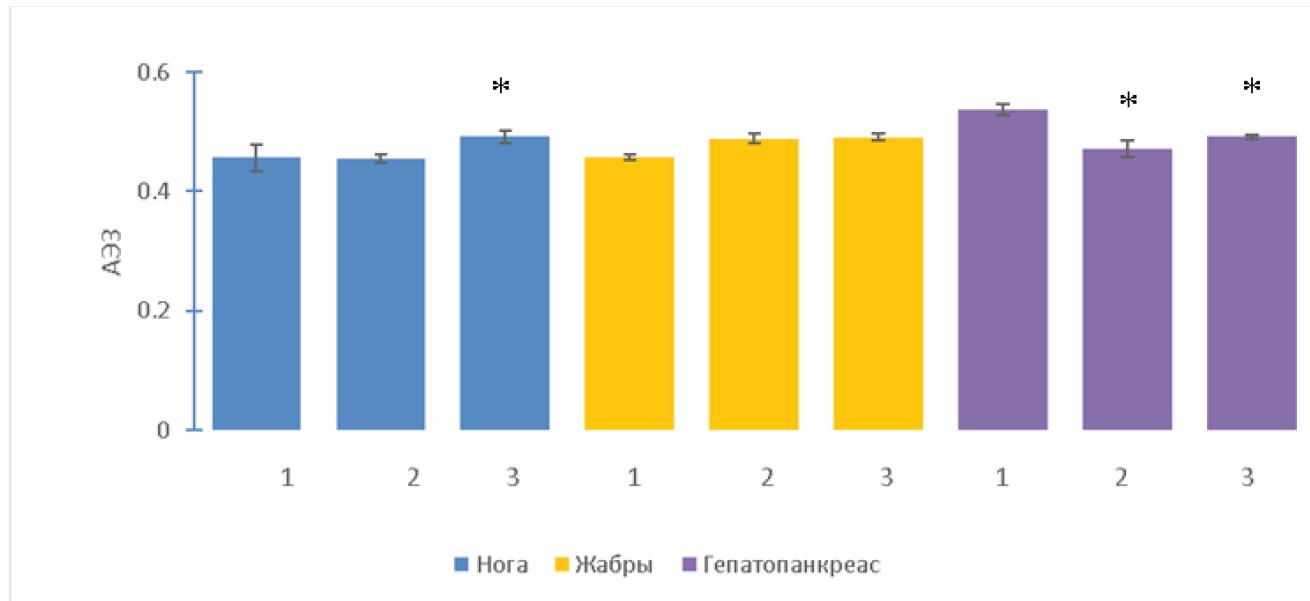


Рис. 4. Аденилатный энергетический заряд (АЭЗ) в тканях анадары (1 – нормоксия; 2 – острая гипоксия; 3 – сероводородная нагрузка; $*p < 0.05$ относительно контроля; $n = 9$).

($p < 0.05$), а присутствие сероводорода не вызывало заметных изменений данных показателей относительно контрольных величин.

Расчет величины АЭЗ для ноги и жабр показал отсутствие заметных изменений данного показателя в условиях тестовых нагрузок (рис. 4). В присутствии сероводорода данная величина даже имела тенденцию роста. Некоторое понижение значений АЭЗ отмечали в отношении гепатопанкреаса. По сравнению с контрольными величинами оно составило 8–12% ($p > 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Острая гипоксия

Обнаружение роста активности СДГ во всех тканях анадары в условиях острой гипоксии явилось одним из однозначных результатов настоящей работы. Причина этого до конца непонятна. Известно, что СДГ является ключевым элементом комплекса II дыхательной цепи митохондрий, который функционально сопряжен с железосерными белками и коэнзимом Q (комплекс I) (Moosavi et al., 2019). Можно предположить, что в условиях гипоксии растет степень восстановленности пиридиновых нуклеотидов, акцептором которых являются компоненты комплекса I. Это должно снижать уровень оксалоацетата, который является конкурентным ингибитором СДГ и приводить к росту

