

ПРОВ 2010

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ
им. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

ПРОВ 98

БИОЛОГИЯ МОРЯ

Вып. 18

БИОЛОГИЯ ОБРАСТАНИИ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА»
КИЕВ — 1970

F r a g a F. Variacion estacional de la composicion quimica del mejillon (*M. edulis*). 2. Hidratos de carbono. Inv. Pesqu, 11, 1958.

F r a g a F., L o p e s-C a p o n t M. Oligosacaridos en el mejillon (*M. edulis*). Inv. Pesqu, 11, 1958.

K e m p A., a. K i t s v a n - H e i j n i n g e n A. A colorimetric micromethod for the determination of glucose. - The Bioch. J., 56, 4, 1954.

M o n i o u r P., H u g u e t R., G r a s J. Le glycogène chez *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Etude cytochimique et biochimique. - C. B. Soc. Biol., 152, 12, 1959.

R e n z o n i A. Osservazioni sulle gonadi di mitilö (*M. galloprovincialis* Lam.). I. Variazioni stagionali del glycogeno. - Pubbl. Staz. zool. Napoli, 32, 1, 1961.

S o l e r e M., P r o m T., H u g u e t R. Glucides de l'hepatopancreas et du manteau de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. - Trav. soc. pharmac. Montpellier, 24, 1, 1964.

S r i n i w a s a n V. a. K r i s h n a s w a m y S. A simple method of determination of glycogen content of marine animals. - Current Science, 30, 9, 1961.

T u s e t O., M a n i e r J. F. et G r a s J. J. Localisation du glucogene dans le manteau de quelques Lamellibranches. - Bull. Inst. Oceanogr., Monaco, 55, 1959.

ОБ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ В ГЕПАТОПАНКРЕАСЕ И МЫШЦАХ МИДИЙ

С. А. Горомосова, А. З. Шапиро

Расщепление гликогена в организме происходит, как известно, двумя путями - амилолитически и фосфоролитически. Под действием фосфорилазы от гликогена отщепляются молекулы глюкозы, которые фосфорилируются с образованием глюкозо-1-фосфата. При гидролити-

ческом расщеплении гликогена образуются различные олигогликозиды. В животном организме встречаются преимущественно γ -амилаза и α -амилаза, которые четко отличаются как по оптимальным условиям реакции, так и по конечным ее продуктам (Розенфельд, 1962).

Активность амилазы, как и других пищеварительных ферментов у беспозвоночных, изучается сравнительно давно. В ранних работах в основном приводятся данные по качественной характеристике этого фермента, по распределению его в различных частях пищеварительного тракта животных. У моллюсков наиболее высокая амилазная активность обнаружена в гепатопанкреасе и кристаллическом стебельке, причем у растительноядных и детритоядных моллюсков она значительно выше, чем у хищных (Nicol, 1960).

В настоящее время изучение амилазной активности проводится не только в пищеварительных органах, но и в других тканях. Систематических данных об активности амилазы в тканях моллюсков и о ее динамике имеется мало (Vieira a. Ladeira, 1965). Было показано, что продуцирующиеся α -амилазой олигосахариды играют важную роль в процессах синтеза гликогена, являясь первичными молекулами синтезирующегося полисахарида (Rutter, Arnold, Brosemer a. Miller, 1961).

Большой интерес представляет вопрос о соотношении амилолитического и фосфоролитического путей распада гликогена и об участии продуктов амилолитического распада в энергетических процессах.

В данной работе исследовались активность амилазы в гепатопанкреасе и мышцах двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* L a m., зависимость ее от содержания гликогена в тканях и влияние продуктов амилолитического расщепления углеводов на интенсивность гликолиза мышц мидий *in vitro*.

