

**ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВОГО МЕТАБОЛИЗМА
ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *ANADARA INAEQUIVALVIS* BR.
В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АНОКСИИ**

Исследовали особенности течения белкового метаболизма в тканях двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis* Br. в условиях экспериментальной аноксии. В отсутствии кислорода в жабрах и ноге животного отмечали усиление процессов белкового катаболизма, приводящих к снижению содержания белка, росту уровня свободных аминокислот и мочевины. Гидролизу подвергались преимущественно низкомолекулярные пептиды. Об этом свидетельствовало уменьшение активности катепсина D на фоне роста активности γ -глутамилтранспептидазы. При этом наблюдали рост активностей аланин- и аспартатаминотрансфераз, что предполагает усиление сукцинат-тиокиназной и фумаратредуктазной реакций.

Гипоксия является распространённым явлением в водах Мирового океана, что определяется низкой скоростью диффузии кислорода в водной среде [1, 11]. Считается, что глобальное потепление будет способствовать расширению гипоксических акваторий и приводить к качественной трансформации существующих экосистем, повышая роль толерантных к дефициту кислорода организмов [10, 11]. К ним относятся двустворчатые моллюски рода *Anadara* [9], обладающие высокой устойчивостью к экстремальным формам гипоксии и аноксии, способные обходиться без кислорода в течение 15 и более суток [8]. Гемолимфа этих животных содержит эритроцитарный гемоглобин и соответственно имеет высокую кислородную ёмкость, что отличает её от других видов двустворок [7, 16, 17]. Установлено, что в условиях нормоксии потребление кислорода у *A. inaequalvis* Br. в 7 раз меньше, чем у массового черноморского вида *Mytilus galloprovincialis* Lam. [5]. Эти качества предполагают наличие особенностей в организации тканевого метаболизма у *A. inaequalvis* Br. Данная работа посвящена изучению реорганизации белкового метаболизма в тканевых структурах *A. inaequalvis*, позволяющей адаптироваться к условиям аноксии.

Материал и методы. Сбор моллюсков проводили одновременно с коллекторных установок рыбодобывающего предприятия “Дон-Комп” (бухта Стрелецкая, Севастополь). Объектом исследования служили половозрелые особи *A. inaequalvis* (далее анадара) с длиной раковины 30 – 33 мм. Транспортировку животных осуществляли в контейнере насыпью без воды в течение 1 ч от момента сбора. Перед проведением исследований моллюсков выдерживали в аквариумах с проточной морской водой в течение 2 – 3 суток для снятия состояния стресса.

Эксперимент выполнен на специально разработанном стенде, который позволял поддерживать заданную температуру и концентрацию кислорода в воде. В камеру объёмом 13,5 л помещали 30 особей анадары. Содержание кислорода в воде снижали в течение 2,5 – 3,0 ч с 8,5 – 8,7 до 0 мг л⁻¹ прокачиванием N₂. Контроль за величиной PO₂ осуществляли потенциометрически. Применяли оксиметр ELWRO N 5221 (Польша). Температура воды поддерживали на уровне 20±1°C. Фотопериод – 12 ч день : 12 ч ночь. Экспозиция – 3 сут. Контрольная группа моллюсков содержалась в аналогичных условиях при концентрации кислорода в воде 8,5 – 8,7 мг л⁻¹ (95 – 97 % насыщения). Ежедневно в опыте и контроле производили полную смену воды в ёмкостях для удаления метаболитов.

Препарирование тканей проводили при температуре 0 – 4°C. Полученные образцы тканей ноги, жабр и гепатопанкреаса упаковывали в пищевую фольгу и хранили в жидком азоте. В последующем навески тканей гомогенизировали. В качестве трансфор-

мирующей среды использовали 1,15% KCl. Для получения супернатанта гомогенаты подвергали центрифугированию при 6000 об мин⁻¹ в течение 15 мин. Использовали рефрижераторную центрифугу К-23D (Германия).