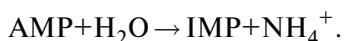
активности фермента. Данная реакция должна иметь ряд позитивных следствий. С одной стороны, она позволяет перераспределять гликолитические субстраты в направлении сукцинатата и поддерживать функциональную активность митохондрий в условиях острой гипоксии (Bacchicocchi, Principato, 2000). С другой стороны, известна протекторная роль сукцинатата в отношении мембран митохондрий (Bacchicocchi, Principato, 2000), препятствующая избыточной продукции активных форм кислорода в условиях гипоксии (Grivennikova, Vinogradov, 2013; Cadenas, 2018). Ранее было показано, что сочетанное действие острой форм гипоксии и сероводородного заражения вызывало сокращение числа митохондриальных единиц почти на 50%, при одновременном росте уровня активных форм кислорода в клетке (Солдатов и др., 2022). Это означает, что глюкозо-сукцинатное направление метаболизма возможно только в условиях гипоксии. Присутствие сероводорода блокирует данный процесс.

Ограничение окислительных процессов в тканях в условиях острой гипоксии сказывалось на состоянии аденилатной системы анадары. Содержание фракции АТФ понижалось, что изначально было ожидаемо. Это происходило на фоне снижения содержания АДФ и роста АМФ, что допускает реализацию

аденилаткиназной реакции в тканях моллюска (Dzeja, Terzic, 2009):



Известно, что избыточный прирост фракции АМФ должен активизировать пурин-нуклеотидный цикл (цикл Ловенштейна) и приводить к снижению пула аденилатов в целом (Lowenstein, 1972):



В нашем случае пул аденилатов фактически не изменялся и даже наблюдался некоторый прирост АЭЗ (жабры). Незначительное снижение АЭЗ было показано для гепатопанкреаса. Из вышесказанного следует, что состояние моллюска в условиях острой гипоксии было относительно устойчивым. Критических изменений в энергетическом статусе тканей не наблюдали.

Величина АЭЗ у контрольной группы моллюсков находилась на уровне 0.45–0.55, что соответствовало умеренному уровню метаболической депрессии (Лукьянова, 2004; Atkinson, 1968). Следует также отметить, что организм анадары в сравнении с другими видами двустворок (*Mytilus galloprovincialis*) в условиях нормоксии потребляет в 5–6 раз меньше кислорода (Soldatov et al., 2009). Поэтому сохранение высокого энергетического статуса тканей при крайне низком содержании кислорода (0.1 мг О₂/л) в целом отражает функциональные возможности данного вида моллюска.

Сероводородная нагрузка

В отличие от острой гипоксии сероводородная нагрузка не вызывала изменений активности СДГ. Это позволяет предположить сохранение степени восстановленности пиридиновых нуклеотидов комплекса I дыхательной цепи митохондрий на уровне контрольных значений и ингибирующей роли оксалоацетата в отношении СДГ. Такое состояние возможно только при дальнейшем функционировании дыхательной цепи, несмотря на ингибирующий эффект сероводорода в отношении цитохром-с-оксидазы (Yusseppone et al., 2018). В основе его может лежать группа реакций, контролируемых альтернативной оксидазой (АОХ). Данный фермент

был обнаружен в митохондриях моллюсков (van Hellemond et al., 2003). Он не чувствителен к действию сульфидов и сопрягает окисление убихинола с кислородом с образованием воды, то есть способствует функционированию дыхательной цепи митохондрий в момент ингибирования цитохром-с-оксидазы. Следует отметить, что АОХ отклоняет электроны от комплексов III и IV, осуществляющих аэробный ресинтез АТФ, что должно приводить к снижению энергетического статуса тканей.