Методика. Амилазная активность гепатопанкреаса и мышц мидий исследовалась в гомогенатах и супернатантах ($d = 8000$) в разбавлении 1 : 10. Инкубационная смесь состояла из 3 мл водного гомогената (супернатанта) гепатопанкреаса или мышц, 2 мл 1%-ного раствора гликогена, 5 мл фосфатного буфера pH 7,0 и 100 мг NaCl. Инкубация проводилась в термостате при температуре 37°C в течение 20 и 60 мин. В отобранных аликвотах определяли содержание гликогена и смеси олигосахаридов методом Зейфтера с антроном (Seifter и др., 1950).

Чтобы убедиться, что в применяемой инкубационной смеси не

проявлялась активность γ -амилазы и фосфорилазы, были проведены два варианта опытов: I вариант - в инкубационную смесь не вносились ионы хлора, специфически активирующие α -амилазу, но не влияющие на γ -амилазу; II вариант - в инкубационную смесь добавляли ЭДТА, который ингибирует α -амилазу, но не действует на фосфорилазу. В обоих вариантах опытов распад гликогена в гепатопанкреасе составлял лишь 20% контроля, что совпадает с данными Розенфельда об α -амилазной активности в соответствующих условиях опыта (1962).

Таким образом, можно считать, что в применяемых нами условиях проявлялась только α -амилазная активность. Опыты по влиянию эндогенного субстрата на активность амилазы в гепатопанкреасе мидий проводили в описанной выше инкубационной среде, но без внесения гликогена.

В связи с имеющимися данными по влиянию предварительного автолиза на активность амилазы (Andreev, 1958; Burt, 1966) были проведены опыты по влиянию предварительной инкубации на активность этого фермента у мидий. В опытах с предварительным автолизом процент расщепленного субстрата не повышался. Интенсивность гликолиза устанавливалась по приросту молочной кислоты в инкубационной среде следующего состава: 0,1 мл 0,75 М $MgSO_4$; 0,1 мл 0,05 М цистеина; 0,1 мл 0,125 М трис+HCl pH 7,6; 0,1 мл 0,125 М никотинамида; 1 мл 0,02 М К-фосфатного буфера pH 7,7; 0,1 мл АТФ 0,025 М и 0,1 мл соответствующего субстрата. Содержание молочной кислоты определялось по Баркеру и Саммерсону (Barker a. Summerson, 1941).

Результаты исследования и их обсуждение

α -Амилазная активность в мышцах и гепатопанкреасе мидий.

Распад гликогена в гомогенатах гепатопанкреаса за первые 20 мин инкубации составляет 45,5% исходного количества, за час расщепляется 68% гликогена (см. таблицу и рис. I).

Активность амилазы гепатопанкреаса в гомогенатах, выраженная в единицах энзимной активности, составляет 90 мг глюкозы/час/г ткани. Интенсивность амилазы в супернатанте этого органа - 1,82 мг глюкозы/час/мг белка.

В гомогенатах мышц в течение первого часа расходуется всего 22% гликогена, через 2 час - 30%, через 3 час - 32%. Активность

Амилолитический распад гликогена в тканях мидий в октябре - ноябре 1967 г.

Время инку-	Печень			Мышцы		
	Супернатант, г/г	Гликоген, мг	Расщепленный субстрат, %	Супернатант, г/г	Гликоген, мг	Расщепленный субстрат, %
0	1,08	66,0	0	2,00	81,0	0
20	0,62	36,0	45,5	1,82	72,0	11,0
60	0,28	20,0	69,0	1,56	65,0	20,0

амилазы мышц мидий составляет 15 мг глюкозы/час/г ткани, а в супернатанте она равна 0,860 мг глюкозы/час/мг белка.

Как и следовало ожидать, распад гликогена в мышцах мидий происходит гораздо медленнее и по более плавной кривой.