Определение активностей аланин- и аспартатаминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) в тканях проводили при помощи динитрофенилгидрозинового метода [2]. Активность γ -глутамилтранспептидазы (γ -ГТП) оценивали по реакции с L- γ -глутамил-п-нитроанилидом, а катепсина-D – по кислоторастворимым продуктам ферментативного гидролиза гемоглобина [2]. Все измерения выполняли при 25,0 $\pm$ 0,5 $^{\circ}$ C. Одновременно определяли содержание в тканях белка по методу Лоури, аминного азота по реакции с нингидрином и мочевины – по реакции с диацетилмонооксимом [2]. Использовали стандартные наборы реактивов: «Simco, Ltd» (Украина) (при определении активностей АлАТ и АсАТ), ООО НПП «Филисит диагностика» (Украина) (при определении активности γ -ГТП) и «Lachema» (Чехия) (при определении содержания мочевины).

Сравнение выборочных совокупностей проводили на основе t-критерия Стьюдента. О нормальности распределения судили по сопоставлению среднеарифметической величины и моды. Результаты представлены как $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$.

Результаты и обсуждение. Двигательная активность животных в условиях аноксии полностью подавлялась. Большую часть времени моллюски находились с широко открытыми створками, нога выбрасывалась за пределы раковины. Периодически створки закрывались на короткий промежуток времени (20 – 30 мин). В течение 3 суток наблюдений ни одно из животных не погибло. Анализ особенностей течения метаболических процессов в организме анадары показал, что они имеют явно выраженную тканевую специфику.

Изменения параметров белкового обмена у особой анадары в условиях экспериментальной аноксии имело тканевую специфику.

Н о г а. В течение 3-дневной аноксии у моллюсков в ноге отмечали снижение содержания белка на 26,6 % ($p \leq 0,01$) (табл. 1), одновременно происходило увеличение уровня мочевины на 43,7 % ($p \leq 0,01$), пул свободных аминокислот анадары повышался на 35,3 % ($p \leq 0,001$). Отмеченные изменения позволяют констатировать усиление процессов белкового катаболизма.

Таблица 1. Содержание белка и ряда белковых метаболитов в тканях анадары в условиях аноксии

Table 1. Protein content and some protein metabolites in *Anadara inaequalis* tissues under conditions of experimental anoxia

Показатели	Виды тканей					
	нога		жабры		гепатопанкреас	
	контроль	аноксия	контроль	аноксия	контроль	аноксия
Белок, мкг мг ⁻¹ ткани	38,7 $\pm$ 1,2	28,4 $\pm$ 2,4	46,9 $\pm$ 4,0	35,9 $\pm$ 3,0	143,5 $\pm$ 12,5	116,4 $\pm$ 3,9
Аминок-ты, мкг мг ⁻¹ ткани (10 ⁻³)	68,5 $\pm$ 3,1	92,7 $\pm$ 5,0	192,6 $\pm$ 13,3	282,3 $\pm$ 11,5	285,1 $\pm$ 19,5	423,8 $\pm$ 37,9
Мочевина, мм мг ⁻¹ ткани	2,68 $\pm$ 0,24	3,85 $\pm$ 0,31	11,8 $\pm$ 4,2	25,0 $\pm$ 2,5	28,4 $\pm$ 2,3	15,7 $\pm$ 3,5

Примечание: объемы выборочных совокупностей – 10 особей

Отмеченные выше изменения происходили на фоне роста активностей аминотрансфераз (АлАТ и АсАТ) в ноге моллюска: на 31,0 и 28,0 % ($p \leq 0,05$) соответственно (табл. 2). Пропорциональное увеличение активности отмечали и в отношении γ -ГТП (табл. 2). Рост составил 37,4 % ($p \leq 0,05$). Незначительное повышение активности отмеча-

ли и в отношении катепсина-D (табл. 2), но оно не было статистически выражено. Из этого следует, что в тканях анадары при внешней аноксии гидролизу подвергаются не цельные белки, а олигопептиды, с которыми взаимодействует γ -ГТП, освобождая глутамат.

