

УДК 594.1:577.121:612.391

Т.И. Андреев, канд. биол. наук, доцент

Севастопольский национальный технический университет

ул. Университетская 33, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: tatyana-andreenk@mail.ru

АДАПТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВОГО МЕТАБОЛИЗМА В ТКАНЯХ МОЛЛЮСКА-ВСЕЛЕНЦА *ANADARA INAEQUIVALVIS* (BRUGUIERE, 1789) В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГОЛОДАНИЯ

*Исследовано в экспериментальных условиях влияние голодания на направленность белкового метаболизма в тканях двустворчатого моллюска-вселенца *Anadara inaequalvis* (Bruguiere, 1789). Показано, что процесс адаптации анадары к голоданию идет по пути использования резерва аминокислот в процессах биосинтеза белка. Донором аминокислот выступает гепатопанкреас.*

Ключевые слова: вид-вселенец, *Anadara inaequalvis*, голодание, тканевой метаболизм, гепатопанкреас, белки, аминокислоты.

Актуальной экологической проблемой является вселение чужеродных организмов в водные экосистемы. Черное море не стало исключением. Основными причинами успешного освоения вселенцами Черного моря можно назвать следующие: изолированность от Мирового океана; большая акватория, значительное количество рек, впадающих в него; достаточно низкая соленость, определяющая пониженное биоразнообразие и как следствие более высокую уязвимость к вторжению чужеродных видов; интенсификация судоходства и нерегулируемый сброс балластных вод судами.

Влияние вселенцев на биологическое разнообразие, структуру и функционирование водных экосистем не всегда отрицательно, но однозначно необратимо. При этом последствия могут проявиться непосредственно или через длительный период времени.

Знание особенностей биологии и экологии чужеродных организмов, степень их адаптивных возможностей к новым условиям обитания позволит с одной стороны прогнозировать дальнейшее развитие популяции этого вида, а с другой – разработать меры по предотвращению нежелательного влияния нового вселенца на экосистему.

Anadara inaequalvis – сравнительно молодой для черноморского региона вид-вселенец, который широко представлен в Индийском и Тихом океанах. В Средиземное море моллюск попал из Адриатики в 1969 году, где быстро распространился. В 1980 г. моллюск был обнаружен в Черном море, а в 1981 г. он распространился по всему шельфу западной его части [1]. В 1999 впервые наличие анадары зарегистрировано на южном берегу Крыма (Карадаг, район Алушты) [2]. В настоящее время отмечается массовое оседание личинок данного моллюска на коллекторные установки мидийных ферм, заход в устья рек.

Anadara inaequalvis является эвритермным и эвригалинным видом, легко переносит гипоксические и аноксические условия. Гемолимфа моллюска содержит эритроцитарный гемоглобин и соответственно имеет высокую кислородную емкость, что отличает ее от других видов черноморских двустворок [3]. В условиях нормоксии интенсивность потребления кислорода у *Anadara inaequalvis* в 6-7 раз меньше, чем у другого массового черноморского вида *Mytilus galloprovincialis* Lam. [4].

Постепенно *Anadara inaequalvis* становится массовой ценообразующей формой и рассматривается как перспективный объект марикультуры для Черного моря. Знание особенностей метаболизма анадары в различных условиях позволит определить функциональные основы инвазии и экологической пластичности данного вида моллюска, а также будет способствовать разработке биотехники для его массового выращивания в регионе.

Информация о влиянии голодания на обменные процессы в тканях двустворчатых моллюсков крайне ограничена. Установлено снижение уровня глюкозы и гликогена в гемолимфе [5], уменьшение частоты сердечных сокращений [6]. Особый интерес представляют моллюски-фильтраторы, у которых голодание не может быть полным, а только частичным, то есть, недостаточным по калорийности и качественному составу получаемой пищи. Возможна ли адаптивная реорганизация метаболизма у данной группы организмов в условиях полного голодания не известно.

Цель работы – исследовать адаптивные процессы реорганизации белкового обмена в тканях моллюсков *Anadara inaequalvis* в условиях экспериментального голодания.

Задача исследования – изучить особенности течения белкового метаболизма в тканях *Anadara inaequalvis* в условиях экспериментального голодания.

Объект исследования – особи двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis* (далее анадара).

Предмет исследования – адаптационные процессы, обеспечивающие функционирование организма в условиях голодания.