Наши данные по α -амилазной активности в гепатопанкреасе мидий близки к результатам, полученным Горинчи и Лейн (Horinchi a. Lane, 1966) на брюхоногом моллюске *Strombus*, активность амилазы у которого

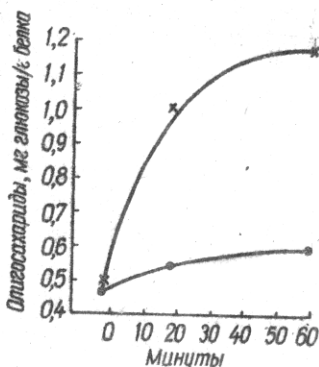


Рис. 1. Увеличение содержания олигосахаридов при инкубации гепатопанкреаса и мышц мидий (мг глюкозы на 1 г белка):

(x) — гепатопанкреас; (•) — мышцы.

составляет 2,351 мг глюкозы/час/мг белка. У крабов по сравнению с мидиями расщепление углеводов α -амилазой происходит менее интенсивно и составляет за час 40%, за два часа — 49% (Blandamer a. Beachey, 1964).

В гепатопанкреасе леща, являющегося бентофагом, активность амилолитического расщепления гликогена близка к нашим данным и составляет 79% за 3 час инкубации, в то время как в гепатопанкреасе хищных рыб она меньше — 46–60% распада от исходного количества (Ананичев, 1959). Интересным является тот факт, что полученные нами величины амилазной активности гепатопанкреаса мидий близки к данным, полученным на печени кролика, коровы, собаки — 410, 500, 820 амилазных единиц (McGeachin, Potter, 1960); активность амилазы гепатопанкреаса мидий — 670 амилазных единиц.

Данных по α -амилазной активности в мышцах мало, что, вероятно, связано с тем, что изучение этого фермента в мышцах началось сравнительно недавно. Наиболее подробно амилазная активность в мышцах изучена Андреевым (1958) и Бертом (Burt, 1966) на

рыбах. Так Берт показал, что амилаза мышц трески за период инкубации расщепляет около 30% гликогена, и амилалитический распад углеводов в общем гликогенолизе составляет свыше 70%. Наши данные по интенсивности гликолитического распада в мышцах мидий близки к данным Берта.

Таким образом, сопоставление активности амилазы в тканях мидий с литературными данными, полученными по активности этого фермента у других организмов, показало, что активность амилазы у мидий такая же, как у рыб-бентофагов и у высших млекопитающих, и несколько выше, чем у рыбообразных и хищных рыб.

Зависимость активности амилазы от количества эндогенного гликогена. При изучении сезонной динамики химического состава мидий было установлено, что содержание гликогена в гепатопанкреасе подвержено четким колебаниям на протяжении годового цикла (см. статью Горомосовой в этом сборнике). Эти колебания определяются репродуктивным циклом и температурными условиями обитания. В летнее время в гепатопанкреасе гликоген накапливается в большом количестве (4-6% на единицу сырого веса), в осенне-зимнее время содержание его понижается, причем отмечается два минимума, которые приходятся на период осеннего и зимнего размножения (октябрь - ноябрь и январь - март). В связи с этим представляло интерес выяснить зависимость амилазной активности от количества эндогенного субстрата.

Опыты проводились в данном варианте без внесения в инкубационную среду гликогена и при температуре 25°C, так называемая эндогенная инкубация. При такой постановке опыта активность амилазы, очевидно, была несколько ниже, чем в полной инкубационной среде. Однако сезонные колебания проявились четко и были тесно связаны с содержанием гликогена в гепатопанкреасе (рис. 2). Высокая активность амилазы наблюдается в весенне-летнее время, с апреля по август, низкая - с сентября по март. Минимальная активность проявляется в период осеннего и зимнего размножения (октябрь - ноябрь и январь - февраль). В период весеннего размножения мидий (апрель - май) наблюдается более высокий уровень амилазной активности, хотя понижение ее проявляется четко.

