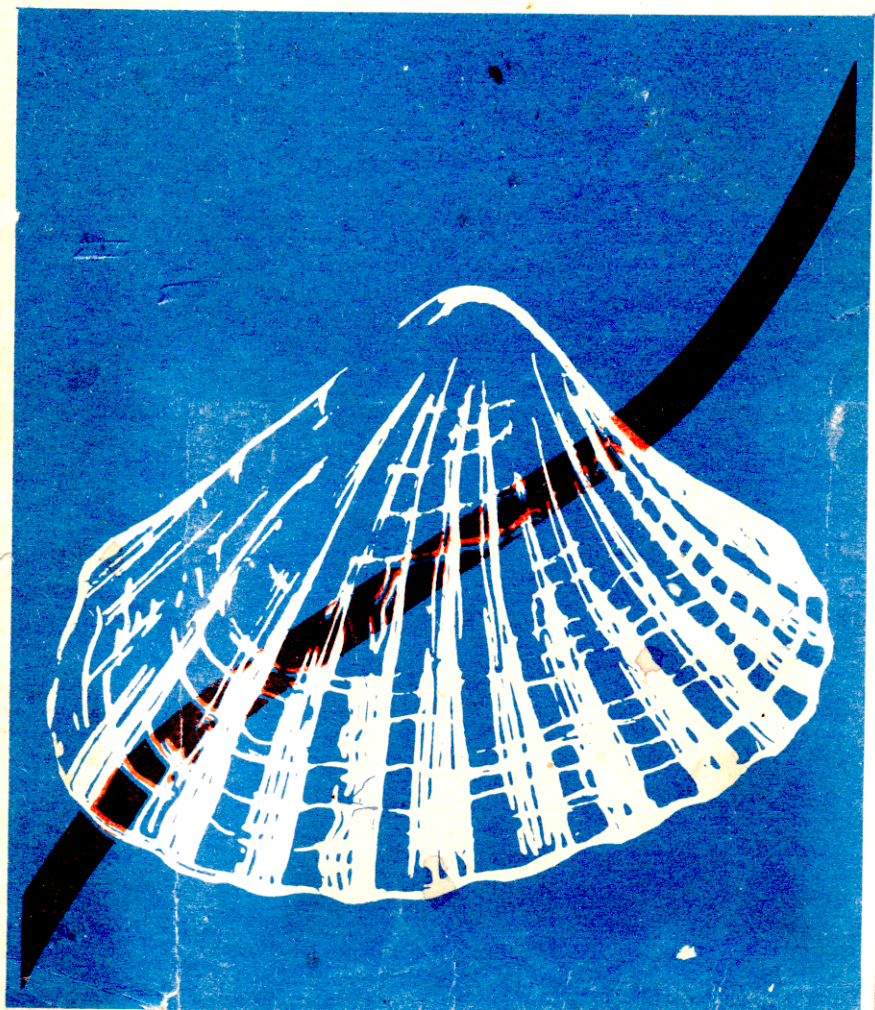


594.124
Г 70

С.А.Горомосова, А.З.Шапиро

ОСНОВНЫЕ ЧЕРТЫ БИОХИМИИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА МИДИЙ



ПРОВ 98

С.А.Горомосова, А.З.Шапиро

ПРОВ 2010

ОСНОВНЫЕ ЧЕРТЫ БИОХИМИИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА МИДИЙ

Институт биологии
южных морей АН УССР

БИБЛИОТЕКА

№ 31997

Москва

«Легкая и пищевая промышленность»

1984

ББК 47

Г 70

УДК 594.124 – 1.05

Горомосова С.А., Шапиро А.З. Основные черты биохимии энергетического обмена мидий. — М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1984. — 120 с.

Дана физиолого-биохимическая характеристика мидий на протяжении годового жизненного цикла в различных районах Черного моря и установлены оптимальные сроки их добычи. Выявлены особенности углеводного обмена мидий в нормальных и экстремальных условиях. Рассмотрены механизмы биохимических адаптаций энергетического обмена. Приведены показатели, которые могут использоваться в качестве критериев состояния мидий при их разведении, для оценки окружающей среды и в области морской токсикологии.

Предназначена для ихтиологов, гидробиологов, биохимиков, физиологов, токсикологов.

Табл. 37. Ил. 51. Библиография — 181 название.

Рецензент: канд. биол. наук Е.А. Яблонская.