Моллюски с длиной раковины 30-33 мм собраны с коллекторных установок рыбодобывающего предприятия “Дон-Комп” (бухта Стрелецкая, Севастополь). Транспортировка животных осуществлена в контейнере насыпью без воды в течение 1 часа от момента сбора. Перед проведением исследований моллюсков выдерживали в аквариумах с проточной морской водой в течение 2-3 суток для снятия состояния стресса.

Морская вода для эксперимента доставлена из 10-ти мильной зоны и подверглась термической обработке при 80-85°C в течение 4-х часов. После этого ее пропускали через мембранный фильтр (Synproг – 2,5) под вакуумом. Экспериментальная часть работы выполнена на специально разработанном стенде. Он позволял поддерживать заданную температуру и концентрацию кислорода в воде. В камеру объемом 13.5 л наливали заранее подготовленную воду и помещали 30 особей анадары. Контроль за концентрацией кислорода в воде осуществляли потенциометрически. В течение опыта она не снижалась ниже 7 мг л⁻¹. В работе применяли оксиметр ELWRO N 5123 (Польша). Температуру воды поддерживали на уровне 20±1 °C. Фотопериод – 12 часов день; 12 часов ночь. Экспозиция – 18 суток. Пробы тканей отбирали на 1-е, 6-е и 18-е сутки эксперимента. Ежедневно производили полную смену воды в емкости для удаления метаболитов.

Препарирование тканей проводили при температуре 0-4°C. Полученные образцы гепатопанкреаса, жабр и ноги упаковывали в пищевую фольгу и хранили в жидком азоте. В последующем навески тканей гомогенизировали с использованием в качестве трансформирующей среды 1.15% KCl. Для получения супернатанта гомогенаты подвергали центрифугированию при 6000 об мин⁻¹ в течение 15 минут. В работе использовали рефрижераторную центрифугу K-23D (Германия). Все процедуры выполняли при 0-4°C.

В тканях моллюсков оценивали активности аланин- и аспартатаминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) динитрофенилгидрозиновым методом [7], активность γ -глутамилтранспептидазы (γ -ГТП) – по реакции с L- γ -глутамил-п-нитроанилидом, а катепсина D – по кислоторастворимым продуктам ферментативного гидролиза гемоглобина [7]. Все измерения выполняли при 25,0±0,5°C. Одновременно определяли содержание в тканях белка по методу Лоури, аминного азота по реакции с нингидрином и мочевины по реакции с диацетилмонооксимом [7]. В работе применяли стандартные методики и использовали стандартные наборы реактивов: «Simco, Ltd» (при определении активностей АлАТ и АсАТ), ООО НПП «Филисит диагностика» (при определении активности γ -ГТП) и «Lachema» (при определении содержания мочевины).

Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов проведены с применением стандартного пакета Grapher (версия 1.25). Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm \bar{S}_x$. Достоверность различий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. О нормальности распределения судили по сопоставлению абсолютных величин средней арифметической и моды.

Результаты. Изменение активностей ферментов, содержания питательных субстратов и метаболитов у анадары в условиях экспериментального голодания имело выраженную тканевую специфику.

Гепатопанкреас (ГП). Содержание белка и аминокислот в данном органе было максимально. Уровень этих соединений в 2-6 раз превышал значения, отмеченные для ноги и жабр моллюска ($p < 0,001$). В условиях эксперимента содержание белка в гепатопанкреасе, несмотря на голодание, претерпевало явное увеличение (таблица 1). Общий прирост его в течение эксперимента составил почти 40,0 % ($p < 0,01$). Это происходило на фоне уменьшения уровня свободных аминокислот и мочевины в органе соответственно на 41,0 ($p < 0,01$) и 27,7 % ($p < 0,05$).

