



УДК 594.1:577.121:612.22

© 2009

Т. И. Андрееенко, А. А. Солдатов, И. В. Головина

**Адаптивная реорганизация метаболизма
у двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis*
Bruguiere в условиях экспериментальной аноксии**

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Г. Е. Шульманом)

Показано, що за умов експериментальної аноксії в зябрах та нозі анадари процеси білкового катаболізму посилюються, що спричиняє зниження вмісту білка, підвищення рівня вільних амінокислот і сечовини. Гідролізу піддаються переважно низькомолекулярні пептиди, про що свідчить зниження активності катепсину D на фоні підвищення активності γ -глутамілтранспептидази. Аноксія супроводжується посиленням сукцинаттіокіназної та фумаратредуктазної реакцій, які контролюються аланін- та аспартамінотрансферазами. Вони запобігають накопиченню токсичного лактату в тканинах і дозволяють одержувати додатковий ресурс АТФ і ГТФ. Активність лактатдегідрогенази знижується, а малатдегідрогенази залишається високою. Метаболічні процеси в гепатопанкреасі моллюска у відсутності кисню орієнтовані на продукцію амінокислот, а не на їх утилізацію.

Бентосные формы жизни практически постоянно сталкиваются с дефицитом кислорода ввиду ограниченного водообмена в придонных слоях воды. Состояние гипоксии для них является функциональной нормой и предполагает принципиальную реорганизацию тканевого метаболизма. Ферментативные системы митохондрий у гидробионтов, устойчивых к гипоксии, могут быть задействованы в анаэробных процессах генерации энергии. Посредством данного органоида гликолитические реакции сопрягаются с реакциями белкового катаболизма. Показано, что гипоксия наряду с усилением анаэробного гликолиза приводит к снижению пула свободных аминокислот и накоплению аланина и сукцината в тканях [1, 2]. Содержание малата, оксалоацетата при этом снижается, а уровень α -кетоглутарата возрастает, что свидетельствует об усилении распада белков и процессов переаминирования отдельных аминокислот (глутамата и аланина) [3, 4]. Это позволяет получать дополнительный ресурс макроэргов без накопления токсичных метаболитов в тканях.

Особый интерес представляют организмы, ведущие роющий образ жизни и способные длительный период времени обходиться без кислорода. К ним относятся двустворчатые мол-

люски рода *Anadara* [5]. Сравнительные исследования показали, что в условиях нормоксии интенсивность потребления кислорода у них в 5–6 раз меньше, чем у других массовых видов двустворок [6]. Эти отличия позволяют предположить наличие особенностей в организации тканевого метаболизма у данной группы организмов в условиях внешней аноксии.

Экспериментальная часть работы выполнена на специально разработанном стенде, который позволял поддерживать заданную температуру и концентрацию кислорода в воде. В камеру объемом 13,5 л помещали 30 особей анадары (длина раковины 30–33 см). Содержание кислорода в воде снижали в течение 2,5–3,0 ч с 8,5–8,7 до 0 мг/л прокачиванием N₂. Контроль за величиной P_{O₂} осуществляли потенциометрически. Температуру воды поддерживали на уровне (20 ± 1) °С. Фотопериод — 12 ч день : 12 ч ночь. Продолжительность экспозиции — 3 сут. Контрольная группа моллюсков содержалась в аналогичных условиях при концентрации кислорода в воде 8,5–8,7 мг/л (95–97% насыщения). Ежедневно в опыте и контроле производили полную замену воды в емкостях для удаления метаболитов. Препарирование тканей проводили при 0–4 °С. Полученные образцы гепатопанкреаса, жабр и ноги упаковывали в пищевую фольгу и хранили в жидком азоте.

В тканях моллюсков оценивали активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), малатдегидрогеназы (МДГ) по скорости окисления НАДН₂ [7], аланин- и аспартатаминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) динитрофенилгидрозиновым методом Райтмана-Френкеля [8]. Активность γ -глутамилтранспептидазы (γ -ГТП) оценивали по реакции с L- γ -глутамил-*n*-нитроанилидом, а катепсина D — по кислоторастворимым продуктам ферментативного гидролиза гемоглобина [8]. Все измерения выполняли при (25,0 ± 0,5) °С. Одновременно определяли содержание в тканях белка по методу Лоури, аминного азота по реакции с нингидрином и мочевины по реакции с диацетилмонооксимом [8]. Концентрацию глюкозы в тканях оценивали глюкозидазным методом, лактата — ферментативным методом по скорости восстановления НАДН₂, пирувата — по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [8].