Анализ состояния аденилатной системы тканей анадары подтвердил данное предположение. В присутствии сероводорода содержание фракций АТФ и АДФ было минимально. Это также допускает реализацию аденилаткиназной реакции. При этом отмечено незначительное снижение пула аденилатов и сохранение значений АЭЗ в тканевых структурах моллюска, что свидетельствовало об отсутствии критических изменений в энергетическом статусе тканей анадары и отражало ее способность к существованию в среде в присутствии сульфидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из представленной информации следует, что острая гипоксия вызывала рост активности СДГ во всех исследованных тканях. При сероводородной нагрузке эта реакция не наблюдалась. Допускается, что присутствие сероводорода блокирует глюкозо-сукцинатное направление метаболизма, что исключает рост активности СДГ. Общим для обоих экспериментов явилось снижение энергетического статуса тканей. Это выражалось в уменьшении содержания фракций АТФ и АДФ на фоне повышения содержания АМФ, что допускает реализацию аденилаткиназной реакции. В присутствии сероводорода данные изменения были более выражены, что может определяться повышением активности альтернативной оксидазы, отклоняющей электроны дыхательной цепи от III и IV комплексов. При этом пул аденилатов и величина АЭЗ сохранялись на относительно высоком уровне, что отражает способность организма анадары существовать в придонных слоях воды при низком уровне кислорода и в присутствии сероводорода.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны старшему научному сотруднику, к.б.н. И.В. Сысоевой и младшему научному сотруднику А.А. Сысоеву за помощь в определении параметров аденилатного комплекса тканей моллюсков.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН (госзадание № 124030100137-6).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры были выполнены в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ (2010/63/EU) и одобрены советом по биоэтике по уходу и использованию животных (протокол № 4/23 от 26.10.2023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы // Методы биохимических исследований. Л.: ЛГУ, 1982. С. 207–212.

Живоглядова Л.А., Ревков Н.К., Фроленко Л.Н., Афанасьев Д.Ф. Экспансия двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) в Азовском море // Российск. журн. биол. инвазий. 2021. Т. 14. № 1. С. 83–94.

Киселева М.И. Сравнительная характеристика донных сообществ у берегов Кавказа // Многолетние изменения зообентоса Черного моря. Киев: Наукова думка, 1992. С. 84–99.

Лукьянова О.Н. АТФ-азы как неспецифические молекулярные биомаркёры состояния гидробионтов при антропогенном загрязнении // Тезисы докл. II международ. науч. конф. “Биотехнология – охране окружающей среды”. М.: МГУ, 2004. С. 124.

Орехова Н.А., Коновалов С.К. Кислород и сульфиды в донных отложениях прибрежных районов севастопольского региона Крыма // Океанология. 2018. Т. 58. № 5. С. 739–750.

Ревков Н.К. Особенности колонизации Черного моря недавним вселенцем – двустворчатым моллюском *Anadara kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae) // Морск. биол. журн. 2016. Т. 1. № 2. С. 3–17.

Солдатов А.А., Головина И.В., Колесникова Е.Э. и др. Влияние сероводородной нагрузки на активность ферментов энергетического обмена и эденилатную систему тканей моллюска *Anadara kagoshimensis* // Биол. внутренних вод. 2022. № 5. С. 558–566.

Солдатов А.А., Кухарева Т.А., Андреева А.Ю., Ефремова Е.С. Эритроидные элементы гемолимфы двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) в условиях сочетанного действия гипоксии и сероводородной нагрузки // Биол. моря. 2018. Т. 44. № 6. С. 390–394.

Шиганова Т.А. Проект “Вселенцы”, Гос. контракт с Министерством образования и науки РФ от 20 сентября 2010 г. № 14.740.11.0422. (Институт Океанологии им. П.П. Ширшова РАН).

Arp A.J., Childress J.J. Blood function in the hydrothermal vent vestimentiferan tube worm // Science. 1981. V. 213. № 4505. P. 342–344.

Arp A.J., Childress J.J. Sulfide binding by the blood of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* // Science. 1983. V. 219. № 4582. P. 295–297.

Atkinson D.E. The energy charge of the adenylate pools as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers // Biochemistry. 1968. V. 7. № 11. P. 4030–4034. <https://doi.org/10.1021/bi00851a033>

Bacchicocchi S., Principato G. Mitochondrial contribution to metabolic changes in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* during anaerobiosis // J. Exp. Zool. 2000. V. 286. № 2. P. 107–113.