ВВЕДЕНИЕ

Для решения ряда экологических проблем в последнее время широко применяются физиологические и биохимические методы исследования. С их помощью можно оценить уровень продукционных процессов, происходящих в водоемах, изучить структурные взаимосвязи в экосистемах, вскрыть внутренние ритмы жизнедеятельности организмов и популяций, выявить механизмы видовых адаптаций. Эти исследования позволяют изучить особенности метаболических процессов у гидробионтов на протяжении их годового жизненного цикла, выявить индикаторы состояния организмов и популяций при различных условиях обитания. Физиолого-биохимические исследования дают возможность решать проблему приспособления гидробионтов к различным условиям среды, в основе которых лежат биохимические и физиологические механизмы. В частности, речь идет о механизмах ферментативного катализа, позволяющих организмам, стоящим на различных ступенях эволюции, успешно справляться с неблагоприятными факторами внешней среды. Та отрасль биохимии, которая занимается всеми этими вопросами, возникла сравнительно недавно, и ее основной задачей является изучение биохимических механизмов адаптаций.

Особое место в изучении адаптаций занимают исследования биохимической организации энергетического обмена животных в экстремальных условиях среды (гипоксия, загрязнение, действие токсических веществ). Одними из наиболее распространенных объектов этих исследований являются факультативные анаэробы, т.е. такие виды, которые способны существовать как в нормальных, так и в аноксических условиях. Типичными представителями таких гидробионтов являются двусторчатые моллюски, обитающие в литорали, в частности мидии. Мидия — эврибионтный вид, широко распространенный в бентосных сообществах и обрастаниях, который в силу своей биологии (прикрепленный образ жизни, обитание в сублиторальной зоне) приобрел целый ряд адаптаций, позволяющих ему существовать при низком содержании кислорода, значительных колебаниях солености и температуры. Будучи фильтраторами, мидии накапливают в высоких концентрациях тяжелые металлы, гидрокарбонаты, радионуклеотиды, нефть (Bryan, 1971). На основании длительных наблюдений за популяциями мидий их отдельные биохимические характеристики предложены в качестве репрезентативного "индекса нормального метаболизма", по которому оценивается уровень загрязненности естественных биот (Bayne et al., 1976; Sansone et al., 1977).

Перечисленные свойства мидий наряду с их большой практической значимостью как ценного объекта промысла и марикультуры послужили причиной детального изучения различных сторон их жизнедеятельности. Существует много работ по изучению химического состава черноморских мидий, сезонной динамики и популяционных различий в составе основных органических и минеральных компонентов их тела, микроэлементов, аминокислот, стерина и витаминов.

Начало исследований биохимической организации энергетического обмена у двустворчатых моллюсков относится к 60-м годам. В этот период на *Rangia cuneata* было показано, что в анаэробных условиях в качестве конечных продуктов обмена накапливается не молочная кислота, а сукцинат и аланин (Simpson, Awapara, 1966; Chen, Awapara, 1969). Найденные отличия в ходе реакций гликолиза и накопления конечных продуктов у *R. cuneata* послужили основой для построения авторами схемы реакций энергетического обмена моллюсков при переходе на анаэробный обмен. Эти исследования были продолжены нидерландскими (Zwaan, Wijsman, 1976; Zwaan et al., 1976) и канадскими учеными (Hochachka et al., 1973; Hochachka, Somero, 1976; Хочачка, Сомеро, 1977). Работы этих исследователей относятся в основном к изучению конечных этапов процесса гликолиза и примыкающей к ним дикарбоновой части цикла Кребса, а также роли трансаминазных реакций в анаэробном обмене. Ими исследован уровень активности, кинетические характеристики и особенности регуляции ряда ферментов *Mutilus edulis* и *Crassostrea virginica*, что позволило представить механизмы их функционирования при переходе моллюсков с аэробного на анаэробный обмен.

В целом весь процесс гликолиза у моллюсков изучен значительно слабее (Bennett, Nakada, 1968; Вержбинская, Савина, 1971; Вержбинская, 1972). Полученные данные относятся в основном к определению уровня активности ферментов. Отдельные работы посвящены биохимической организации и выявлению лимитирующих звеньев процесса гликолиза (Вержбинская, 1972; Ebberine, Zwaan, 1970; Hammen, 1975; Cameselle, 1980).

В развитии исследований энергетического обмена мидий нами изучены следующие показатели: определен уровень активности ферментов гликолиза и сопряженного с ним дикарбонового участка цикла Кребса в нормальных условиях и условиях гипоксии, установлены некоторые кинетические характеристики. В этих же условиях изучены ферменты глюконеогенеза и переаминирования. Определена концентрация в тканях мидий субстратов и промежуточных продуктов гликолиза и компонентов адениловой системы.

Основными задачами данной работы являлось: дать физиолого-биохимическую характеристику годового жизненного цикла мидий и определить оптимальные сроки их добычи: изучить биохимическую организацию энергетического обмена мидий при переключении их на анаэробный обмен и механизм адаптации к длительному существованию в

экстремальных условиях. Установление механизмов биохимических адаптаций мидий представляет общебиологический интерес и может быть использован в области водной токсикологии и марикультуры.

