

УДК 595.3:577.115.3

## СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА У ЛИТОРАЛЬНЫХ ГАММАРИД (CRUSTACEA, AMPHIPODA)

<sup>1</sup>Ткач Н.П., <sup>2</sup>Высоцкая Р.У., <sup>1</sup>Брызгин В.Ф.

<sup>1</sup>Карельский государственный педагогический университет

<sup>2</sup>Институт биологии Карельского научного центра РАН

Подробная информация об авторах размещена на сайте

«Учёные России» - <http://www.famous-scientists.ru>

**Изучен жирнокислотный состав общих липидов литоральных гаммарид Белого моря в разные сезоны года. Показано, что осеннее снижение температуры и сопряженные с ним флуктуации других абиотических и биотических факторов индуцировали сдвиги в жирнокислотном спектре в сторону снижения насыщенных и повышения доли моноеновых и полиеновых жирных кислот и в целом коэффициента ненасыщенности. Важная роль в адаптивных реакциях амфипод принадлежит полиненасыщенным высшим жирным кислотам  $\omega 3$  семейства, и в частности, докозагексаеновой кислоте (22:6 $\omega 3$ ).**

Под воздействием изменяющихся факторов среды и эндогенных ритмов у эктотермных организмов формируется адаптационный ответ, связанная, в частности, с изменением состава высших жирных кислот, как самых подвижных компонентов биомембран. Направлена данная реакция на поддержание «гомеостаза вязкости» и нормальное функционирование самой биомембраны [27]. Уровень ненасыщенности жирнокислотных радикалов, входящих в состав мембранных липидов, определяет жидкокристаллическое состояние липидного бислоя, а, следовательно, сказывается на функциональных свойствах в той или иной степени связанных с мембранами белков, на транспортной, секреторной и других клеточных функциях [4, 7, 12, 21]. Наиболее значительные адаптивные перестройки в липидном обмене водных животных вызывает температурный фактор [5]. На их биохимический состав достаточно большее влияние оказывает и физиологическое состояние гидробионтов – репродуктивный цикл, сезонная динамика активности питания, доступность и состав пищи [26]. Результаты воздействия этих факторов, оказывающих влияние на биохимический состав, в целом может служить индикатором популяционной разобщенности вида [2].

Целью работы являлось изучение влияния сезонных колебаний абиотических факторов среды и физиологического состояния литоральных ракообразных на их жирнокислотный состав.

### Материал и методы

Объектом изучения служили гаммариды – *Gammarus oceanicus* (Segerstrale, 1947) и *Gammarus duebeni* (Lilljeborg, 1851), собранные во время отлива на литорали губы Чупа Кандалакшского залива Белого моря летом и осенью 2005 г. Исследуемые рачки относятся к бореальным широко распространенным североатлантическим видам, обитающим при различной солености. *G. oceanicus* – морской эвригалинный вид, способный существовать в широком пределах солености – от нормальной морской (32-34 ‰) до сильно распресненной воды с соленостью 1-5 ‰. *G. duebeni* – солоноватоводный вид, обитающий, как правило, в опресненных участках морского побережья, где соленость варьирует от 3 до 12 ‰ [13].

Во время сбора проб температура воды в осушной зоне была летом 13-18<sup>0</sup>С (в литоральных ваннах – около 20<sup>0</sup>С), а осенью – 3-4<sup>0</sup>С.

Бокоплавы являются всеядными животными. Используют детрит, остатки животных (изопод, личинки насекомых и олигохет); отмечены случаи каннибализма

и некрофагии. В естественных условиях основу рациона рачков составляет растительная пища – зеленые и бурые водоросли [6, 13].

Собранных рачков, принадлежащих к одному виду, объединяли по 30 особей, фиксировали 90% (об.) этанолом и помещали на хранение до анализа при температуре около 4°C. Экстракцию липидов проводили по методу Фолча [20]. Жирнокислотный состав общих липидов был определен при помощи газо-жидкостной хроматографии на капиллярном хроматографе «Кристалл-5000» с пламенно-ионизационным детектором. Метилирование общих липидов проводили по Э.П. Цыганову [14]. Использовали капиллярную колонку с внутренним диаметром 0,32 мм и длиной 50 м со стационарной фазой FFAP, толщиной 0,50 мк. Анализ проводили в изотермическом режиме при 225°C. Концентрацию компонентов рассчитывали при помощи программ «Хроматэк-аналитик».