Таким образом, из приведенных данных следует, что амилазная активность в гепатопанкреасе мидий находится в прямой зависимости от содержания гликогена (формула регрессии: $Y = 6,4 + 12,2X$, где

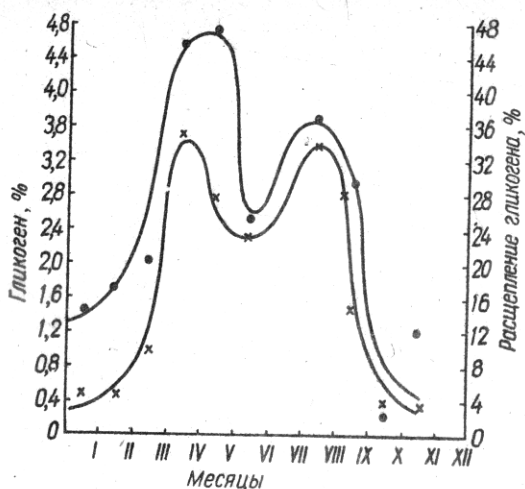


Рис. 2. Содержание гликогена и его распад при эндогенной инкубации гепатопанкреаса мидий: (x) — гликоген (в % на сухой вес ткани); (•) — распад гликогена (в % от первоначального количества).

X — содержание гликогена в ткани; У — % распавшегося гликогена, рис. 3) и тесно связана с внутренним биологическим ритмом мидий на протяжении годового цикла^{*/}.

Олигосахариды как субстраты гликолиза в мышцах мидий. Известно, что у мидий, как и у других пластинчатожаберных моллюсков, гликоген является основным энергетическим компонентом. Содержание гликогена в моллюсках изменяется в зависимости от сезона и физиологического состояния организма. Почти на всех животных было установлено, что основным субстратом гликолиза мышц является гликоген. Однако на мышцах моллюсков не было получено в результате применения гликогена в качестве субстрата стиму-

^{*/} Наряду с этим важно определить сезонную динамику амилазной активности в опытах с полной инкубационной средой и при оптимальной температуре. Такие исследования проводятся в настоящее время.

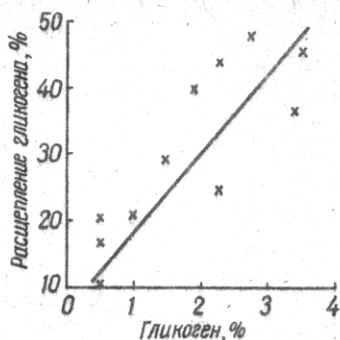


Рис. 3. Зависимость между содержанием гликогена и активностью его распада.

амилолитического распада, в частности мальтозы. При этом мы исходили из предположения, что мальтоза под действием мальтазы превращается в глюкозу, которая включается в гликолитический цикл под действием гексокиназы. Гексокиназа, по нашим данным, не является лимитирующим звеном гликолиза в мышцах мидий. Отсюда, если у мидий гликоген включается в гликолиз в основном в результате амилолитического распада, то можно предположить, что мальтоза, как и глюкоза, должна стимулировать образование молочной кислоты в опытах *in vitro*. Исходя из сказанного, нами был исследован выход молочной кислоты при использовании в качестве субстрата наряду с гликогеном и глюкозой также мальтозы. Как уже отмечалось, гликоген практически не стимулировал образование молочной кислоты. Мальтоза, как и глюкоза, повышала активность этого процесса.

Ниже приведены данные интенсивности гликолиза в мышцах мидий с разными субстратами (мг молочной кислоты на 1 мг белка в 1 час) ^{*}/

Субстрат	Интенсивность гликолиза
Эндогенный гликолиз	190
Гликоген	200
Глюкоза	380
Мальтоза	420

^{*}/ Эти данные получены на основании трех опытов.

ляции гликолиза по сравнению с эндогенным (Karpiak, 1962; см. статью Шапиро в этом сборнике).

