

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ
ИМ. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

ПРОВ 2010

ПРИН. НАУ

ПРОВ 98

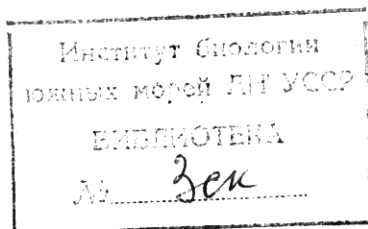
БИОЛОГИЯ МОРЕЯ

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ
МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

Основан в 1965 г.

Выпуск 48

ДОННЫЕ СООБЩЕСТВА
И МОРСКИЕ ОБРАСТАНИЯ



КИЕВ «НАУКОВА ДУМКА» 1979

11. *Hammen C. S., Wilbur K. M.* Carbondioxide fixation in marine invertebrates. 1. The main pathway of the oysters.—*J. Biol. Chem.*, 1959, **234**, N 2, p. 1268—1271.
12. *Hammen C. S.* Aminotransferase activities and amino acid excretion of bivalve molluscs and brachiopods.—*Comp. Biochem. und Physiol.*, 1968, **26**, N 4, p. 687—705.
13. *Hochachka P. W., Fielde I. J., Mustafa T.* Animal life without oxygen: basic biochemical mechanisms.—*Amer. Zool.*, 1973, **13**, N 4, p. 543—555.
14. *Jorday L. H., Wilbur K. M.* Studies of shell formation. IV. The respiratori metabolism of the oyster mantle.—*Biol. Bull.*, 1955, **108**, N 3, p. 346—358.
15. *Karmen A. J.* A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum.—*J. Clin. Invest.*, 1955, **34**, N 1, p. 131—132.
16. *Manohar L., Vencateswara P. Rao, K. S. Swamy.* Variations in aminotransferase activity and total free amino acids level in the body fluid of the snail *Lymnaea luteola* during different larval trematode infections.—*J. Invertebr. Pathol.*, 1972, **19**, N 1, p. 36—41.
17. *De Zwaan A., Wijsman T. C. M.* Characteristics of anaerobic metabolism.—*Comp. Biochem. and Physiol.*, 1976, **54**, N 3B, p. 313—325.
18. *Wroblewski F., La Due.* Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease.—*Proc. Soc. Expt. Biol. and Med.*, 1956, **91**, p. 565—569.

Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского АН УССР

Поступила в редколлегию
20.09.77

S. A. Goromosova, V. A. Tamozhnaja

THE LEVEL OF TRANSAMINASE ACTIVITY IN MUSSELS TISSUES UNDER STANDARD AND HYPOXIA CONDITIONS

Summary

The paper deals with activity and some characteristics of a cytoplasmatic fraction of transamination enzymes: alanin and aspartate transaminase (AlAT and AAT). The data obtained evidencing for a relatively high activity of AlAT (AlAT/AAT=1). High affinity of the enzymes for α -ketoglutarate and low affinity for amino acids, aspartate and alanine, is shown. Activity of transferases under conditions of hypoxia is activated 60-120 min after the onset of the effect and then comes to the control level. Copper ions in concentrations of 0.5 and 5.0 mg/l inhibit activity of transferases.

УДК 595.356:591.133.2:591.044

А. З. Шапиро, А. Н. Бобкова

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ГЛИКОЛИЗА В ТКАНЯХ БАЛЯНУСОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ НЕКОТОРЫХ ЯДОВ

Сведения о метаболизме циррипедиевых касаются в основном интенсивности дыхания [2], биохимического состава тела [11, 12], активности некоторых ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и гликолитического процесса [4, 9, 10, 13]. Однако влияние токсических соединений на отдельные звенья метаболических процессов у баянусов исследованы крайне недостаточно.

В настоящей статье представлены данные об изменении активности начальных и конечных ферментов гликолитической цепи в тканях баянусов под влиянием токсических соединений, входящих в состав необразуемых красок.

Начальные ферменты цепи превращения углеводов — гексокиназа (ГК) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФДГ) — представляют интерес в связи с тем, что активность этих ферментов может определять интенсивность процессов гликолиза и пентозо-фосфатного шунта [3]. Ранее нами было показано, что перечисленные ферменты в тканях баянусов в норме не являются лимитирующими звеньями указанных процессов [10]. Оставалось неясным, как изменяются активности ГК

и Г-6-ФДГ в тканях баянусов и могут ли эти ферменты при отравлении ограничивать интенсивность углеводного обмена. В связи с тем что определение значений ферментных активностей необходимо для характеристики интенсивности углеводного обмена и установления его роли в общем энергетическом обмене тканей при отравлении, нами было исследовано влияние растворов сульфата меди и бис-трибутилоловооксида на активность указанных ферментов.