Анализ особенностей течения метаболических процессов в организме анадары показал, что они имеют выраженную тканевую специфику. В условиях экспериментальной аноксии содержание глюкозы, лактата и пирувата в ноге и жабрах анадары не изменялось (табл. 1). Имеющиеся различия не были статистически выражены. Одновременно отмечали снижение содержания белка на 26,6% ($p < 0,01$) и 23,5% ($p < 0,05$) и увеличение уровня мочевины

Таблица 1. Содержание отдельных углеводных метаболитов, активность ЛДГ и МДГ в тканях анадары в условиях нормо- и аноксии

Показатель	Вид ткани					
	Нога		Жабры		Гепатопанкреас	
	Нормоксия	Аноксия	Нормоксия	Аноксия	Нормоксия	Аноксия
Глюкоза, нмоль/мг ткани	1,52 ± 0,48	2,41 ± 0,67	6,31 ± 0,87	4,26 ± 1,54	12,1 ± 1,0	7,25 ± 1,39
Лактат, нмоль/мг ткани	2,02 ± 0,29	1,50 ± 0,21	5,87 ± 0,93	5,72 ± 1,61	8,30 ± 1,31	7,42 ± 2,23
Пируват, нмоль/мг ткани	0,75 ± 0,05	1,05 ± 0,16	1,25 ± 0,21	1,83 ± 0,25	1,79 ± 0,31	1,51 ± 0,70
ЛДГ, мкмоль/(мин · мг белка)	0,029 ± 0,009	0,008 ± 0,002	0,034 ± 0,015	0,007 ± 0,002	0,027 ± 0,008	0,006 ± 0,002
МДГ, мкмоль/(мин · мг белка)	0,108 ± 0,017	0,083 ± 0,022	0,069 ± 0,010	0,057 ± 0,013	0,051 ± 0,015	0,040 ± 0,014

Примечание. Объемы выборочных совокупностей — 10 особей.

на 43,7% ($p < 0,01$) и в 2,1 раза ($p < 0,05$) соответственно (табл. 2). Пул свободных аминокислот в ноге и жабрах моллюска повышался на 35,3% ($p < 0,001$) и 46,6% ($p < 0,001$) соответственно, что позволяет констатировать усиление процессов белкового катаболизма.

Указанные выше изменения происходили на фоне снижения активности ЛДГ в обоих тканях в 3,0–3,5 раза ($p < 0,001$) при сохранении активности МДГ на уровне контрольных значений (см. табл. 1). Одновременно возрастала активность АлАТ и АсАТ на 31,0–58,4 и 28,0–45,4% ($p < 0,05$ – $0,01$) соответственно, а также γ -ГТП на 37,4–65,9% ($p < 0,05$ – $0,01$) (см. табл. 2). Активность катепсина D либо не изменялась (нога), либо снижалась на 34,6% ($p < 0,01$) (жабры).

Метаболические процессы, развивающиеся в гепатопанкреасе в условиях экспериментальной аноксии, имели ряд принципиальных особенностей. Также как в ноге и жабрах, в гепатопанкреасе происходило уменьшение содержания белка на 18,9% ($p < 0,05$) и повышение пула свободных аминокислот на 48,6% ($p < 0,01$) (см. табл. 2). Однако это наблюдалось на фоне снижения, а не роста уровня мочевины в данном органе. Различия в сравнении с контрольной группой составили 44,7% ($p < 0,01$). Одновременно отмечали уменьшение содержания глюкозы на 40,1% ($p < 0,05$) и снижение активности ЛДГ — в 3 раза (см. табл. 1). При этом концентрация лактата, пирувата и активность МДГ в органе оставалась на уровне контроля. Активность АлАТ и АсАТ в условиях аноксии, в отличие от таковой в жабрах и ноге, снижалась на 29,1% ($p < 0,001$) и 24,5% ($p < 0,05$) соответственно. При этом активность γ -ГТП увеличивалась на 60,6% ($p < 0,05$). Снижение активности отмечали и в отношении катепсина D — на 57,1% ($p < 0,001$).

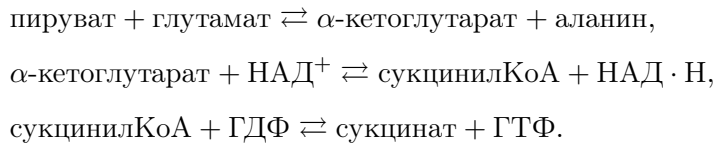
Полученные результаты позволяют констатировать, что в условиях аноксии организм анадарты избегал накопления токсичного лактата. Ни в одном из исследованных органов содержание данного соединения не повышалось. При этом активность ЛДГ снижалась, а использование углеводных субстратов явно ограничивалось. Однако это не означает, что гликолитические процессы в этих органах полностью подавлялись. Более вероятным событием является переключение их на образование менее токсичных метаболитов.