Идентификацию жирных кислот осуществляли сравнением времени удерживания доступных метчиков и по совпадению вычисленных эквивалентных цепей молекул с табличными данными [22].

Достоверность различий оценивали по непараметрическому критерию U – Вилкоксона-Манна-Уитни при  $p < 0,05$  [3].

#### Результаты и обсуждение

Содержание основных групп высших жирных кислот в общих липидах гаммарид менялось по сезонам. Осенью в исследуемых рачках по сравнению с летом происходило уменьшение содержания насыщенных жирных кислот на 15-18 % и небольшое повышение моноеновых (эйкозаеновой) и полиеновых (линоленовой и докозагексаеновой) кислот (см. табл.). Эти вариации отразились на величине коэффициента ненасыщенности (отношении суммы полиненасыщенных к сумме насыщенных высших жирных кислот). Значения этого соотношения были выше в осенних пробах гаммарид на 33-57 %. Увеличение доли ненасыщенных жирных кислот и уменьшение количества насыщенных вызвано, по-видимому, прежде всего, сезонным снижением температуры воды и необходимостью поддерживать на должном

уровне «жидкокристаллическое» состояние мембранных структур [5, 11, 19].

Исследуя сезонную динамику жирнокислотного состава у эктотермных животных очень трудно вычленить воздействие только изменяющегося термического режима, поскольку на протяжении сезона претерпевают колебания и другие сопутствующие абиотические и биотические факторы. Так, температурные адаптации на уровне липидов очень тесно сопряжены с качественными и количественными изменениями состава пищи, видовыми особенностями экологии и жизненных циклов гидробионтов.

Полиеновые высшие жирные кислоты линолевого ряда ( $\omega 6$  типа) имеют более высокую точку плавления в сравнении с кислотами линоленового ряда ( $\omega 3$  типа) [1]. Вследствие этого, показателем изменения микровязкости мембранных липидов является отношение суммы  $\omega 3$  кислот к сумме  $\omega 6$  жирных кислот. В наших исследованиях величина этого коэффициента была выше у эвригалинного *G. oceanicus*, чем у солоноватоводного *G. duebeni* и составляла, соответственно 1,2-1,4 и 0,7. Полученные данные свидетельствуют об увеличении значения  $\omega 3/\omega 6$ , а, следовательно, и о снижении вязкости мембранных липидов, при возрастании солености среды обитания.

В осенних пробах по сравнению с летом у *G. duebeni* наблюдалось повышение количества  $\omega 3$  кислот на 19 %, а у *G. oceanicus* снижение на 13 % (табл.), что обусловлено, вероятно, различиями жизненных циклов рачков. О правомочности такого предположения свидетельствуют данные, полученные при изучении липидного обмена у других водных беспозвоночных. Было показано, что у молодежи креветки по мере развития половых продуктов накапливаются  $\omega 3$  жирные кислоты [15]. Следует отметить, что период размножения у *G. duebeni* длится с мая по октябрь, а у *G. oceanicus* – с март по август [6, 13]. Поэтому, увеличение доли  $\omega 3$  кислот в октябре у размножающихся *G. duebeni* связано, прежде всего, с интенсивным потреблением пищи, содержащей кислоты  $\omega 3$  ряда, и расходом их в репродуктивных процессах.

В исследуемых видах среди полиненасыщенных жирных кислот преобладали линолевая (6-8 %) и эйкозапентаеновая (5-8 %) кислоты, имеющие, вероятно, пищевое происхождение, поскольку у них отсутствуют ферменты-десатуразы, участвующие в синтезе целого ряда полиненасыщенных жирных кислот [16, 17].

Величина соотношения  $20:5\omega3/22:6\omega3$  кислот указывает на потребление животным растительной пищи. Было выявлено [18], что у антарктического криля, диета которого состоит из диатомовых микроводорослей, значение этого отношения существенно больше 1. Также показано, что в фитопланктоне и ракообразных-фитофагах выше содержание эйкозапентаеновой, чем докозагексаеновой [1]. В исследуемых рачках соотношение  $20:5\omega3/22:6\omega3$  составляло летом 3,3 - 3,6, а осенью - 1,6 - 2,4, что указывает на преобладание растительной пищи в их рационах. Уменьшение этого коэффициента осенью связано с сезонными качественными изменениями пищи гаммарид.