Таблица 1 – Содержание белка и ряда белковых метаболитов в тканях анадары в условиях экспериментального голодания

Органы моллюска	Число особей, шт	Показатели		
		Белок, мкг мг ⁻¹	Аминокислоты, мкг мг ⁻¹	Мочевина, нмоль мг ⁻¹
Гепатопанкреас				
Контроль	20	102,5±2,00	0,598±0,024	35,6±3,40
Голодание 6 суток	10	143,5±12,5	0,285±0,020	28,4±2,30
Голодание 18 суток	8	142,7±9,80	0,353±0,065	26,1±4,00
Жабры				
Контроль	20	59,5±2,00	0,378±0,014	7,81±1,12
Голодание 6 суток	10	46,9±4,00	0,193±0,013	11,8±4,15
Голодание 18 суток	8	47,2±2,80	0,199±0,026	10,3±2,89
Нога				
Контроль	20	31,9±1,00	0,102±0,003	2,65±0,43
Голодание 6 суток	10	38,7±1,20	0,068±0,003	2,68±0,24
Голодание 18 суток	8	42,3±0,40	0,089±0,007	2,66±0,47

Изменение активностей АлАТ (рисунок 1) и АсАт было слабо выражено (рисунок 2). Небольшой рост был выявлен только относительно АсАт – 17,7 % ($p < 0,05$) на 18-е сутки эксперимента. При этом происходило явное подавление активности γ -ГТП на 33,1 % ($p < 0,05$) (рисунок 3). Параллельно существенно возрастала активность лизосомальных ферментов. На 18-сутки эксперимента активность катепсина D была в 3,5 раза выше ($p < 0,01$), чем в начале опыта.

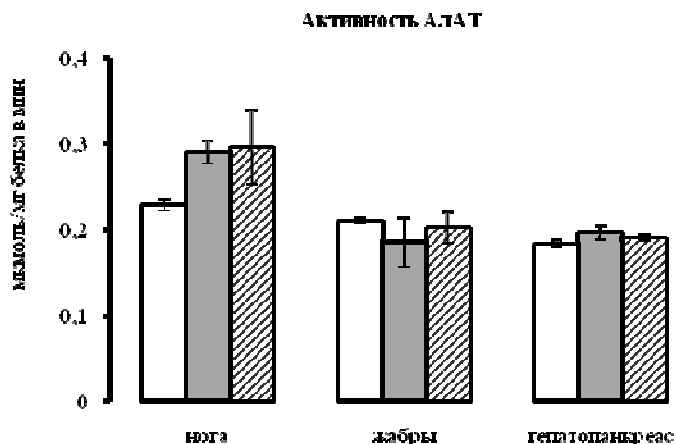


Рисунок 1 – Активности АлАТ в тканях анадары в условиях экспериментального голодания:
 – контроль, – голод 6 дней, – голод 18 дней

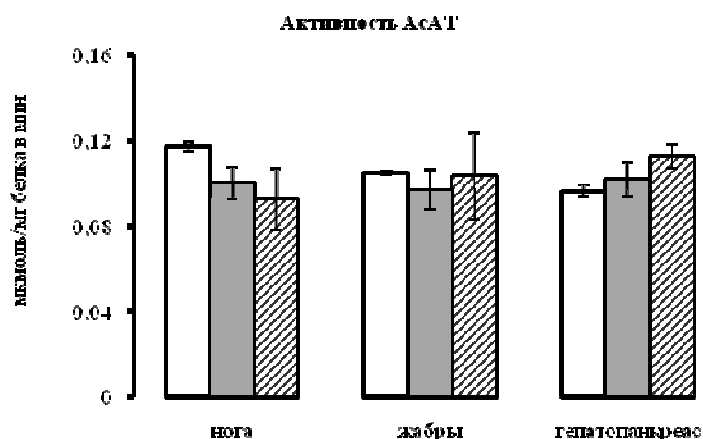


Рисунок 2 – Активности аминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) в тканях анадары в условиях экспериментального голодания:
 – контроль, – голод 6 дней, – голод 18 дней

Ж а б р ы . Изменение содержания белка и его метаболитов в жабрах анадары в ходе экспериментального голодания имела иную динамику в сравнении с гепатопанкреасом. На 6-сутки эксперимента уровень белка понижался на 21,2 % ($p < 0,01$) и затем не претерпевал статистически значимых изменений (таблица 1). Одновременно в органе уменьшалось содержание аминного азота на 48,9 % ($p < 0,001$). Это происходило на фоне тенденции роста уровня мочевины. Активности АлАТ, АсАТ (рисунки 1, 2), γ -ГТП и катепсина D (рисунок 3) в течение опыта не изменялись.

Н о г а . Уровень белка в ходе экспериментального голодания в ноге анадары повышался на 32,6 % ($p < 0,001$), что совпадало с данными, полученными для гепатопанкреаса (таблица 1).