Bagarinao T. Sulfide as an environmental factor and toxicant: tolerance and adaptations in aquatic organisms // Aquat. Toxicol. 1992. V. 24. № 1–2. P. 21–62. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90015-F](https://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90015-F)

Bagarinao T., Vetter R. Sulphide tolerance and adaptation in the California killifish, *Fundulus parvipinnis*, a salt marsh resident // J. Fish Biol. 1993. V. 42. № 5. P. 729–748. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1993.tb00381.x>

Brauner C.J., Ballantyne C.L., Randall D.J., Val A.L. Air breathing in the armored catfish (*Hoplosternum littorale*) as an adaptation to hypoxic, acidic, and hydrogen sulphide rich waters // Can. J. Zool. 1995. V. 73. № 4. P. 739–744.

Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection // Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 2018. V. 1859. № 9. P. 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.05.019>

- Cao Y., Wang H.G., Cao Y.Y. et al.* Inhibition effects of protein-conjugated amorphous zinc sulfide nanoparticles on tumor cells growth // *J. Nanopar. Res.* 2011. V. 13. P. 2759–2767.
- Cooper C.E., Brown G.C.* The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2008. V. 40. P. 533–539.
- Cortesi P., Cattani O., Vitali G.* Physiological and biochemical responses of the bivalve *Scapharca inaequivalvis* to hypoxia and cadmium exposure: erythrocytes versus other tissues // *Marine Coastal Eutrophication: Proc. Int. Conf. (March 21–24, 1990)*. Bologna, Italy, 1992. P. 1041–1054.
- Dzeja P., Terzic A.* Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing // *Int. J. Mol. Sci.* 2009. V. 10. № 4. P. 1729–1772.
<https://doi.org/10.3390/ijms10041729>
- Grieshaber M.K., Völkel S.* Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide // *Annu. Rev. Physiol.* 1998. V. 60. P. 33–53.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.33>
- Grivennikova V.G., Vinogradov A.D.* Mitochondrial production of reactive oxygen species // *Biochemistry (Moscow)*. 2013. V. 78. № 13. P. 1490–1511.
<https://doi.org/10.1134/S0006297913130087>
- Holden J.A., Pipe R.K., Quaglia A., Ciani G.* Blood cells of the arcid clam, *Scapharca inaequivalvis* // *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 1994. V. 74. № 2. P. 287–299.
- Holm-Hansen O., Booth C.R.* The measurement of adenosine triphosphate in the Ocean and its ecological significance // *Limnol. Oceanogr.* 1966. V. 11. № 4. P. 510–519. <https://doi.org/10.4319/lo.1966.11.4.0510>
- Itzhaki R.F., Gill D.M.* A micro-biuret method for estimating proteins. // *Anal. Biochem.* 1964. V. 9. № 4. P. 401–410.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(64\)90200-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(64)90200-3)
- Kladchenko E.S., Andreyeva A.Yu., Kukhareva T.A., Soldatov A.A.* Morphologic, cytometric and functional characterisation of *Anadara kagoshimensis* hemocytes // *Fish Shellfish Immunol.* 2020. V. 98. P. 1030–1032.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.061>
- Lowenstein J.M.* Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle // *Physiol. Rev.* 1972. V. 52. № 2. P. 382–414.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1972.52.2.382>
- Miyamoto Y., Iwanaga C.* Effects of sulphide on anoxia-driven mortality and anaerobic metabolism in the ark shell *Anadara kagoshimensis* // *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 2017. V. 97. № 2. P. 329–336.
- Moosavi B., Berry E.A., Zhu X.L. et al.* The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics // *Cell Mol. Life Sci.* 2019. V. 76. P. 4023–4042. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03200-7>
- Nakano T., Yamada K., Okamura K.* Duration rather than frequency of hypoxia causes mass mortality in ark shells (*Anadara kagoshimensis*) // *Mar. Pollut. Bull.* 2017. V. 125. № 1–2. P. 86–91.
- Soldatov A.A., Andreenko T.I., Sysoeva I.V., Sysoev A.A.* Tissue specificity of metabolism in the bivalve mollusc *Anadara inaequivalvis* Br. under conditions of experimental anoxia // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2009. V. 45. № 3. P. 349–355.
<https://doi.org/10.1134/s002209300903003x>
- Stewart F.J., Cavanaugh C.M.* Bacterial endosymbioses in *Solemya* (Mollusca: Bivalvia) – model systems for studies of symbiont-host adaptation // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2006. V. 90. P. 343–360.
- Tobler M., DeWitt T.J., Schlupp I.* Toxic hydrogen sulfide and dark caves: phenotypic and genetic divergence across two abiotic environmental gradients in *Poecilia mexicana* // *Evolution.* 2008. V. 62. № 10. P. 2643–2649.
- Tobler M., Palacios M., Chapman L.J.* Evolution in extreme environments: replicated phenotypic differentiation in livebearing fish inhabiting sulfidic springs // *Evolution.* 2011. V. 65. № 8. P. 2213–2228.
- van Hellemond J.J., van der Klei A., van Weelden S.W., Tielens A.G.* Biochemical and evolutionary aspects of anaerobically functioning mitochondria // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Soc. B.* 2003. V. 358. № 1429. P. 205–215. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1182>
- Vismann B.* Hematin and sulfide removal in hemolymph of the hemoglobin-containing bivalve *Scapharca inaequivalvis* // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1993. V. 98. P. 115–122.
- Wu B., Teng H., Yang G.* Hydrogen sulfide inhibits the translational expression of hypoxia-inducible factor-1 α // *Br. J. Pharmacol.* 2012. V. 167. № 7. P. 1492–1505.
- Yusseppone M.S., Rocchetta I., Sabatini S.E., Luquet C.M.* Inducing the alternative oxidase forms part of the molecular strategy of anoxic survival in freshwater bivalves // *Front Physiol.* 2018. V. 9. Art. ID 100.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00100>