Знание активности конечных ферментов гликолиза — лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и малатдегидрогеназы (МДГ) — важно для изучения возможности этих ферментов поддерживать уровень окисленных и восстановленных пиридиннуклеотидов, необходимый для функционирования гликолитической системы.

Материал и методика

Объектом исследования служили усоногие рачки *Balanus improvisus* Darv. В качестве токсических агентов применяли ионы меди в виде сульфата меди и оловоорганический комплекс бис-трибутилоловооксид (ТБТО), растворы которого представляли двухнедельные настои вещества (1 г/л) на морской воде. Более низкие концентрации этого яда получали соответствующим разбавлением основного раствора профильтрованной морской водой.

Активность ГК, Г-6-ФДГ, ЛДГ и МДГ определяли по методикам, описанным нами ранее [10]. Электрофоретическое разделение изоэнзимов ЛДГ проводили в полиакриламидном геле по методике Дэвиса и Орнштейна (Davis, Ornstein) [14]. Среда для окраски зимограмм содержала 36—240 мг лактата натрия для Н и М изоэнзимов соответственно; 4 мг НАД, 3,5 мг нитросинего тетразолия, 0,25 мг феназинметасульфата в 10 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 7,6. Выделение и частичную очистку ЛДГ мышц краба проводили по Калустяну [15]. Результаты обработаны статистически [7]. Цифровые данные, представленные в таблицах и рисунках, являются средними из 4—6 опытов.

Результаты и обсуждение

Как показали опыты, ионы меди ни при одной из применяемых концентраций, включая концентрации, вызывающие 50% гибель организмов, не влияли на активность ГК и Г-6-ФДГ — начальных ферментов углеводного обмена. Оловоорганический яд ТБТО при этих же условиях также не изменял активности указанных ферментов, и только при 70—80% гибели организмов наблюдалось снижение активности ГК на 30% по сравнению с контролем (рис. 1).

Наряду с определением активности ферментов в тканях баянусов, находившихся в токсических растворах, мы измеряли активность этих ферментов в тканях животных, содержащихся в анаэробных условиях, в связи с тем что первая реакция баянусов на действие неблагоприятных факторов заключалась в изоляции организма от окружающей среды плотным смыканием крышек домика, что вызывало гипоксические условия внутри раковинки [2]. Так как при гипоксии возникает сложный комплекс нарушений различных систем организма, включая и ферментативные [1], мы изучали влияние этого фактора на активность ферментов.

Опыты показали, что гипоксические условия приводят к достоверной активации ГК и Г-6-ФДГ ($p \leq 0,05$) (рис. 1). Еще более значительные изменения активности ГК и Г-6-ФДГ в гипоксических условиях происходят в инкубационных средах, не содержащих соответствующих экзогенных субстратов (глюкозы для гексокиназной реакции и глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф) для глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной). Активность

ГК, измеренная в полной инкубационной среде в тканях опытных организмов, увеличивалась в 1,5 раза, а в среде, не содержащей глюкозы,— в 5,4 раза (табл. 1).

Аналогичный феномен был отмечен и для Г-6-ФДГ после отравления бальянусов ионами меди, причем степень активирования фермента зависела от продолжительности экспозиции. Так, после 15-часового отравления бальянусов ионами меди в неполной инкубационной среде активность фермента возросла в 2 раза, а 30-часовая экспозиция вызывала 10-кратное увеличение активности Г-6-ФДГ, тогда как способность энзимных систем утилизировать экзогенный субстрат у опытных и контрольных организмов была равна (табл. 2). Чтобы представить механизм активации ГК в условиях гипоксии, ее активность измеряли, добавляя последовательно в инкубационную среду никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ), аденозинтрифосфат (АТФ) и глюкозу. Добавление в среду НАДФ стимулировало активность фермента в 2,5 раза больше у гипоксических животных. Последующее добавление АТФ вызывало активацию ГК у гипоксических организмов и незначительный эффект у контрольных. Добавление в инкубационную среду субстрата данного фермента глюкозы незначительно влияло на активность фермента при гипоксии, в то время как у контрольной группы эта же концентрация глюкозы увеличивала активность фермента в 4 раза (табл. 1).

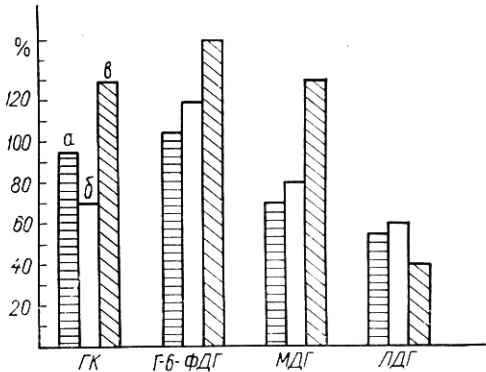


Рис. 1. Активность ферментов при воздействии ядов и в условиях гипоксии, % к контролю:
а — ионы меди, концентрация 1,5 мг/л; б — комплекс ТБТО, концентрация 0,9 мг/л; в — гипоксия в течение 30 ч.