Содержание же аминного азота при этом понижалось на 33,4 % ($p < 0,001$), а мочевины не изменялось, оставаясь на уровне исходных величин. Изменение активностей аминотрансфераз (АлАТ и АсАТ) в течение опыта не совпадало (рисунки 1, 2). Активность АлАТ повышалась на 27,3 % ($p < 0,001$), а АсАТ, напротив, понижалась на 14,5 % ($p < 0,05$) в сравнении с контрольными величинами. Эти изменения выявлялись уже на 6-сутки эксперимента и наблюдались на фоне подавления активности γ -ГТП. В сравнении с исходным состоянием моллюска на 6-е сутки голодания активность γ -ГТП была на 27,6 % ($p < 0,05$) ниже (рисунок 3). К концу эксперимента она оказалась близкой к исходному состоянию. В отличие от гепатопанкреаса активность катепсина D в ноге анадары не изменялась на протяжении опыта (рисунок 3).

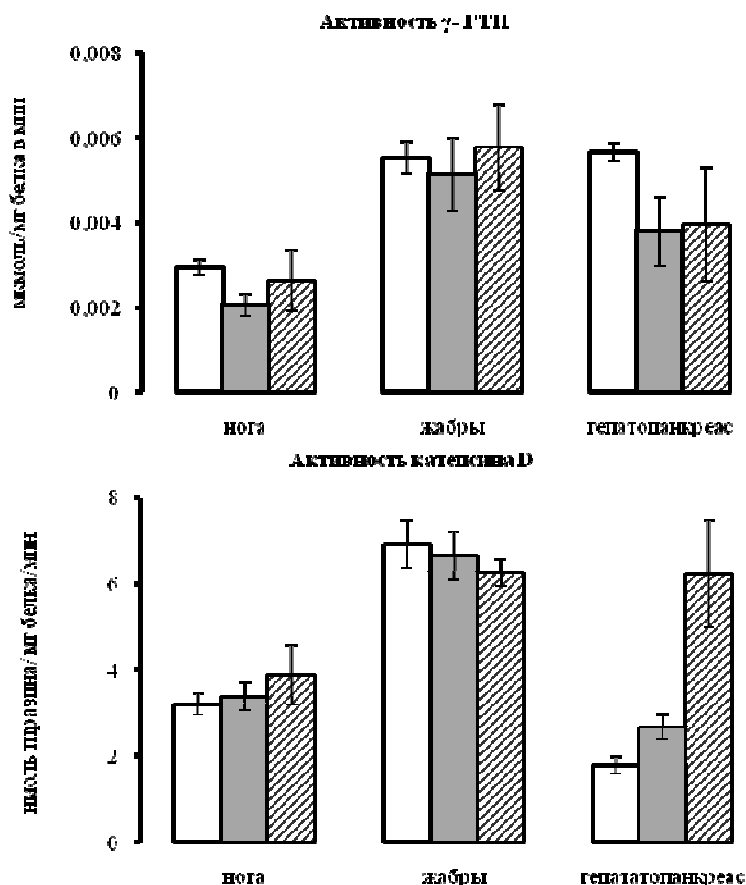


Рисунок 3 – Активности катепсина γ -глутамилтранспептидазы (γ -ГТП) и D в тканях анадары в условиях экспериментального голодания: $\square$ – контроль, $\blacksquare$ – голод 6 дней, $\hatched$ – голод 18 дней

Таким образом, экспериментальное голодание вызывало неоднозначное изменение направленности белкового метаболизма в тканевых структурах анадары:

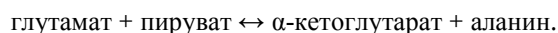
- содержание белка в гепатопанкреасе и ноге моллюска повышалось, тогда как в жабрах, напротив, наблюдалось уменьшение значений данного показателя;
- уровень аминокислот понижался во всех изученных тканях;
- содержание мочевины в тканях либо понижалось относительно исходного уровня, либо не претерпевало статистически значимых изменений;
- изменения активностей ферментов также было неоднозначно: активность гаммаглутамилтранспептидазы во всех тканях понижалась; в гепатопанкреасе наблюдался рост активности АсАТ при существенном повышении активности катепсина D; в ноге происходило увеличение активности АлАТ; в жабрах изменения активностей ферментов выявлено не было.