Effect of Acute Hypoxia and Hydrogen Sulfide Contamination on the Succinate Dehydrogenase Activity and Adenylate Complex of Tissues in the Bivalve Mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906)

A. A. Soldatov^{a, b}, Yu. V. Bogdanovich^a, N. E. Shalagina^a, V. N. Rychkova^a

^a*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia*

^b*Sevastopol State University, Sevastopol 299053, Russia*

The separate effects of acute hypoxia and hydrogen sulfide load on the marker enzyme succinate dehydrogenase (SDH) of the mitochondrial respiratory chain and the adenylate status of tissues in the bivalve mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906), a species tolerant to these groups of factors, were studied under experimental conditions. The study was carried out on adult individuals with a shell height of 23–34 cm. The control group of bivalves was kept in the water with an oxygen concentration of 7.0–8.2 mgO₂/L. One experimental group was exposed to acute hypoxia (0.1 mgO₂/L) and another to hydrogen sulfide load (6 mgS²⁻/L). The exposure period in both cases was 48 h. The water temperature was maintained at 17–20°C. The acute hypoxia led to an increase in the SDH activity in all the studied tissues (gills, foot, and hepatopancreas). This reaction was not observed under the hydrogen sulfide load. The energy state of the tissues decreased in both cases. This was expressed as a decrease in the ATP and ADP content accompanied by an increase in the AMP content, which allows implementation of the adenylate kinase reaction. These changes were more pronounced in the presence of hydrogen sulfide. However, the adenylate pool and adenylate energy charge (AEC) values remained at a relatively high level, which indicates the ability of ark clam to exist in the near-bottom water layers with a low level of oxygen and the presence of hydrogen sulfide. It is assumed that ark clam's mitochondria have an alternative oxidase that is not sensitive to the presence of sulfides in water.

Keywords: *Anadara kagoshimensis*, hydrogen sulfide, hypoxia, succinate dehydrogenase, adenylate complex, tissues