

ЭКОЛОГИЯ МОРЯ



27
—
1987

А. З. ШАПИРО, С. А. ПЕТРОВ

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ОБМЕНА У РАЗНОРАЗМЕРНЫХ МИДИЙ (MUTILUS GALLOPROVINCIALIS L.)

Литературные данные о связи линейных размеров беспозвоночных и величинами метаболизма в основном касаются интенсивности дыхания и массы тела организма [5]. Аналогичные зависимости для ферментов малочисленны и относятся к общей ферментной активности в тканях одной размерной группы. Для мидий наиболее исследованной группой являются организмы с линейными размерами 30—40 мм [4]. Вместе с тем размерно-возрастные характеристики ферментов представляют интерес не только для физиолого-биохимических, но и экологических исследований. В частности, соотношение уровней активности ферментов анаэробной и аэробной фаз окисления, наряду с другими показателями, может определять степень устойчивости разноразмерных мидий к изменению условий обитания.

В настоящей работе представлены данные по активности некоторых ферментов цикла Кребса и гликолиза в тканях разноразмерных мидий.

Материал и методика. Активность ферментов определяли в тканях трех размерных групп мидий: 15—20, 35—40 и 50—60 мм, собранных в относительно чистых районах моря.

Интенсивность окисления метаболитов цикла трикарбоновых кислот — пирувата, сукцината, цитрата и α -кетоглутарата — исследовали спектрофотометрически в 10%-ных гомогенатах ткани гепатопанкреаса по интенсивности восстановления искусственного акцептора водорода — ферроцианида калия [8]. Гомогенаты тканей получали на 0,1M К-фосфатном буфере pH 7,6 в разведении 1:10 (масса ткани в граммах; объем фосфорного буфера в миллилитрах). Состав инкубационной среды для определения скорости окисления метаболитов (мл): 0,25M сахара — 1,7; 0,1M К-фосфатный буфер pH 7,6—0,5; 0,2M $MgSO_4$ — 0,1; 0,2M ЭДТА — 0,1; 0,2M субстрат (пируват, сукцинат и т. д.) — 0,1; 0,0067M $K_3Fe(CN)_6$ — 0,7. Интенсивность окисления метаболитов выражали в мкмоль восстановленного ферроцианида калия mg^{-1} белка $\cdot min^{-1}$.

Активность малатдегидрогеназы (МДГ), восстанавливающей ЩУК, исследовали в супернатанте 10%-ного гомогената по методу Очоа, с некоторыми модификациями, внесенными нами для тканей беспозвоночных [7]. Супернатант получали при откручивании 10%-ного гомогената на центрифуге ЦЛР-1 при 15 000 об min^{-1} в течение 20 мин. Состав инкубационной среды для определения активности МДГ (в 3 мл, мкмоль): ЩУК — 1,2, НАДН — 0,4, К-фосфатный буфер pH 7,4 — 250.

Активность гексокиназы (ГК) определяли по скорости восстановления НАДФ в сопряженной с гексокиназой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции (Г-6-ФДГ). Состав инкубационной среды для определения ГК (в 3 мл, мкмоль): трис $\cdot HCl$ — 250, $MgSO_4$ — 15, глюкоза — 100; АТФ — 9,5; НАДФ — 5; Г-6-ФДГ — 0,4 ед.

Активность ферментов выражали в нмолях пиридиннуклеотидов $\times mg^{-1}$ белка $\cdot min^{-1}$. Белок определяли по Лоури [9]. Результаты обработаны статистически по Рокицкому [6].

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали высокую интенсивность окисления эндогенных субстратов ЦТК, что согласуется с полученными ранее данными о высоком уровне эндоген-

Т а б л и ц а 1. Интенсивность окисления субстратов ($M \pm m$) цикла Кребса гомогенатами гепатопанкреаса черноморских мидий (нмоль восстановленного $K_3Fe(CN)_6$ · мг белка⁻¹ · мин⁻¹)

Размерные группы мидий, мм	Окисление эндогенных субстратов	Субстраты окисления			
		пируват	сукцинат	цитрат	α -кетоглутарат
15—20	60 $\pm$ 7	12 $\pm$ 2	30 $\pm$ 3	12 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2
35—40	50 $\pm$ 7	28 $\pm$ 2*	74 $\pm$ 10*	22 $\pm$ 3*	14 $\pm$ 2
55—65	42 $\pm$ 4*	28 $\pm$ 2*	28 $\pm$ 3	30 $\pm$ 4*	34 $\pm$ 3*

* Отмечены достоверные различия по отношению к младшей возрастной группе.

ного дыхания митохондрий гепатопанкреаса мидий [3]. Отмечено снижение интенсивности этого процесса в ряду от маленьких экземпляров к крупным (табл. 1).