Для получения сравнительных характеристик и выявления особенностей ферментной организации обмена по отдельным показателям приведены данные для баянусов, близких к мидиям по своей экологии, и другим видам моллюсков и ракообразных.

Представленные авторами материалы выходят за рамки понятия "энергетический обмен" и касаются ряда сопряженных вопросов, характеризующих особенности метаболизма мидий.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ААТ — аспаратаминотрансфераза
АлАТ — аланинаминотрансфераза
АДФ — аденозиндифосфат
АМФ — аденозинмонофосфат
АТФ — аденозинтрифосфат
ГДФ — гуанозиндифосфат
ГК — гексокиназа
Глицеральдегид-3-ФДГ — глицеральдегид-3- фосфатдегидрогеназа
ГНГ — глюконеогенез
ГС — гликогенсинтетаза
ГТФ — гуанозинтрифосфат
Г-6-Ф — глюкозо-6-фосфат
Г-6-ФДГ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГФИ — глюкофосфоизомеразы
ДАОФ — диоксиацетонфосфат
ИДФ — инозиндифосфат
ИМФ — инозинмонофосфат
ИТФ — инозинтрифосфат
 K_M — константа Михаэлиса
Лактат ДГ — лактатдегидрогеназа
Малат ДГ — малатдегидрогеназа
НАД — никотинамид, дениндинуклеотид
НАДН — никотинамидадениннуклеотид восстановленный
НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ПК — пируваткиназа
Сукцинат ДГ — сукцинатдегидрогеназа
ТБТО — трибутилтриоловооксид
ТФИ — триозофосфатизомеразы
ТХУ — трихлоруксусная кислота
 Φ_n — фосфор неорганический
 $\PhiАД \cdot H_2$ — флавинадениндинуклеотид восстановленный
ФГИ — фосфогексоизомеразы
ФГМ — фосфоглюкомутаза
ФДФ — фруктозодифосфат

ФДФаза — фруктозодифосфатаза

ФР — фосфорилаза

Ф-6-Ф — фруктозо-6-фосфат

ФФК — фосфофруктокиназа

ФЭП — фосфоэнолпируват

ФЭПКК — фосфоэнолпируваткарбоксикиназа

ЦТК — цикл трикарбоновых кислот

ЩУК — щавелевоуксусная кислота

УДФГ — уридиндифосфатглюкоза

3'5'-цАМФ — 3'5'-циклический аденозинмонофосфат

α -глицерофосфат ДГ — α -глицерофосфатдегидрогеназа

α -кетоглутарат ДГ — α -кетоглутаратдегидрогеназа

НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

(Принята международным биохимическим союзом по номенклатуре и классификации ферментов)

γ -амилаза (Н.Ф.3.2.1.3)

α -амилаза (Н.Ф.3.2.1.1)

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФДГ, Н.Ф.1.11.49)

Гексокиназа (ГК Н.Ф.2.7.1.1)

Гликогенсинтетаза (ГС, Н.Ф.9.4.1.11)

α -глицерофосфатдегидрогеназа (Н.Ф.1.2.1.12)

Аспаратаминотрансфераза (ААТ, Н.Ф.2.6.1.1)

Аланинаминотрансфераза (АлАТ, Н.Ф.2.6.1.2)

Глюкофосфоизомераза (ГФИ, Н.Ф.5.3.1.9)

Пируваткиназа (ПК, Н.Ф.2.7.1.40)

Лактатдегидрогеназа (ЛактатДГ, Н.Ф.1.1.1.27)

Малатдегидрогеназа (МалатДГ Н.Ф.1.1.1.39)

Фосфорилаза (ФР, Н.Ф.2.4.1.1)

Фосфофруктокиназа (ФФК, 2.7.1.11)

Фосфоглюкомутаза (ФГМ, Н.Ф.2.7.5.1)

Триозофосфатизомераза (Н.Ф.5.3.11)

Фосфоэнолпируваткарбоксикиназа (ФЭПКК, Н.Ф. 4.1.1.32)

ГЛАВА I. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРИОДОВ ГОДОВОГО ЦИКЛА МИДИЙ

В связи с тем что изучение энергетического обмена мидий тесно связано с динамикой химического состава на протяжении отдельных периодов их годового жизненного цикла, представляется целесообразным на основании имеющихся данных о биологии и биохимическом составе черноморских мидий (Воробьев, 1938; Виноградова, 1950; Долгопольская, 1957; Иванов, 1965) дать физиолого-биохимическую характеристику этих периодов.

Для составления характеристики использован принцип, предложенный Г.Е. Шульманом в 1972 г. для описания годового жизненного цикла черноморских рыб, а также работы по влиянию половой цикличности средиземноморских мидий на их энергетические резервы в течение года (Bourcart et Lubet, 1965).