При использовании в качестве субстрата глюкозы выход молочной кислоты увеличивался в два раза. Стимулировало гликолиз и добавление фосфорилированных гексоз. Представляло интерес выяснить возможность использования в качестве субстрата для гликолиза продуктов

Тот факт, что мальтоза включалась в гликолитический процесс так же активно, как и глюкоза, свидетельствует о наличии в мышцах мидий мальтазы. В этом отношении наши данные, полученные на мышцах пластинчатожаберных моллюсков, согласуются с результатами, полученными рядом авторов на мышцах костистых рыб (Andreev, 1958; Burt, 1966). Этими авторами было показано, что среди конечных продуктов амилолитического распада гликогена превалирует глюкоза, количество мальтозы или очень незначительно, или вообще отсутствует. Полученные данные также свидетельствуют о том, что продукты амилолитического распада гликогена могут включаться в гликолитический цикл и, следовательно, гликоген может участвовать в гликолизе благодаря амилолитическому распаду.

ВЫВОДЫ

Гомогенаты гепатопанкреаса и мышц мидий обладают амилолитической активностью, которая значительно выше в гепатопанкреасе, чем в мышцах: за 60 мин инкубации в гомогенатах гепатопанкреаса распадается 68% гликогена, в мышцах - 20%.

Активность амилазы находится в прямой зависимости от содержания гликогена в гепатопанкреасе и тесно связана с половым циклом мидий и температурными колебаниями на протяжении года.

Один из продуктов амилолитического расщепления гликогена - мальтоза используется в качестве субстрата гликолиза, усиливая его интенсивность по сравнению с эндогенным в два раза.

ЛИТЕРАТУРА

Ананичев А.В. Пищеварительные ферменты рыб и сезонная изменчивость их активности. - Биохимия, 24, 6, 1959.

Петрова А.Н. Исследование ферментативных процессов превращения гликогена в печени при аллоксановом диабете. - Биохимия, 20, 6, 1955.

Andreev A.K. Fish muscle amylases. - Biochimija, 24, 1958.

Barker S.B. and Summerson W.H. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. - The Journ. Biol.Chem., 138, 2, 1941.

B l a n d a m e r A. a. B e a c h e y R.B. The identification of an α -amylase in aqueous extracts of the hepatopancreas of *Carcinus maenas*, the common shore crab.- *Comp.Biochem. Physiol.*, 13,1,1964.

B a r t J.R. Glycogenolytic enzymes of cod (*Gadus callarias*) muscle.- *Journ. Fisheries research board of Canada*, 23,4,1966.

H o r i n c h i S. a. L a n e C.E. Carbohydrates of the crystalline style and hepatopancreas of *Strombus gigas* Linne. - *Comp.Biochem.Physiol.*, 17,6,1966.

M c G e a c h i n R.L a. P o t t e r B.A. Amylase in isolated liver cells.- *Journ. Biol.Chem.*, 235,5,1960.

K a r p i a k S.E., I w a n o w s k i H. a. S i e m i n i e w s k i H. The content of lactate and pyruvate and the activity of lactate dehydrogenase in adductor muscle of the freshwater mussel (*Unio* sp.).- *Arch.immunol. et therapiae Exp.*, 10,2,1960.

N i c o l J.A. The biology of marine animals. London, 1960.

R u t t e r W.J., A r n o l d M., B r o s e m e r R.W. a. M i l l e r J.A. Liver amylase. II. Physiological role.- *Journ.Biol.Chem.*, 236,5,1960.

S e i f t e r S., D a y t o n S., N o v i c B. a. M u n t w i l e r E. The estimation of glycogen with the antrone reagent.- *Archives of biochemistry*, 25,1,1950.

V i e i r a E.C.a. L a d e i r a B.A. Amylase of the snail *Austrolorbis glabratus* (Mollusca, Planorbidae).- *Compar. Bioch. Physiol.*, 14,2,1965.

ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССА ГЛИКОЛИЗА В МЫШЦАХ МИДИЙ

А.З.Шапиро

Гликолиз - сложный ферментативный процесс анаэробного превращения углеводов с образованием в качестве конечного продукта молочной кислоты - в настоящее время хорошо изучен. Этапы превращения углеводов и основные закономерности регуляции углеводного обмена, установленные на дрожжах, в последнее время исследованы подробно на бактериях, насекомых, тканях позвоночных. Во всех