Интенсивность окисления экзогенных метаболитов гомогенатами гепатопанкреаса неодинакова и зависит от функциональной активности ферментов и размерной группы мидий (табл. 1). У размерной группы 15—20 мм обнаружена низкая интенсивность окисления пирувата, цитрата, и α -кетоглутарата. Для первых двух веществ у размерной группы 35—40 мм отмечено усиление интенсивности процесса в 2 раза с сохранением этого уровня у линейной группы 55—65 мм. Трехкратное увеличение интенсивности окисления α -кетоглутарата обнаружено у линейной группы 55—65 мм по отношению к группе 35—40 мм. Из всех исследованных субстратов наиболее интенсивно окисляется сукцинат. Максимальная интенсивность окисления этого вещества отмечена у размерной группы 35—40 мм (табл. 1).

Для малатдегидрогеназы, измеренной по активности восстановления ШУК, в цитоплазме гепатопанкреаса, мышц и жабер трех размерных групп мидий зависимость скорости реакции от размеров не обнаружена (табл. 2). Для ГК наблюдается увеличение активности с увеличением линейных размеров моллюсков. Активность фермента наиболее низка у размерной группы 15—20 мм; у двух остальных размерных групп она возрастает в 2 раза (табл. 2).

Таким образом, интенсивность окисления эндогенных субстратов с увеличением линейных размеров моллюсков падает, т. е. наблюдается

Т а б л и ц а 2. Активность ферментов анаэробной фазы окисления в гепатопанкреасе черноморских мидий (нмоль НАД или НАДФ · мг белка⁻¹ · мин⁻¹)

Размер, мм	МДГ (обращенная)	ГК
15—20	450 $\pm$ 39	10 $\pm$ 2,1
35—40	482 $\pm$ 93	21 $\pm$ 3,0
55—65	445 $\pm$ 41	21 $\pm$ 2,5

известная зависимость снижения интенсивности обмена от массы тела моллюска [1, 2]. Однако для ферментов цикла Кребса и гликолиза в тканях гепатопанкреаса мидий такая зависимость не обнаружена.

Абсолютная активность изученных ферментов аэробной и анаэробной стадий окисления наиболее низка у размерной группы 15—20 мм и повышается у группы 35—40 мм с сохранением достигнутого уровня у мидий 55—65 мм (в случае сукцинатдегидрогеназы у последней группы отмечено снижение активности до уровня размерной группы 15—20 мм). Из полученных данных следует, что онтогенетические изменения активности изученных ферментов имеют сходный характер и, вероятно, зависят в большей степени не от линейных размеров, а от физиологического состояния организма. Это можно заключить на основании изменения активности изученных ферментов в основном только у групп 15—20 и 35—40 мм, для которых характерны интенсивный линейный рост и наступление репродуктивной фазы. Очевидно, отмеченное изменение активности ферментов определяется процессом формирования половых продуктов. Как подчеркивает ряд ав-

Таблица 3. Соотношение активностей ферментов анаэробной и аэробной фаз окисления в гепатопанкреасе мидий

Размер, мм	П/МДГ $\times 10^3$	С/МДГ $\times 10^3$	Ц/МДГ $\times 10^3$	α -кето/МДГ $\times 10^3$	П/ГК $\times 10^3$	С/ГК $\times 10$	Ц/ГК $\times 10$	α -кето/ГК $\times 10$
15—20	27	67	28	22	12	30	12	10
35—40	57	152	46	29	12	35	10	7
55—65	63	60	60	78	13	12	13	11

Примечание. Интенсивность окисления: П — пирувата, С — сукцината, Ц — цитрата, α -кето — α -кетоглутарата.

торов [1, 4], у мидий существует только два процесса, связанных со значительным расходом энергии — это размножение и линейный рост, причем на размножение энергии расходуется больше. Увеличение расхода энергии на размножение оказывает заметное влияние на общий метаболизм, что отражается на активности ферментов.

Для оценки роли каждой дегидрогеназы в окислительном обмене мидий были рассмотрены относительные активности ферментов анаэробной и аэробной фаз окисления внутри каждой размерной группы. Об интенсивности аэробной фазы окисления судили по активности окисления субстратов соответствующих дегидрогеназ (табл. 1), анаэробной — по активности ГК и МДГ_(цит) (табл. 2). В данной работе мы рассматриваем МДГ в качестве фермента анаэробной стадии окисления в связи с его двойной ролью в окислительных процессах. Этот энзим, как известно, может катализировать реакции как аэробной, так и анаэробной фаз окисления. Особенно велика роль МДГ как анаэробного фермента в тканях пластинчатожаберных моллюсков, что связано с ее участием в конечных этапах катаболизма углеводов по обращенному дикарбоновому участку цикла Кребса. Проведенное сопоставление (табл. 3) показало, что внутри изученных размерных групп эти соотношения изменяются по-разному. Для групп 15—20 и 55—65 мм относительные величины активностей ферментов одинаковы (исключение составляют данные для сукцинатдегидрогеназы у группы 15—20 мм). У 35—40 мм мидий эти цифры различны, что свидетельствует о различной роли исследованных дегидрогеназ в биоэнергетической системе этой группы. Из всех дегидрогеназ максимальные абсолютные и относительные величины получены для сукцинатдегидрогеназы, что связано со значительной ролью этого фермента в окислительном обмене мидий, что уже подчеркивалось [4]. Как известно, эта дегидрогеназа является флавин-, а не НАД-зависимым ферментом. При недостатке НАД — явлении, характерном для моллюсков и других морских беспозвоночных [4], окисление сукцината монополизирует дыхательную цепь и подавляет окисление других субстратов [3]. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о более значительной роли сукцинатдегидрогеназы в выработке энергии в средних этапах онтогенеза мидий. В связи с тем что СДГ легко ингибируется в тканях гидробионтов в условиях гипоксии и влияния ионов тяжелых металлов [4], и учитывая важную роль этого фермента в окислительном обмене, можно предположить, что наиболее повреждаемыми при указанных воздействиях являются линейные размеры мидий 35—40 мм.