Годовой жизненный цикл черноморских мидий можно разделить на четыре периода: весенний репродуктивный период; летний период полового покоя; осенний репродуктивный период; период зимовки (рис. 1).

Весенний репродуктивный период (апрель — июнь) характеризуется процессами гаметогенеза и выметывания половых продуктов, интенсивным линейным ростом и высоким уровнем метаболизма. Во время весеннего созревания с повышением температуры воды и массовым развитием фитопланктона наблюдается интенсивный синтез белка, связанный с ростом и дифференцировкой генеративной ткани и линейным ростом тела. Оба эти процесса совпадают во времени, о чем свидетельствуют наши данные по увеличению массы и данные А.И. Иванова (1965) по линейному росту мидий.

Основным источником энергии для процессов белкового синтеза в теле мидий являются углеводы. Судя по высокому содержанию олигосахаридов в гепатопанкреасе и гонадах, у мидий в это время происходит интенсивное расщепление полисахаридов (главным образом гликогена) и мобилизация их в качестве энергетического материала на построение гонадотропной ткани. В это же время в теле мидий наблюдается положительный жировой баланс, поскольку жир входит в состав гонадотропной ткани в качестве пластического материала.

Во время весеннего размножения (вторая половина мая—июнь) уровень белка в теле мидий очень высок, так как он входит в состав половых продуктов, заполняющих соединительную ткань мантии и тела мидий. В этот период мидии выметывают большое количество половых продуктов. Несмотря на это, абсолютное содержание белка у годовиков

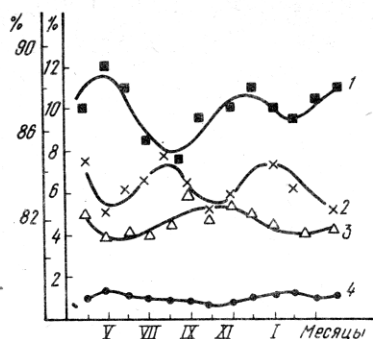


Рис. 1. Динамика содержания белка, влаги, углеводов и липидов в теле мидий на протяжении годового цикла:
1 — белок; 2 — влага; 3 — углеводы; 4 — липиды

и двухгодовиков не снижается, так как параллельно с размножением идет интенсивный синтез белка, связанный с линейным ростом моллюсков. Лишь у старших возрастных групп масштабы потерь белка с половыми продуктами превышают масштабы белкового синтеза. Линейный прирост у старших возрастных групп незначителен.

Во время размножения в гонадах и гепатопанкреасе мидий происходит интенсивное потребление углеводов. Вместе с тем углеводный баланс в их теле остается положительным прежде всего за счет синтеза полисахаридов.

Летний период полового покоя (июль—август) характеризуется значительным снижением интенсивности белкового синтеза. Это связано с отсутствием у мидий в летние месяцы процессов гаметогенеза и резким замедлением линейного роста.

Основной биохимической характеристикой этого периода является интенсивное накопление энергетических запасов в форме углеводов, содержание которых достигает максимальных для всего годового цикла величин. Главной формой аккумуляции энергии в теле мидий является гликоген. Наиболее интенсивные процессы синтеза гликогена протекают в гепатопанкреасе и соединительной ткани мантии, где локализуется от 50 до 70% всех углеводных запасов в теле мидий. Содержание олигосахаридов в этот период минимально, что свидетельствует о низкой интенсивности потребления углеводов.

Накопление в мантии запасов гликогена необходимо для обеспечения процессов гаметогенеза, который начинается осенью, вслед за периодом полового покоя. В этот период количество жира сохраняется на том же уровне, что и после размножения. Отсутствие процессов жиронакопления в летнее время служит доказательством того, что жир у мидий не является запасным энергетическим материалом.

Осенний репродуктивный период (сентябрь — декабрь) имеет принципиальное сходство с весенним, хотя наблюдаются и некоторые различия. По биологическим признакам он характеризуется, как и весенний, интенсивными гаметогенезом и линейным ростом (сентябрь — октябрь) и последующим размножением. Размножение у мидий порционное, т.е. на протяжении всего репродуктивного цикла они могут

выметывать половые продукты несколько раз (Bourcart, Lubet, 1965). Это особенно хорошо заметно во время осеннего репродуктивного периода, который более растянут во времени, чем весенний, и захватывает часть зимних месяцев. Так, в содержании белка наблюдается два пика (в сентябре и ноябре) с последующим понижением соответственно в октябре и декабре, т.е. в месяцы, когда происходит размножение. В ноябре наблюдается мощный пик белкового синтеза. Второй пик отмечен в марте. Факт значительных колебаний сроков размножения мидий от года к году в пределах одного географического района зарегистрирован М.А. Долгопольской (1957) и рядом других авторов.