Известно, что в условиях дефицита кислорода в основу метаболической схемы, реализующейся в тканях устойчивых к гипоксии гидробионтов, положены сукцинаттиокиназная и фумаратредуктазная реакции, ключевая роль в которых принадлежит аланин- и аспаргатаминотрансферазам (АлАТ, АсАТ) [14]. Сукцинаттиокиназная реакция начинается с превращения гликолитического пирувата в аланин с образованием α -кетоглутарата, который в митохондриях окисляется до сукцината с восстановлением ГТФ. Процесс контролируется АлАТ, активность которой у гидробионтов многократно превосходит таковую у наземных позвоночных [13]. Рост активности АлАТ в ноге анадары, отмеченный в настоящих экспериментах, позволяет предполагать, что эта реакция реализуется в органах моллюска в условиях экспериментальной аноксии. Подтверждением этого является также рост активности γ -ГТП. Данный фермент катализирует реакцию отщепления глутаминовой кислоты от пептидов и способен обеспечивать ее транспорт [3]. При этом нормальное течение сукцинаттиокиназной реакции возможно только при достаточном ресурсе глутамата. Поставку данного соединения и обеспечивает γ -ГТП.

Таблица 2. Активность аминотрансфераз (АлАТ, АсАТ), γ -глутамилтранспептидазы (γ -ГТП) и катепсина D в тканях анадары в условиях аноксии
Table 2. Activity alanine and aspartate transaminase, γ -glutamyl transferase and katepsin D in *Anadara inaequalis* tissues under conditions of experimental anoxia

Активность ферментов	Виды ткани					
	нога		жабры		гепатопанкреас	
	контроль	аноксия	контроль	аноксия	контроль	аноксия
АлАТ, мкмоль мг ⁻¹ белка мин ⁻¹	0,2898 ±0,0134	0,384 ±0,0311	0,185 ±0,0287	0,2929 ±0,0158	0,1959 ±0,0078	0,139 ±0,0033
АсАТ, мкмоль мг ⁻¹ белка мин ⁻¹	0,0998 ±0,0074	0,1281 ±0,0088	0,0967 ±0,0094	0,1405 ±0,0098	0,1015 ±0,0079	0,0773 ±0,0098
γ -ГТП, мкмоль мг ⁻¹ белка мин ⁻¹	0,002 ±0,0002	0,0028 ±0,0001	0,0051 ±0,0008	0,0084 ±0,0004	0,0037 ±0,0008	0,006 ±0,0010
Катепсин, нмоль тиразина мг ⁻¹ белка мин ⁻¹	3,3641 ±0,3162	4,5712 ±0,8654	6,6353 ±0,5566	4,3445 ±0,4813	2,6753 ±0,2902	1,1535 ±0,2519

Примечание: объёмы выборочных совокупностей – 10 особей

Другой путь, который развивается в тканях гидробионтов в условиях гипоксии, является фумаратредуктазная реакция. Она начинается с трансформации аспартата в оксалоацетат под контролем АсАТ с последующим восстановлением до малата. При этом высвобождается глутамат, который может быть использован в сукцинаттиокиназной реакции [14]. Малат, поступая в митохондрии, затем превращается в фумарат и восстанавливается до сукцината. Клетка при этом получает одну молекулу АТФ. Эта реакция катализируется МДГ, активность которой в условиях гипоксии существенно повышается на фоне угнетения лактатдегидрогеназы [6, 12, 15]. В настоящих исследованиях

зарегистрирован существенный рост активности АсАТ в ноге моллюсков. Это позволяет рассматривать фумаратредуктазную реакцию, как возможный метаболический процесс, реализуемый в условиях внешней аноксии.

Ж а б р ы. Реакция жаберной ткани моллюска на условия экспериментальной аноксии была близкой к рассмотренной выше. Содержание белка в ней понижалось на 23,5 % ($p \leq 0,05$) (табл. 1). Это происходило на фоне увеличения уровня мочевины и пула свободных аминокислот соответственно в 2,1 раза ($p \leq 0,05$) и на 46,6 % ($p \leq 0,001$).

В жабрах, также как и в ноге моллюска, в условиях аноксии отмечали рост активностей аминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) и γ -ГТП (табл. 2). Активности АлАТ и АсАТ повышались соответственно на 58,4 ($p \leq 0,01$) и 45,4 % ($p \leq 0,01$), а γ -ГТП – на 65,9 % ($p \leq 0,01$). Активность катепсина-D, напротив, снижалась на 34,6 % ($p \leq 0,01$) (табл. 2).