Таблица 1
Изменение активности гексокиназы в усонажках бальянусов в условиях гипоксии

Последовательность внесения реактивов в инкубационную среду	Интенсивность восстановления НАДФ, нмоль·мг белка ⁻¹ × мин ⁻¹	
	Контроль	Гипоксия (30 ч)
3 мкМ НАДФ	7,0±0,5	18,0±1,2
3 мкМ НАДФ+ 5 мкМ АТФ	11,9±1,6	64,3±4,5
3 мкМ НАДФ+ 5 мкМ АТФ+ 90 мкМ глюкозы	49,0±6,7	73,5±3,4

изменением метаболического фонда тканей, в частности с накоплением эндогенных субстратов гликолиза за счет усиленного амилолитического расщепления гликогена [4], т. е. в данной ситуации мы наблюдаем регуляцию активности ферментов концентрацией метаболитов [6].

Более чувствительными к действию ионов меди оказались конечные ферменты углеводного обмена — МДГ и ЛДГ, окисляющие в цитоплазме восстановленные нуклеотиды (НАДН). Активность МДГ под действием ионов меди снижалась на 25—30%, ЛДГ — на 40—45%

(рис. 1), т. е. МДГ проявляет большую устойчивость к действию ионов меди, чем ЛДГ. Более резистентной оказалась МДГ и к раствору ТБТО, который ингибировал активность фермента на 20—25%, тогда как активность ЛДГ в этих же условиях снижалась на 40% (рис. 1).

Электрофоретические и кинетические исследования ЛДГ также показали ингибирующее влияние ТБТО на активность фермента (рис. 2, 3). Данные, представленные на рис. 2, свидетельствуют о том, что влиянию токсиканта подвергались все изоэнзимы, активирующиеся как низкими, так и высокими концентрациями пирувата. Это полностью согласуется с результатами денситометрии зимограмм, полученных при электрофоретическом разделении энзима — на рис. 3 четко прослеживается снижение активности катодных и анодных изоэнзимов ЛДГ.

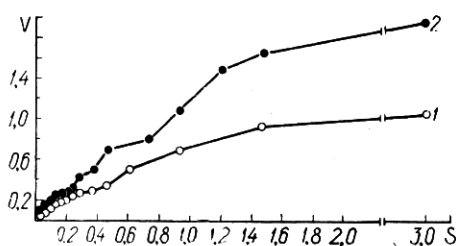


Рис. 2. Изменение активности изоэнзимов ЛДГ (V , $\mu\text{моль} \cdot \text{мг белка}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) мышц краба под действием ТБТО (1); контроль (2).

Данные спектрофотометрического анализа.
S — концентрация субстрата, моль/л.

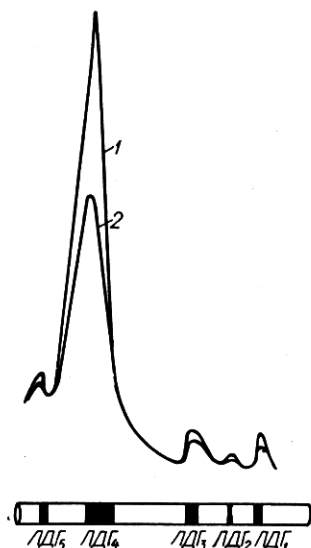


Рис. 3. Электрофореграммы препарата ЛДГ мышц краба в полиакриламидном геле: 1— контроль, 2— действие ТБТО.

Снижение содержания кислорода в среде по-разному влияло на активность МДГ и ЛДГ: активность ЛДГ снижалась, а МДГ повышалась (рис. 1). Различная реакция конечных ферментов углеводного обмена на гипоксические условия имеет адаптивное значение. Это положение подтверждается следующими данными. Как известно, ключевой особенностью биологических окислительно-восстановительных реакций является цикличность восстановления и окисления НАДН. Клетка поддерживает стационарное содержание нуклеотида благодаря процессам, в ходе которых восстановленные молекулы кофакторов вновь окисляются. К таким процессам в цитоплазме относится превращение пирувата в лактат, катализируемое ЛДГ, и щавелево-уксусной кислоты в малат в

Таблица 2
Влияние ионов меди (250 мкг/л) на активность глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы в усонаожках баянусов

Условия измерения	Активность фермента, нмоль·мг белка ⁻¹ ·мин ⁻¹		Продолжительность воздействия, ч
	Контроль	Раствор сульфата меди	
Без Г-6-Ф	12±0,8	23±1,1	15
10 мкМ Г-6-Ф	108±6,7	112±16,3	
Без Г-6-Ф	8±0,9	71±8,2	30
10 мкМ Г-6-Ф	90±3,1	97±5,3	

присутствии МДГ. Полученные данные о значительном ингибировании ЛДГ свидетельствуют о снижении роли этого фермента в окислении цитоплазматического НАДН при токсических воздействиях. В этих условиях возрастает роль МДГ в поддержании уровня НАДН, необходимого для гликолитического процесса.