Каждому из наблюдаемых пиков в содержании белка сопутствовало высокое содержание жира, после каждого размножения резко падало содержание углеводов. Накопление углеводов после осеннего размножения шло менее интенсивно, чем после весеннего, так что фактически содержание их на протяжении осенне-зимнего времени оставалось на одном уровне (с незначительными колебаниями) и возрастало только весной. Это связано, очевидно, с тем, что в осенне-зимнее время интенсивность питания и синтетических процессов у мидий резко замедляется. Кроме того, кормовая база в это время значительно беднее, чем весной.

Период зимовки (январь — март) можно выделить в качестве самостоятельного биологического периода только для мидий, обитающих в северо-западной части Черного моря, Керченском проливе и Азовском море, т.е. в тех районах, где зимняя температура воды близка к 0°C . Как отмечалось выше, рост мидий и репродукционные процессы происходят в интервале температур $8-26^{\circ}\text{C}$ (Воробьев, 1938). Поэтому у мидий, обитающих в упомянутых районах, четко выражен период зимнего покоя, во время которого отсутствуют линейный рост (Иванов, 1965) и размножение.

Что касается мидий из районов Севастопольской бухты, Карадага и Кавказского побережья, где зимняя температура воды не опускается ниже $6-8^{\circ}\text{C}$, то у них период зимовки отсутствует. Это подтверждается наличием у мидий, обитающих в этих районах, зимнего цикла размножения, который часто бывает даже интенсивнее весеннего.

Отличительной чертой биохимических процессов у мидий в зимний период является отсутствие накопления гликогена, что связано с общим низким уровнем метаболизма. Содержание белка и жира находится примерно на том же уровне, что и в летнее время (в период полового покоя).

На основании данных сезонной динамики химического состава мидий была рассчитана их калорийность на протяжении годового цикла. Средний уровень калорийности мидий невысок, составляет около 5 ккал/г сухой массы или 5,4 ккал/г органического вещества. Это обусловлено низким содержанием в теле мидий жира, являющегося наиболее энергоемким компонентом. Основную долю калорийности в теле мидий составляет белок — от 50 до 70%, углеводы дают от 20 до 40% и жир от 8 до 24%.

Сезонная динамика калорийности мидий сходна с динамикой белка и жира и определяется изменениями содержания этих компонентов, которые носят однонаправленный характер. Максимальная калорийность мидий отмечается весной (апрель — июнь) и осенью (сентябрь — ноябрь), т.е. в те месяцы, когда мидии половозрелы.

Изучение сезонной динамики химического состава мидий в районах Керченского пролива (Церковная банка и Водная станция), Егорлыцкого залива, на Одесской банке и в Севастопольской бухте показало принципиальное сходство в изменениях его компонентов, связанное с относительно общими условиями обитания. Однако разница в температурном и газовом режимах, различная обеспеченность пищей, которая наблюдается в этих районах в разные годы, обуславливают значительные межгодовые и популяционные различия в уровне содержания органических веществ и в сезонных изменениях, что связано в свою очередь со сроками и интенсивностью питания и созревания половых продуктов.

В связи с указанными различиями в динамике химического состава в целях наиболее рациональной добычи мидий необходимо ежегодно контролировать в весенний и осенний периоды их химический состав. Не менее важное значение имеют данные по химическому составу мидий для их искусственного разведения в условиях марикультуры. Так, уровень содержания гликогена, основного энергетического материала, может служить показателем потенциальной плодовитости мидий при прочих благоприятных условиях (газовый режим, обеспеченность пищей и др.). Низкий уровень содержания углеводов является, по нашим данным, показателем неблагоприятных условий обитания мидий. Весной, когда в Керченском проливе отмечается дефицит кислорода и наблюдаются заморные явления, содержание углеводов в теле мидий в 2 раза ниже обычного.

Содержание жира также, в известной мере, отражает условия обитания мидий. Например, при обильном количестве фитопланктона содержание жира в теле мидий увеличивается. Следовательно, данные по химическому составу мидий и его динамике в разных районах и в разные годы служат индикаторами биологического состояния мидий, характеризуют их взаимоотношения со средой и отражают особенности влияния среды на организм моллюсков.

Таким образом, физиолого-биохимическая характеристика мидий в отдельные периоды годового цикла дает возможность сделать вывод о том, что направленность и интенсивность биохимических процессов в организме мидий тесно связаны с репродуктивными циклами. Отсюда следует, что репродуктивные циклы являются теми внутренними сдерживающими, вокруг которых вращается биология вида. Действительно, мидии являются неподвижной формой, ведущей прикрепленный образ жизни, и используют лишь пассивные способы борьбы за существование.