Г е п а т о п а н к р е а с. Метаболические процессы, развивающиеся в данном органе в условиях экспериментальной аноксии, имели ряд принципиальных особенностей в сравнении с ногой и жабрами моллюска. Также как и в двух предыдущих случаях в гепатопанкреасе происходило снижение содержания белка на 18,9 % ($p \leq 0,05$) и повышался пул свободных аминокислот на 48,6 % ($p \leq 0,01$) (табл. 1). Однако это происходило на фоне снижения, а не роста уровня мочевины в органе. Различия в сравнении с контрольной группой составили 44,7 % ($p \leq 0,01$).

Активности АлАТ и АсАТ в условиях аноксии, в отличие от жабр и ноги, понижались соответственно на 29,1 ($p \leq 0,001$) и 24,5 % ($p \leq 0,05$) (табл. 2). При этом активность γ -ГТП увеличивалась на 60,6 % ($p \leq 0,05$). Снижение активности отмечали и в отношении катепсина-D. Оно составило 57,1 % ($p \leq 0,001$).

Подобное соотношение процессов позволяет говорить о том, что гепатопанкреас, скорее, продуцирует определённую смесь аминокислот, нежели использует её в собственном метаболизме. Данная смесь с током гемолимфы распространяется по организму и утилизируется периферическими тканями моллюска.

Выводы. В условиях экспериментальной аноксии в организме анадары развивался ряд адаптивных изменений: **1.** В жабрах и ноге анадары усиливались процессы белкового катаболизма, приводящие к снижению содержания белка, росту уровня свободных аминокислот и мочевины. Гидролизу подвергались преимущественно низкомолекулярные пептиды. Об этом свидетельствовало уменьшение активности катепсина-D на фоне роста активности γ -ГТП. **2.** Аноксия повышала активность АлАТ и АсАТ, что, вероятно, отражает усиление сукцинаттиокиназной и фумаратредуктазной реакций. **3.** Метаболические процессы в гепатопанкреасе моллюска в отсутствии кислорода ориентированы на продукцию аминокислот, а не на их утилизацию.

1. *Бордовский О. К.* Химия океана / О.К. Бордовский, В.Н. Иваненков. – М., 1979. – 1. – 354 с.
2. *Камышников В. С.* Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников. – 2-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – С. 499-501.
3. *Кучеренко Н.Е.* Биохимический справочник / Н.Е. Кучеренко [и др.]. – К.: Вища школа, 1979. – 304 с.
4. *Немова Н. Н.* Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб / Н.Н. Немова. – Петрозаводск: 1996. – 104 с.
5. *Солдатов А. А.* Тканевая специфика метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца *Anadara inaequalis* Br. / Солдатов А. А. [и др.] // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-та. Серія: біологія. – 2005. – 4, № 27. – С. 230 – 232.
6. *Almeida-Val V. M. F.* Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: *Cichlidae*): contribution of tissue enzyme levels / V.M.F. Almeida-Val [et al] // Comp. Biochem. Physiol. – 2000. – 125, № 2. – P. 219–226.
7. *Chiancone E.* Dimeric and tetrameric hemoglobins from the bivalves *S. Inaequivalves*. / E. Chiancone, P. Vecchini, D. Verzili, F. Ascoli // J. Mol. Biol. – 1981. – № 152. – P. 577–592.
8. *De Zwaan A.* Anoxic survival potential of bivalves: (arte) facts / A. de Zwaan, M. F. Babarroa Jose, M. Monarib, O. Cattani // Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology. – 2002. – 131, № 3. – P. 615–624.