Обсуждение. Рост содержания белка в тканях ноги и гепатопанкреаса моллюсков в условиях экспериментального голодания был достаточно неожиданным. Опубликованные материалы не дают однозначного ответа по данному вопросу. В ряде работ также отмечается увеличение белковых ресурсов в тканях гидробионтов, но только на начальных этапах голодания [8]. Это совпадает с настоящими результатами. У анадары повышение уровня белка в тканях происходило в течение первых 6-ти суток эксперимента. В дальнейшем изменения не были выражены. Большинство же работ, исследующих влияние депривации пищи на белковый метаболизм, подчеркивают преобладание белкового катаболизма у гидробионтов в условиях голода [9].

Известно, что стресс-синдром является первой стадией адаптации организма к экстремальным воздействиям, в том числе к отсутствию пищи [10]. В ответ на действие стрессорных факторов концентрация в плазме некоторых белков, которые еще называют белками острой фазы, увеличивается и, следовательно, их синтез является составной частью метаболического ответа на стресс [10]. Так, некоторые авторы отмечают увеличение количества эритроцитов и содержания гемоглобина в начальный период голодания гидробионтов [11]. По-видимому, депривация пищи и приводила к развитию подобных процессов в тканях моллюсков, но они реализовались не на всех уровнях. Как уже отмечалось, в жабрах анадары содержание белка несколько понижалось.

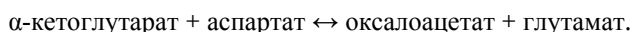
Процесс адаптации моллюска к голоданию, по-видимому, шел и по пути активного использования аминокислот, как потенциального источника энергии. Содержание аминного азота во всех исследованных органах понижалось. При этом уровень мочевины в тканях не изменялся, а в некоторых случаях уменьшался (гепатопанкреас). Это означает, что снижение тканевого пула аминокислот не было связано с процессами дезаминирования. Донором аминокислот, вероятно, выступает гепатопанкреас, так как только в этом органе отмечался существенный рост активности катепсина D. Известно, что аминокислоты могут быть использованы в углеводном обмене, а также при синтезе протеинов острой фазы. Такой механизм рассматривается в работах ряда авторов [12].

В нашем случае происходил рост активностей АлАТ в ноге и АсАТ в гепатопанкреасе, который наблюдался в первые 6 суток голодания. Известно, что АлАТ катализирует сукцинаттиокиназную реакцию:



При этом, по-видимому, реакция протекает в обратном направлении. Необходимо учесть, что, реакции катализируемые трансаминазами, легко обратимы, так как их константы равновесия близки к единице. Об этом свидетельствует также понижение активности γ -ГТП, которая обеспечивает отщепление глутаминовой кислоты от пептидов и тем самым способствует превращению глутамата в α -кетоглутарат. Это означает, что в условиях экспериментального голодания АлАТ, используя ресурс аланина, может поддерживать процессы окислительного декарбоксилирования и, как следствие, аэробного ресинтеза АТФ в ткани.

Рост активности АсАТ также может быть направлен на продукцию субстратов, усваиваемых в гликолитических процессах. Данный фермент катализирует фумаратредуктазную реакцию, направленную на продукцию оксалоацетата:



Последний при участии фосфоенолпируваткарбоксикиназы вероятно превращается в фосфоенолпируват и задействуется в гликолитических процессах, то есть в направлении реакций окислительного декарбоксилирования;

Выводы. 1. Процесс адаптации анадары к голоданию идет по пути использования резерва аминокислот в процессах биосинтеза белка. Это отражает уменьшение уровня аминного азота во всех исследованных тканях и рост содержания белка при отсутствии выраженных изменений концентрации мочевины в органах моллюска. 2. Использование аминокислот, как источника энергии тканями анадары в условиях голодания происходит по пути фумаратредуктазной и сукцинаттиокиназной реакций, которые позволяют дополнительно получать гликолитические метаболиты. Об этом свидетельствует рост активности АлАТ и АсАТ в ряде тканей. 3. Донором аминокислот выступает гепатопанкреас. В отличие от других тканей депривация пищи вызывает в нем значительный рост активности катепсина D.

В дальнейшем планируется проведение более длительных экспериментальных исследований по изучению метаболизма анадары в условиях полного голодания.