Только интенсивное размножение и раннее созревание дают возможность мидиям развиваться в условиях жестокой конкуренции с другими видами моллюсков и выедания их рыбами (Воробьев, 1938).

Неподвижный образ жизни и фильтрационный способ питания требуют сравнительно небольших энергетических затрат. У мидий, очевидно, существует только два процесса, связанных со значительным расходом энергии — размножение и линейный рост, причем рост по отношению к размножению имеет подчиненное значение.

В теле мидий вырабатывается 6—7 млн. половых клеток, а у крупных особей до 25 млн. (Воробьев, 1938). При этом масса половых продуктов составляет более 50% от массы тела мидий. Естественно, что такой энергоемкий процесс, как гаметогенез, приводит к значительным изменениям в морфологической структуре тканей мидий, а значит, и в биохимических процессах, обуславливающих эти изменения. В период гаметогенеза значительно повышается содержание ряда метаболитов, необходимых для синтеза генеративной ткани, например таких, как небелковый азот, свободные аминокислоты, витамин В₁₂. Высокий уровень энергетического обмена, наблюдающийся у мидий в весеннее время, связан как с изменениями химического состава их тканей, так и с репродуктивным периодом. Четкая зависимость от репродуктивных циклов проявляется у мидий также в уровне активности ферментов энергетического обмена (Горомосова, Таможняя, 1980).

Исходя из данных сезонной динамики химического состава мидий, максимального содержания в их теле таких ценных компонентов, как незаменимые аминокислоты и витамины, и их калорийности можно сказать, что оптимальные сроки добычи совпадают с периодом гаметогенеза и приходятся на март — май и сентябрь — ноябрь.

Г Л А В А 2 . ФЕРМЕНТЫ ГЛИКОЛИЗА И ГЕКСОЗОМОНОФОСФАТНОГО ШУНТА В ТКАНЯХ МИДИЙ

До последнего времени ферментативный процесс анаэробного превращения углеводов был хорошо изучен на мышечной ткани теплокровных животных, бактериях и дрожжах. У различных видов беспозвоночных гликолитический процесс начали изучать лишь в 60-е годы (Simpson, Awapara, 1964; Stokes, Awapara, 1968). Объектом широкого изучения явились три группы организмов, способные существовать в условиях полного или частичного отсутствия кислорода — черви (особенно паразитические), литоральные двусторчатые моллюски, и беспозвоночные, зарывающиеся в донные осадки (Хочачка, Сомеро, 1977).

Превращение углеводов в гликолитической цепи происходит под действием более десяти ферментов. Вся гликолитическую ферментативную цепь можно разделить на четыре основные стадии (рис. 2).

I стадия — сахара мобилизуются путем образования фосфорилированных гексоз. Это осуществляется либо посредством простого фосфорилирования, либо фосфорилиза олиго- и полисахаридов.

II стадия — разрыв фосфорилированных гексоз и установление равновесия между образующимися триозами.