Важная роль в адаптивных реакциях эктотермных организмов принадлежит докозагексаеновой кислоте ( $22:6\omega3$ ), которая благодаря особенностям строения обладает уникальными свойствами, позволяющими ей вместе с другими компонентами биомембран выполнять функции температурного стабилизатора липидных бислоев. Количество докозагексаеновой кислоты у исследуемых гаммарид повышалось осенью (на 50-67%), но у *G. duebeni* ее уровень был стабильно ниже на 56-73%. Данная закономерность, вероятно, связана с различиями условий обитания этих видов.

Имеются сведения, что включение в мембраны  $22:6\omega3$  кислоты представляет один из основных способов быстрого реагирования на любые изменения окружающей температуры и стабилизации липидного бислоя в течение непродолжительного периода [8, 9, 10]. Методами имитационного компьютерного моделирования было показано [8, 25], что с увеличением количества двойных связей в углеводородной цепи от одной до шести, растет ориентационная разупорядоченность простых связей, соседних с двойными, возрастают пространственные флуктуации ато-

мов углерода двойных связей и резко уменьшается абсолютная величина температурного коэффициента геометрических размеров цепи. Эта важнейшая характеристика для кислоты  $22:6\omega3cis$  оказалась на порядок меньше таковой для насыщенной цепи с тем же числом атомов углерода  $22:0$  [8]. Иными словами, полиненасыщенная цепь докозагексаеновой кислоты в жидкокристаллическом состоянии характеризуется максимальной равновесной и высокой кинетической гибкостью, а чувствительность ее средних геометрических размеров и других параметров к изменению температуры оказывается многократно более низкой по сравнению с насыщенными цепями [8].

Из сказанного следует, что включение докозагексаеновой кислоты в состав биомембран гаммарид, снижает чувствительность литоральных рачков к колебаниям температуры, солёности и других экологических факторов.

У изученных рачков к осени было выявлено снижение уровня пальмитолеиновой кислоты на 22-30 %, которая может использоваться в качестве маркера наличия диатомовых водорослей в пище животного. В умеренных водах содержание этой кислоты в диатомеях подвержено влиянию условий среды обитания [23]. Диатомовые водоросли могут накапливаться в донных осадках и участвовать в образовании детрита. В наших исследованиях была выявлено, что содержание пальмитолеиновой кислоты меняется в зависимости от сезонных вариаций количества диатомовых водорослей в воде и осадках. Можно предположить, что уменьшение количества этой кислоты осенью связано, как со снижением ее содержания в пище гаммарид, так и с уменьшением доли детрита в их рационах.

Маркером потребления бурых водорослей является суммарное содержание  $18:2\omega6$ ,  $18:3\omega3$ ,  $18:3\omega6$ ,  $18:4\omega3$ ,  $20:2\omega6$ ,  $20:4\omega6$  кислот в жирнокислотном составе организма-консумента [23]. По нашим данным, в исследуемых видах количество этих жирных кислот было довольно высоким (летом - около 14, а осенью - 16-17 %).

Таким образом, результаты исследования показали наличие сезонной динамики в содержании как основных групп жирных кислот, так и индивидуальных фракций. Изменение температуры окружающей среды индуцирует модификацию жирнокислотного состава липидов. В частности, к осени усиливается синтез моноеновых и снижается количество насыщенных жирных кислот. Количественные вариации полиненасыщенных жирных кислот у гаммарид обусловлены сезонным изменением видового и жирнокислотного состава их пищи. На основании полученных данных можно предположить, что в рационе рач-

ков в летний период значительную долю составляет детрит, в осенний – бурые водоросли. У исследуемых гаммарид выявлены различия значений соотношения  $\omega 3/\omega 6$  жирных кислот в зависимости от солености среды обитания и стадии жизненного цикла. Репродуктивный цикл рачков обуславливает изменения в содержании  $\omega 3$  кислот.

Работа выполнена при поддержке грантов Президента РФ для поддержки ведущих научных школ НШ-4310.2006.4, РФФИ (№ 02.444.11.7135) и проекта РГНФ (проект № 05-04-97517).