Таблица 2. Содержание отдельных белковых метаболитов, активность АлАТ, АсАТ, γ -ГТП и катепсина D в тканях анадарты в условиях нормо- и аноксии

Показатель	Вид ткани					
	Нога		Жабры		Гепатопанкреас	
	Нормоксия	Аноксия	Нормоксия	Аноксия	Нормоксия	Аноксия
Белок, мкг/мг ткани	38,7 ± 1,2	28,4 ± 2,4	46,9 ± 4,0	35,9 ± 3,0	143,5 ± 12,5	116,4 ± 3,9
Аминокислоты, нг/мг ткани	68,5 ± 3,1	92,7 ± 5,0	192,6 ± 13,3	282,3 ± 11,5	285,1 ± 19,5	423,8 ± 37,9
Мочевина, нмоль/мг ткани	2,68 ± 0,24	3,85 ± 0,31	11,8 ± 4,2	25,0 ± 2,5	28,4 ± 2,3	15,7 ± 3,5
АлАТ, мкмоль/(мин · мг белка)	0,290 ± 0,013	0,384 ± 0,031	0,185 ± 0,029	0,293 ± 0,016	0,196 ± 0,008	0,139 ± 0,003
АсАТ, мкмоль/(мин · мг белка)	0,102 ± 0,008	0,097 ± 0,009	0,100 ± 0,007	0,077 ± 0,010	0,141 ± 0,010	0,128 ± 0,009
γ -ГТП, нмоль/(мин · мг белка)	3,78 ± 0,82	5,11 ± 0,86	2,06 ± 0,26	6,07 ± 1,06	8,48 ± 0,50	2,83 ± 0,10
Катепсин D, нмоль/(мин · мг белка)	3,36 ± 0,31	4,57 ± 0,87	6,64 ± 0,55	4,34 ± 0,48	2,68 ± 0,29	1,15 ± 0,25

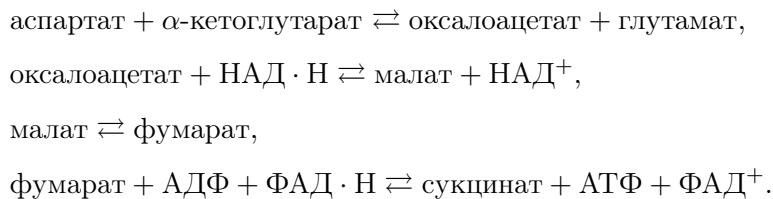
Примечание. Объемы выборочных совокупностей — 10 особей.

Одним из таких путей является сукцинаттиокиназная реакция [9]. Она 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:



Рост активности АлАТ в ноге и жабрах анадары, отмеченный в данных экспериментах, при отсутствии накопления лактата и снижении активности ЛДГ позволяет говорить о том, 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 [10].

Другим метаболическим путем, 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 [11, 12]. Малат, поступая в митохондрии, 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 [13, 14]:



В данных экспериментах нами зарегистрирован существенный рост активности АсАТ, подавление активности ЛДГ при сохранении высокоэффективной МДГ в ноге и жабрах моллюсков. Это позволяет рассматривать фумаратредуктазную реакцию, как возможный метаболический процесс, реализуемый в условиях внешней аноксии.

Как уже отмечалось, в условиях экспериментальной аноксии во всех тканях моллюска происходило снижение содержания белка и наблюдалось увеличение уровня свободных аминокислот и мочевины, что отражает усиление процессов белкового катаболизма. Известно, что гидролиз внутриклеточных белков происходит при участии лизосомальных протеиназ — катепсинов [15]. Активность катепсина D в условиях настоящего эксперимента либо не изменялась (нога), либо существенно снижалась (жабры, гепатопанкреас). Это происходило на фоне роста активности γ -ГТП. Отсюда следует, что в тканях анадары при внешней аноксии гидролизу подвергаются не цельные белки, а олигопептиды, с которыми взаимодействует γ -ГТП, освобождая глутамат, используемый в сукцинаттиокиназной реакции.

В сравнении с ногой и жабрами моллюска реакция гепатопанкреаса на условия внешней аноксии имела ряд принципиальных отличий. В данном органе также уменьшалось содержание белка и повышался уровень свободных аминокислот. Однако это происходило на фоне снижения содержания мочевины, а также падения активности АлАТ и АсАТ. Это означает, что сукцинаттиокиназная и фумаратредуктазная реакции в данном органе не были реализованы. При этом значительно возрастала активность γ -ГТП. Подобное соотношение процессов позволяет говорить о том, что гепатопанкреас продуцирует определенную смесь аминокислот, подвергая гидролизу не цельные белки, а олигопептиды. Данная смесь с током гемолимфы распространяется по организму и утилизируется периферическими тканями моллюска.