Высокую устойчивость начальных ферментов гликолиза и различную чувствительность МДГ и ЛДГ к токсическим агентам можно рассматривать как биохимические адаптации, проявляющиеся на уровне метаболических функций и обеспечивающие резистентность усоногих рачков к неблагоприятным воздействиям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Барабашова З. И.* Акклимация к гипоксии и ее физиологические механизмы. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1960, с. 98—103.
2. *Брайко В. Д.* Интенсивность дыхания баянусов (*Balanus improvisus* Darwin) в норме и при воздействии некоторых ядов.— *Биология моря*, Киев, 1975, вып. 35, с. 26—35.
3. *Вержбинская Н. А.* Функциональная организация ферментной системы гликолиза в мышечной и нервной тканях у головоногих моллюсков и низших рыб.— *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, 1972, 8, с. 260—268.
4. *Горомосова С. А.* Соотношение амилазной и фосфорилазной активностей в мышцах беспозвоночных.— В кн.: *Биохимическая эволюция*. Л., Наука, 1975, с. 48—51.
5. *Горомосова С. А., Шапиро А. З., Бобкова А. Н.* Биохимические адаптации организмов зоообластаний — причина их устойчивости к действию ядов.— *Биология моря*, Киев, 1975, вып. 35, с. 42—52.
6. *Малер Г., Кордес Ю.* Основы биологической химии. М., Мир, 1970, с. 276—277.
7. *Рокицкий П. Ф.* Основы вариационной статистики для биологов. Минск, Изд-во Белорус. ун-та, 1961, с. 1—217.
8. *Шапиро А. З.* Энергетический обмен в тканях пластинчатожаберного моллюска *Mytilus galloprovincialis*. Автореф. канд. дис. Л., 1969, 19 с.
9. *Шапиро А. З., Бобкова А. Н.* Суммарная интенсивность гликолиза в тканях ракообразных.— В кн.: *Биохимическая эволюция*. Л., Наука, 1973, с. 38—41.
10. *Шапиро А. З., Бобкова А. Н.* Активность гликолитических ферментов в тканях беспозвоночных.— В кн.: *Биохимическая эволюция*. Л., Наука, 1973, с. 42—45.
11. *Barnes H., Barnes M., Finlayson D. M.* The seasonal changes in weight, biochemical composition and oxygen uptake of two common boreo-arctic cirripedes, *Balanus balanoides* and *B. balanus*.— *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 1963, 43, N 1, p. 185—211.
12. *Barnes H., Blackstock J.* Seasonal changes in the activity of certain enzymes in crude tissue extracts of two common cirripedes, *Balanus balanoides* and *B. balanus*.— *J. Exp. Mar. Biol. and Ecol.*, 1975, 19, N 2, p. 81—96.
13. *Boulton A. D., Huggins A. K.* Glycolytic activity in crustaceans.— *Comp. Biochem. and Physiol.*, 1970, 33, N 3, p. 491—498.
14. *Davis B. J., Ornstein Z.* A new high resolution electrophoresis method.— In: *Delivered at the Soc. Study Blood Neij. Acad. Med.*, 1959, p. 145—189.
15. *Kaloustich H. D., Stolzenbach F. E., Everse J., Kaplan N. O.* Lactate dehydrogenase of lobster (*Homarus americanus*) tail muscle. I. Physical and chemical properties.— *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, N 11, p. 2891—2901.
16. *Zwaan A. de, Wijsman T. C. H.* Anaerobic metabolism in bivalvia (Mollusca). Characteristics of anaerobic metabolism.— *Comp. Biochem. and Physiol.*, 1976, 54, N 3, p. 313—324.

Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского АН УССР

Поступила в редколлегию
12.11.77

A. Z. Shapiro, A. N. Bobkova

CHANGES IN GLYCOLYSIS ENZYMES ACTIVITY IN THE BALANUS IMPROVISUS TISSUES UNDER THE EFFECT OF CERTAIN POISONS

Summary

Copper ions and bis-tributyltin oxide evoke weak changes in the activity of initial enzymes and more essential inhibition in the activity of finite enzymes of carbohydrate metabolism in *Balanus improvisus*.

The mechanism of changes in the activity of the enzymes under effect of the studied poisons is analyzed.