Библиографический список использованной литературы

1. Золотарев В.Н. Двустворчатый моллюск – новый элемент фауны Черного моря / В.Н. Золотарев, П.Н. Золотарев // ДАН СССР. — 1987. — Т. 297. — С. 501–502.
2. Ревков Н.К. Разнообразие зообентоса рыхлых грунтов в прибрежной зоне крымского побережья Черного моря / Н.К. Ревков, Н.А. Болтачева, Т.В. Николаенко, Е.А. Колесникова // Океанология. — 2002. — Т. 42. — № 4. — С. 561–571.
3. Anoxic survival potential of bivalves: (arte)facts / A. De Zwaan, J.M.F. Babarro, M. Monari, O. Cattani // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. — 2002. — 131. — N 3. — P. 615–624.
4. Солдатов А.А. Тканевая специфика метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца *Anadara inaequalis* Br. / А.А. Солдатов, А.Я. Столбов, И.В. Головина, Т.И. Андреев, В.И. Холодов // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-та. Серія: біологія. — 2005. — Т. 4. — № 27. — С. 230–232.
5. Carefoot T.H. Effect of starvation on blood-glucose and tissue-glycogen levels in the northern abalone *Haliotis kamtschatkana* / T.H. Carefoot, P.-Y. Qian, B.E. Taylor, T.G. West, J. Osborne // J. Shellfish Res. — 1992. — 11. — № 2. — P. 551.
6. Santini G. Metabolic responses to food deprivation in two limpets with different foraging regimes, revealed by recording of cardiac activity / G. Santini, T. Bianchi, G. Chelazzi // J. Zool. — 2002. — 256, № 1. — P. 11–15.
7. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников. — М.: МЕДпресс-информ, 2004. — 501 с.

8. Qian Y. Effects of starvation on the hematological and blood biochemical indices in cultured *Lateolabrax japonicus* / Y. Qian, H. Chen, J. Sun // J. Fish. Sci. China. — 2002. — Vol. 9. — № 2. — P. 133–137.
9. Guderley H. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. / H. Guderley, D. Lapointe, M. Bedard, J.D. Dutil // Comp. Biochem. Physiol. — 2003. — Vol. 135A. — № 2. — P. 347–356.
10. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика / Ф.З. Меерсон. — М.: Наука, 1981. — 278 с.
11. Borah S. Biochemical and haematological responses to starvation in an air breathing fresh water teleost *Heteropneustes fossilis* (Bloch) / S. Borah, R.N.S. Yadav // Indian J. Fish. — 1996. — Vol. 43. — № 3. — P. 307–311.
12. Okuma E. Distribution of free D-amino acids in bivalve mollusks and the effects of physiological conditions on the levels of D- and L-alanine in the tissues of the hard clam, *Meretrix lusoria* / E. Okuma, K. Watanabe, H. Abe // Fish. Sci. — 1998. — Vol. 64 — № 4. — P. 606–611.

Поступила в редакцію 05.04.2012 г.

Андрсенко Т.І. Адаптивні зміни білкового метаболізму в тканинах молюска-вселенця ANADARA INAEQUIVALVIS (BRUGUIERE, 1789) в умовах експериментального голодування

Досліджено в експериментальних умовах вплив голодування на спрямованість білкового метаболізму у тканинах двостулкового молюска-вселенця *Anadara inaequivalvis*. Показано, що процес адаптації анадари до голодування відбувається шляхом використання резерву амінокислот у процесах біосинтезу білка. Донором амінокислот виступає гепатопанкреас.

Ключові слова: молюск-вселенець, *Anadara inaequivalvis*, голодування, тканинний метаболізм, гепатопанкреас, білки, амінокислоти.

Andreenko T.I. Adaptive changes of protein metabolism in tissue of the mollusk-invader ANADARA INAEQUIVALVIS (BRUGUIERE, 1789) under conditions of experimental starvation

The effect of starvation on the orientation of protein metabolism in mollusk-invader *Anadara inaequivalvis* (Bruguiere, 1789) was investigated under experimental conditions. The process of *Anadara inaequivalvis* adaptation to starvation involves using the amino acids reserves during tissue biosynthesis. Hepatopancreas is found to be a donor of amino acids.

Keywords: mollusk-invader, *Anadara inaequivalvis*, starvation, tissue metabolism, hepatopancreas, protein, amino acids.