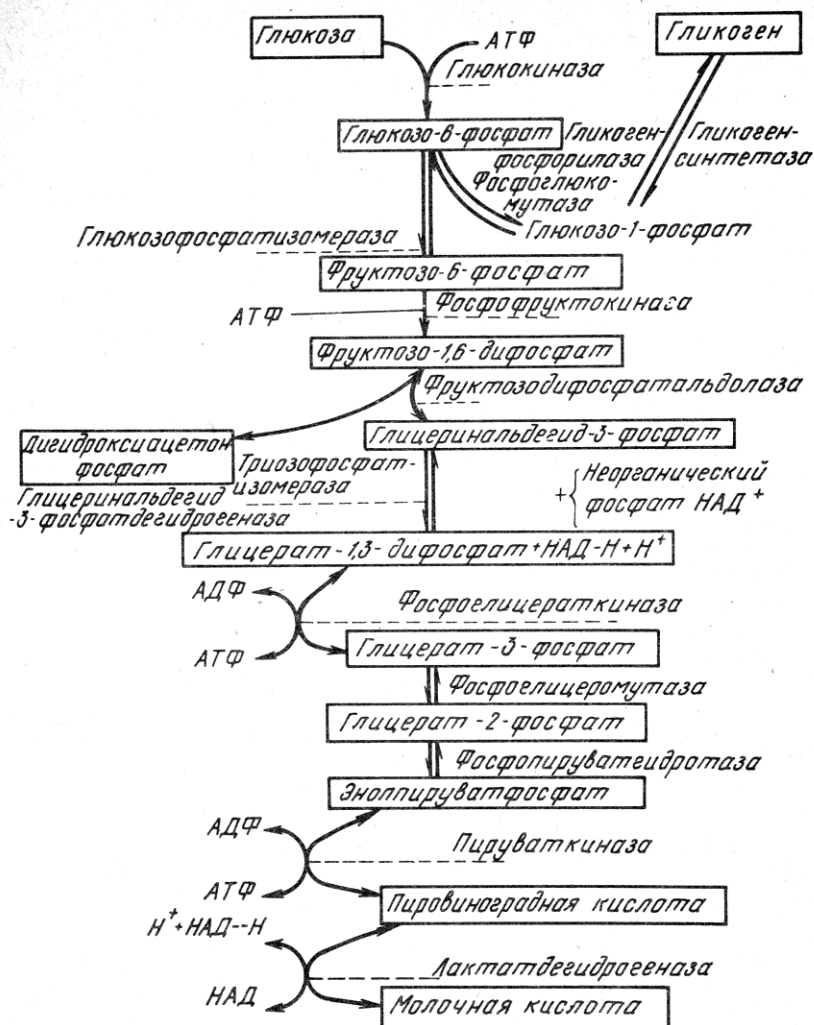


Рис. 2. Классическая схема гликолитического процесса

III стадия — образование молекул АТФ (аденозинтрифосфат) на уровне превращения 1,3-дифосфоглицерата в 3-фосфоглицерат.

IV стадия — превращение молекул 3-фосфоглицерата в пируват и его дальнейшее окисление в лактат или ряд других конечных продуктов катаболизма углеводов.

Таким образом, цепь ферментативных реакций анаэробного превращения углеводов — сложная полиферментная система. Регуляция ее активности осуществляется многими факторами и происходит на уровне

нескольких "ключевых" регуляторных ферментов: ГК, ФЛ, ФФК, ПК и частично ФГК. "Ключевые" ферменты гликолиза катализируют неравновесные реакции, их активность низка и контролируется факторами, отличными от концентрации субстратов. В число регуляторов входят не только метаболиты гликолитического процесса, но и ЦТК (Мильман, Юровицкий, 1973).

Необходимость регуляции процесса гликолиза связана с потребностью поддерживать скорость распада углеводов на уровне, определяемом энергетическими потребностями клетки.

Схема последовательности реакции гликолитической цепи у различных организмов сходна. Однако уровень активности отдельных ферментов, их кинетические свойства и особенности регуляции в значительной мере зависят от условий обитания организма и функциональной нагрузки ткани. В связи с этим исследование углеводного катаболизма у различных групп животных представляет интерес для идентификации ключевых звеньев этих процессов и с точки зрения биохимических адаптаций.

В настоящей главе будут рассмотрены активности ферментов гликолиза и примыкающих к нему сопряженных реакций преобразования углеводов в тканях пластинчатожаберных моллюсков, в основном черноморских мидий, а также представлены кинетические характеристики этих ферментов и некоторые черты их регуляции.

Начальные этапы гликолиза

Поскольку у мидий гликоген является основным энергетическим источником и содержится в больших количествах во всех тканях, представляет интерес рассмотреть ферментные пути его расщепления, синтеза и интенсивность этих процессов.

Распад гликогена в животном организме может осуществляться двумя путями — фосфоролитическим и амилолитическим (или гидролизным).

Активность фосфорилазы. Основным путем расщепления гликогена является фосфоролиз с образованием глюкозо-1-фосфата. Фосфорилаза, или 1,4-глюкагон-ортофосфатглюкозилтрансфераза, — это первый фермент гликогенолиза, который катализирует отщепление от гликогена и фосфорилирование одной молекулы глюкозы, осуществляя начальный этап анаэробного распада гликогена. В мышечной ткани сердца и печени высших животных, где гликоген выступает как первоисточник энергии, фосфорилаза является одним из ключевых ферментов. Свойства фосфорилазы хорошо изучены на высших и низших позвоночных и описаны в литературе (Розенфельд, 1969; Мильман, Юровицкий, 1973). Этот фермент представлен двумя молекулярными типами: фосфорилазным *a* — тетрамером с молекулярной массой 500 000; фосфорилазным *b* — димером с молекулярной массой 250 000. Обе формы обладают сходной субстратной специфичностью, но имеют аллостерические центры. Фосфорилаза *b* практически неактивна в отсутствие АМФ (аденозинмонофосфата) и тормозится Г-6-Ф (глюкозо-6-фосфат) и другими нуклео-