**Таблица 1.** Содержание основных высших жирных кислот (% от суммы жирных кислот,  $M \pm m$ ) в общих липидах исследованных гаммарид ( $n=10$ )

Жирные кислоты <sup>1</sup>	Вид			
	<i>G. oceanicus</i>		<i>G. duebeni</i>	
	Лето	Осень	Лето	Осень
<b>Насыщенные</b>				
14:0 миристиновая	6,6±0,6	4,0±0,5 <sup>b</sup>	7,4±0,4	4,9±0,2
16:0 пальмитиновая	17,4±0,2	11,8±0,9 <sup>b</sup>	16,8±0,3	14,7±1,7
18:0 стеариновая	2,6±0,2	1,4±0,1 <sup>b</sup>	2,2±0,3	1,7±0,3
Сумма	31,9±1,3	26,1±2,2 <sup>b</sup>	31,2±1,0	26,5±2,7
<b>Моноеновые</b>				
16:1 пальмитолеиновая	5,3±0,5	3,7±0,4 <sup>b</sup>	4,9±0,2	3,8±0,2
18:1 олеиновая	27,1±1,9 <sup>a</sup>	25,5±3,0	33,5±0,7	33,7±0,7
18:1 вакценовая	4,7±0,6	3,8±0,2	3,6±0,1	3,3±0,3
20:1 эйкозаеновая	0,9±0,0 <sup>a</sup>	2,9±0,6	0,7±0,0	2,4±0,1
Сумма	39,9±2,4	41,1±2,4	45,9±0,9	46,6±4,3
<b>Полиеновые</b>				
18:3 $\omega 3$ линоленовая	2,5±0,3	4,8±0,8	2,2±0,2	7,8±0,3
20:5 $\omega 3$ эйкозапентаеновая	8,5±1,1	6,3±0,7	5,4±0,7	6,0±0,5
22:6 $\omega 3$ докозагексаеновая	2,6±0,7	3,9±0,5	1,5±0,3	2,5±0,1
Сумма $\omega 3$ кислот	14,5±1,6 <sup>a</sup>	12,6±1,9	8,7±1,1	10,4±5,8
18:2 $\omega 6$ линолевая	6,5±0,3 <sup>a</sup>	5,7±0,6	7,6±0,6	7,8±0,3
20:4 $\omega 6$ арахидоновая	5,3±0,6	5,3±0,4	4,0±0,6	1,2±0,0 <sup>d</sup>
Сумма $\omega 6$ кислот	12,7±0,9	12,4±1,5	13,3±0,4 <sup>c</sup>	15,2±0,8
$\Sigma \omega 3/\Sigma \omega 6$ <sup>1</sup>	1,2±0,2 <sup>a</sup>	1,4±0,5	0,7±0,1	0,7±0,3
Сумма	28,1±1,8	29,6±1,6	22,9±1,4	26,2±6,4
$\Sigma$ полиеновых/ $\Sigma$ насыщенных <sup>2</sup>	0,9±0,1	1,2±0,1	0,7±0,1	1,1±0,4

<sup>1</sup> Сумма жирных кислот линоленового типа / сумма жирных кислот линолевого типа;

<sup>2</sup> Сумма полиненасыщенных жирных кислот / сумма насыщенных жирных кислот.

различия достоверны ( $p < 0,05$ ) при сравнении

<sup>a</sup> летние пробы *G. oceanicus* и *G. duebeni*

<sup>b</sup> летние и осенние пробы *G. oceanicus*

<sup>c</sup> летние и осенние пробы *G. duebeni*

<sup>d</sup> осенние пробы *G. oceanicus* и *G. duebeni*

Также были идентифицированы жирные кислоты: iso-13:0, 13:0, 13:1, iso-14:0, 14:1, iso-15:0, anteiso-15:0, 14:2(n-6), iso-16:0, anteiso-17:0, 16:2(n-6), 17:0, 17:1(n-8), 18:4(n-3), 20:0, 20:2(n-6), 20:3(n-6), 22:2(n-9), содержание которых не превышало 0,5 % от суммы жирных кислот.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Акулин В.Н., Каредин Е.П., Первунинская Т.А. // Гидробиол. ж. 1975. Т. XI. № 2. С. 45.

2. Брызгин В.Ф. // Физико-химические условия формирования биологической продукции Баренцева моря. Апатиты: Изд-во Кольского филиала АН СССР. 1980. С. 93.