Таким образом, в условиях экспериментальной аноксии 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. Аноксия сопровождалась усилением сукцинаттиокиназной и фумаратредуктазной реакций, контролируемых АлАТ и АсАТ. Они исключали накопление токсичного лактата в тканях и позволяли получать дополнительный ресурс макроэргов. Метаболические процессы в гепатопанкреасе моллюска в отсутствие кислорода были ориентированы на продукцию аминокислот, а не на их утилизацию.

1. De Zwaan A., Cortesi P., van den Thillart G. et al. Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia-tolerant marine molluscs: a biochemical analysis // *Mar. Biol.* – 1991. – **111**. – P. 343–341.
2. Горомосова С. А., Шапиро А. З. Основные черты биохимии энергетического обмена мидий. – Москва: Лег. и пищ. пром-сть, 1984. – 120 с.
3. Carpenne E., Zurburg W., Cortesi P. et al. Biochemical effects of anaerobiosis in *Venus gallina* L. and *Scapharca inaequivalvis* (Bruguiere) // *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* – 1985. – **61**, No 5. – P. 707–714.
4. De Zwaan A., Babarro J. M. F., Monari M., Cattani O. Anoxic survival potential of bivalves: (arte)facts // *Comp. Biochem. and Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* – 2002. – **131**, No 3. – P. 615–624.
5. Brenko M., Legac M. A review of bivalve species in the eastern Adriatic Sea. 2. *Pteromorphia* (Arcidae and Noetidae) // *Nat. Croat.* – 1996. – **5**, No 3. – P. 221–247.
6. Солдатов А. А., Андреевко Т. И., Головина И. В. Особенности организации тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца *Anadara inaequivalvis* Bruguiere // *Доп. НАН України.* – 2008. – № 4. – С. 161–165.
7. Мильман Л. С., Юровецкий Ю. Г., Ермолаева Л. П. Определение активности важнейших ферментов углеводного обмена // *Методы биологии развития.* – Москва: Наука, 1974. – С. 346–364.
8. Камышиников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – Москва: МЕДпресс-информ, 2004. – 501 с.
9. Mommsen Th. P., French C. J., Hochachka P. W. Sites and patterns of protein and amino acid utilization during spawning migration of salmon // *Can. J. Zool.* – 1980. – **58**. – P. 1785–1799.
10. Кучеренко Н. Е., Виноградова Р. П., Литвиненко А. Р. и др. Биохимический справочник. – Киев: Вища шк., 1979. – 304 с.
11. Owen T. G., Hochachka P. W. Purification and properties of dolphin muscle aspartate and alanine transaminases and their possible roles in the energy metabolism of diving mammals // *Biochem. J.* – 1974. – **143**. – P. 541–553.
12. Skorkowski E. F. Mitochondrial malic enzyme from crustacean and fish muscle // *Comp. Biochem. and Physiol. B.* – 1988. – **90**. – P. 19–24.
13. Martinez M. L., Landry C., Boehm R. et al. Effects of long-term hypoxia on enzymes of carbohydrate metabolism in the Gulf killifish, *Fundulus grandis* // *J. Exp. Biol.* – 2006. – **209**, pt. 19. – P. 3851–3861.

14. Panepucci L., Fernandes M. N., Sanches J. R., Rantin F. T. Changes in lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities during hypoxia and after temperature acclimation in the armored fish, *Rhinelepis strigosa* (Siluriformes, Loricariidae) // Rev. brasil. biol. – 2000. – **60**, No 2. – P. 353–360.
15. Немова Н. Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. – Петрозаводск, 1996. – 104 с.

Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь

Поступило в редакцию 25.12.2008

T. I. Andreenko, A. A. Soldatov, I. V. Golovina

Adaptive reorganization of metabolism in bivalve mollusk (*Anadara inaequalis* Bruguiere) under experimental anoxia

Under experimental anoxia conditions, the processes of protein catabolism intensified in gills and foot of the Black Sea bivalve mollusk Anadara inaequalis Bruguiere which resulted in a reduction of the protein content and a rise of free amino acids and urea levels in these tissues. Mainly low-molecular peptides underwent hydrolysis. Decrease in the katepsin D activity and increase in the activity of γ -glutamyl transferase confirmed it. The anoxia was accompanied by the amplification of succinate thiokinase and fumarate reductase reactions controlled by aspartate and alanine transaminases. These enzymes prevent the accumulation of toxic lactate in tissues and allow one to receive an additional ATP and GTP resource. The activity of lactate dehydrogenase reduced, whilst the malate dehydrogenase activity kept high. Metabolic processes in mollusk digestive gland at anoxia involved the production of amino acids, instead of their utilization.