Заключение. Из трех размерных групп мидий (15—20, 35—40 и 55—65 мм) увеличение активности ферментов анаэробной и аэробной стадий окисления наблюдается, в основном, у двух первых размерных групп. Отмеченное изменение активности ферментов может быть связано с состоянием репродуктивной системы мидий в этот период линейного роста.

На основании относительных активностей ферментов аэробной и анаэробной фаз окисления получено, что в онтогенезе мидий соотношение между этими фазами окисления изменяется. Из ферментов

аэробной фазы максимальную активность проявляет сукцинатдегидрогеназа.

Уровень абсолютной и относительной (по отношению к ферментам анаэробной стадии окисления) активности сукцинатдегидрогеназы максимален у размерной группы 35—40 мм, что может обусловить большую смертность этой группы мидий в условиях низкого содержания кислорода или действия ионов тяжелых металлов.

1. Брайко В. Д., Дерешкевич С. В. Сезонные изменения в дыхании мидий // Биология моря. — 1978. — Вып. 44. — С. 31—36.
2. Виленина М. Н. Дыхание тканей некоторых морских беспозвоночных // Там же. — 1968. — Вып. 15. — С. 16—28.
3. Вержбинская Н. А., Шапиро А. З. Тканевой окислительный обмен мидий и его сезонные изменения // Физиология и биохимия беспозвоночных. — Л.: Наука, 1968. — С. 233—242.
4. Горомосова С. А., Шапиро А. З. Основные черты биохимии энергетического обмена мидий. — М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1984. — 118 с.
5. Проссер Л. Сравнительная физиология животных. — М.: Мир, 1977. — Т. 1. — 608 с.
6. Рокицкий П. Ф. Основы вариационной статистики для биологов. — Минск: Изд-во Белорус. ун-та, 1961. — 217 с.
7. Шапиро А. З. Свойства малатдегидрогеназы мышц мидии (*Mytilus galloprovincialis*) // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. — 1984. — 20, № 2. — С. 135—139.
8. Gubler C. S. Studies on the physiological functions of thiamine. I. The effects of thiamine deficiency and thiamine antagonisms on the oxidation of keto acids by rat tissues // J. Biol. Chem. — 1961. — 236, N 12. — P. 3112.
9. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. G. Protein measurement with the folin phenol reagent // Ibid. — 1951. — 193, N 1. — P. 265—275.

Ин-т биологии юж. морей
им. А. О. Ковалевского АН УССР,
Севастополь

Получено
17.03.86

A. Z. SHAPIRO, S. A. PETROV

ACTIVITY OF THE OXIDATIVE EXCHANGE ENZYMES IN MUSSELS (*MUTILUS GALLOPROVINCIALIS* L.) OF DIFFERENT SIZE

Summary

Data on the intensity of endogenic respiration oxidation, of the intermediate metabolites of the Krebs cycle (pyruvate, citrate, α -ketoglutarate, succinate) as well as of enzymes of carbohydrate catabolism in hepatopancreas of three size groups of mussels: 15-20, 35-40 and 55-65 mm are presented. Change in the activity of enzymes as dependent on the linear sizes is established only for the groups of 15-20 and 35-40 mm, that is connected with reproductive process. As to the relative activities of the above indices succinate dehydrogenase is suggested to be of particular concern in ontogenetic changes of the oxidative processes' intensity. Its absolute and relative activity is maximal in group of 35-40 mm, that can induce considerable damage of this stage of mussel ontogenesis under unfavourable conditions.

УДК 577.17.049—577 (260)

В. Н. ПОПОВИЧЕВ, В. Н. ЕГОРОВ

КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО И АЛИМЕНТАРНОГО ПОГЛОЩЕНИЯ ¹³⁷Cs ЧЕРНОМОРСКИМИ ИДОТЕЯМИ

Исследование роли пищи и водной среды в поглощении химических элементов и их радионуклидов гидробионтами имеет важное значение для решения проблемы миграции загрязнений по трофическим цепям.

В настоящей работе на примере идотей изучалось влияние различных концентраций цезия в пище и водной среде на кинетические ха-