9. *Differential survival of Venus gallina and Scapharca inaequalvis during anoxic stress: Covalent modification of phosphofructokinase and glycogen phosphorylase during anoxia* / S.P.J. Brooks [et al.] // J. Compar. Physiol. B. – 1991. – **161**, № 2. – P. 207–212.
10. *Joyce S. The dead zones: oxygen-starved coastal waters* / S. Joyce // Environ. Health Perspective. – 2000. – **108**, № 3. – P. 120–125.
11. *Low oxygen expression and the poleward undercurrent on the Angola-Namibia shelf, July 1999* / C.M. Duncombe-Rae [et al.] // 10th SAMSS. – 2000. – **22-26**. – P. 1–7.
12. *Martinez M.L. Effects of long-term hypoxia on enzymes of carbohydrate metabolism in the Gulf killifish, Fundulus grandis* / M. L. Martinez [et al.] // J. Exp. Biol. 2006. – **209**, Pt 19. – P. 3851–3861.
13. *Mommsen Th. P. Sites and patterns of protein and amino acid utilization during spawning migration of salmon* / Th. P. Mommsen, C.J. French, P.W. Hochachka // Can. J. Zool. – 1980. – **58**. – P. 1785–1799.
14. *Owen T.G. Purification and properties of dolphin muscle aspartate and alanine transaminases and their possible roles in the energy metabolism of diving mammals* / T.G. Owen, P.W. Hochachka // Biochem. J. – 1974. – **143**. – P. 541–553.
15. *Panepucci L. Changes in lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities during hypoxia and after temperature acclimation in the armored fish, Rhinelepis strigosa (Siluriformes, Loricariidae)* / L. Panepucci, M.N. Fernandes, J.R. Sanches, F.T. Rantin // Rev. Bras. Biol. – 2000. – **60**, № 2. – P. 353–360.
16. *Phuc T.H. Biological characters and technique of oyster Anadara granosa culture at Tra Vinh coast water* / T.H. Phuc // Fisheries review. – 1997. – № 6. – P. 7–9.
17. *Tandavanitj S. Moving behaviour of the blood cockles Anadara granosa and A. nodifera* / S. Tandavanitj, V. Vongpanich, S. Svend // Proc. Workshop of the Tropical Marine Mollusc Programme (TMMP) on Central and West Java, Indonesia conducted at IPB, UNDIP, LIPI – 1996, Indonesia, 11–22 Nov. 1996. – Spec. Publ. Phuket Mar. Biol. Cent. Part 1. – 1997. – **17**, № 1. – P. 237–239.

Інститут біології южних морей НАН України
Севастополь, Україна

Получено 15 ноября 2009 г.

T. I. ANDREENKO

ОСОБЛИВОСТІ РЕОРГАНІЗАЦІЇ БІЛКОВОГО МЕТАБОЛІЗМУ ДВОСТУЛКОВОГО МОЛЮСКА *ANADARA INAEQUALVIS* В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ АНОКСІЇ

Резюме

Досліджували особливості плину білкового метаболізму в тканинах двостулкового молюска *Anadara inaequalvis* в умовах експериментальної аноксії. В умовах аноксії в зябрах і нозі тварини відбувається посилення процесів білкового катаболізму, що призводить до зниження вмісту білка, зростання рівня вільних амінокислот і сечовини. Гідролізу піддаються переважно низькомолекулярні пептиди. Про це свідчить зменшення активності катепсину D на фоні зростання активності гаммаглутамілтрансептидази. Аноксія супроводжується посиленням сукцинаттіокіназної і фумаратредуктазної реакцій. Це знаходить відображення в зростання активності аланін- і аспартатамінотрансфераз.

T. I. ANDREENKO

CHARACTERISTICS OF PROTEIN METABOLISM IN BIVALVE MOLLUSC *ANADARA INAEQUALVIS* BR. UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ANOXIA

Summary

Peculiarities of the course of protein metabolism in tissues of the bivalve mollusc *Anadara inaequalvis* Br. were studied under conditions of experimental anoxia. In the absence of oxygen, in gill and foot the protein catabolism processes were found to be enhanced; this led to a decrease of the protein content and to an increase of the free amino acid urea levels. Predominantly hydrolyzed were low molecular peptides, which were indicated by a decrease of the cathepsin D activity on the background of a rise of the γ -glutamyltranspeptidase activity. Anoxia was accompanied by enhancement of the succinate thiokinase and fumarate reductase reaction controlled by alanine and aspartate aminotransferases. Metabolic processes in the mollusc hepatopancreas were oriented to production of amino acids.