3. Гублер Е.В., Генкин А.А.. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина. 1969. 29 с.

4. Когтева Г.С., Безуглов В.В. // Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 1. С. 6.

5. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Л.: Наука, 1981. 339 с.

6. Луппова Е.Н. // Фауна беспозвоночных Карского, Баренцева и Белого морей (информатика, экология, биогеография). Апатиты: КНЦ РАН. 2003. С. 240.

7. Проссер К.Л. // Клетка и температура среды. М.; Л.: Мир. 1964. С. 245.

8. Рабинович А.Л., Рипатти П.О. // Успехи современной биологии. 1994. Т.114. Вып. 5. С. 581.

9. Рабинович А.Л., Рипатти П.О., Дашевский В.Г. // Биофизика. 1985. Т.30. Вып. 5. С. 802.

10. Рипатти П.О., Рабинович А.Л., Богдан В.В. // Биохимия молоди пресноводных рыб. Петрозаводск: Кар. филиал АН СССР. 1985. С.27.

11. Смирнов Л.П. Роль липидов и белков в становлении биохимических адаптаций у эктотермных организмов: Ав-

тореф. дис...доктора биол.наук. – Петрозаводск, 2005.

12. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М: Мир. 1988. 567 с.

13. Цветкова Н.Л. Прибрежные гаммариды северных и дальневосточных морей СССР и сопредельных вод. Л.: Наука. 1975. 256 с.

14. Цыганов Э.П. // Лабораторное дело. 1971. N8. С. 490.

15. Allen Cathy E., Copley Jon T., Tyler Paul A. // Mar. Ecol. 2001. Vol. 22. N 3. P. 241.

16. Arts M.T., Ackman R.G., Holub B.J. // Can. J. Fish.Aquat. Sci. 2001. Vol. 58. P.122.

17. Birkely S.R., Grahl-Nielsen O., Gulliksen B. // Polar Biol. 2003.Vol. 26. P. 83.

18. Falk-Petersen S., Hagen W., Kattner G., Clarke A., Sargent J.R. // Can. J. Fish.Aquat. Sci. 2000. Vol. 57. P.178.

19. Farkas T., Herodek S. // J. Lipid Res. 1964. N 5(869). P. 396.

20. Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G.H. // J.Biol.Chem. 1957. V. 226. N1. P. 497.

21. Hazel J. // Effect of temperature on ectothermic organisms. Btrlin. 1973. P.55.

22. Jamieson G.R. // J. Chromatogr.Sci. 1975. V.13. N 10. P.491.

23. Kharlamenko V.I., Zhukova N.V., Khotimchenko S.V., Svetashev V.I., Kamenov G.M. // Mar.Ecol.Prog.Ser. 1995. Vol. 120. P.231.

24. Leveille J-C., Amblard C., Bourdier G. // J. Plankt. Res. 1997. Vol. 19. P. 469.

25. Rabinovich A.L., Ripatti P.O., Balabaev N.K., Leermakers F.A.M. // Physical Review E. 2003. V.67. N 1. P. 011909\_1.

26. Rosa R., Nunes M.L. // Deep-Sea Res. Pt 1. 2003. 50, N 1. P. 119.

27. Sinensky M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1974. Vol. 71. P. 522.

**SEASONAL CHANGES OF FATTY-ACID STRUCTURE AT ACTIC FRESHWATER  
HOPPERS (CRUSTACEA, AMPHIPODA)**

<sup>1</sup>Tkach N.P., <sup>2</sup>Vysotskaya R.U., <sup>1</sup>Bryazghin V.F.

<sup>1</sup>*The Karelian state pedagogical university*

<sup>2</sup>*Institute of biology of the Karelian scientific centre of the Russian Academy of Sciences*

There was examined the fatty acid composition of the total lipids of the intertidal gamma-rids of the White Sea during different seasons. There was show, that an autumn temperature's lowering and connected to in fluctuations of other abiotic and biotic factors induced the displacement of fatty acid spectrum towards decreasing of saturated and increasing of the number of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids and unsaturated coefficient. An important role in adaptive reactions of amphipoda belongs to polyunsaturated superior fatty acids of the  $\omega$ 3-sort, particularly, to docosahexaenoic acid (22:6 $\omega$ 3).