Т а б л и ц а 1. Активность фосфорилазы в тканях мидий в разные сезоны года, мкг Р/г сырой массы в минуту ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Исследуемая ткань	Весна		Лето		Осень		Зима	
	Активная форма	Общая активность	Активная форма	Общая активность	Активная форма	Общая активность	Активная форма	Общая активность
Мышцы	29,9±2,5 (6)	35,4±2,2 (6)	23,5±2,2 (9)	34,4±3,1 (9)	8,6±1,3 (8)	13,3±1,3 (8)	9,5±1,7 (7)	14,9±2,4 (7)
Гепатопанкреас	18,7±2,5 (7)	28,6±2,3 (7)	26,1±2,9 (8)	42,4±1,9 (8)	12,5±1,8 (6)	21,1±2,2 (6)	13,7±1,9 (7)	23,2±1,2 (7)
Гонады I—II стадии зрелости	21,7±2,2 (5)	34,3±2,3 (5)	34,4±2,4 (4)	41,6±3,1 (4)	—	—	14,1±1,5 (5)	27,8±2,7 (5)
Гонады III—IV стадии зрелости	11,0±2,7 (4)	23,6±4,0 (4)	—	—	11,3±2,0 (4)	22,0±2,1 (4)	7,4±1,5 (4)	17,3±2,6 (4)

П р и м е ч а н и е. В скобках показано количество определений.

тидами, а также АТФ и цитратом. Фосфорилаза *a* не угнетается АТФ и требует ничтожных концентраций АМФ. В мышцах, находящихся в состоянии покоя, преобладает, как правило, фосфорилаза *b*. При переходе ткани в рабочее состояние неактивная форма фосфорилазы переходит в активную с помощью фосфорилазы-*b*-киназы. Установлено, что скорость гликогенолиза в мышцах зависит от скорости превращения фосфорилазы *b* в *a*. Печень и почки содержат другой тип фосфорилазы, отличный по своим свойствам от мышечной. Неактивная форма этого фермента не активируется ни АМФ, ни какими-либо метаболитами. Переход неактивной формы *b* в активную осуществляется киназой фосфорилазы.

Исследования активности фосфорилазы беспозвоночных животных немногочисленны, однако, по имеющимся данным, свойства ее мало отличаются от свойств фосфорилазы позвоночных (Cowgill, 1965; Simpson, Awapara, 1966). У крабов и насекомых имеется две формы фосфорилазы, причем переход неактивной формы в активную осуществляется с помощью фосфорилазы-*b*-киназы. Некоторые отличия заключаются в том, что фосфорилаза краба не активируется цистеином. Показано, что при настаивании экстракта мышц с фторидами, гликогеном, АМФ активность фермента возрастает более чем в 3 раза, чего у позвоночных не наблюдается. В связи с этим предполагается наличие, например, у краба третьей формы — фосфорилазы *c*, которая при инкубации переходит в форму *b*. Фермент мышц краба выделен в кристаллическом виде (Cowgill, 1965).

На двустворчатых моллюсках *Mytilus californianus* и *Haliotis rufescens*

показан низкий уровень фосфорилазной активности (Bennett, Nakada, 1968). Активность фосфорилазы черноморской мидии изучалась в отдельных тканях и в сезонном аспекте. Как показали полученные данные, во всех исследованных тканях мидий активность фермента выражается величинами одного порядка, колеблясь в пределах 11–42 мкг Р/г сырой массы в минуту (табл. 1). Соотношение активной и неактивной форм фосфорилазы тканей мидии несколько необычно — активная форма составляет 60–70%, тогда как в мышцах большинства животных основное количество фермента представлено формой *b*. Вероятно, этот факт можно объяснить особенностью мышечной работы мидий — длительным, так называемым тоническим, типом сокращения. Сопоставление полученных данных с литературными показывает, что фосфорилазная активность тканей черноморских мидий находится примерно на таком же низком уровне, как у *M. californianus*, и на 1–2 порядка ниже, чем в мышцах омара и других активных беспозвоночных.

Активность мышечной фосфорилазы подвержена значительным сезонным колебаниям. Весной и летом она в 2–3 раза выше, чем в осенне-зимний период. В гепатопанкреасе и гонадах наблюдается та же тенденция. В гонадах, кроме того, активность фермента зависит от стадии зрелости: на I–II стадии зрелости она выше, чем на III–IV. Это согласуется с данными о том, что наиболее активная утилизация гликогена происходит в начальной стадии формирования половых клеток (Мильман, Юровицкий, 1973).

Активность α -амилазы и γ -амилазы. α -Амилаза, или α -1,4-глюкангидролаза, расщепляет в полисахаридах 1,4-глюкозидную связь, при этом образуется дисахарид мальтоза и небольшие полисахаридные единицы, так называемые олигосахариды. Свойства α -амилазы хорошо изучены на очищенном ферменте, полученном из бактерий, беспозвоночных и позвоночных животных (Fischer, Stein, 1958).

Фермент активируется ионами хлоридов и ингибируется ЭДТА (этилендиаминтетраацетатом), который связывает ион Ca^{+2} , входящий в его структуру. α -Амилаза принимает участие в расщеплении углеводов, попадающих в организм с пищей, и содержится в высоких концентрациях во всех органах пищеварения. Долго ее рассматривали как пищеварительный фермент, однако в 60-е годы этот фермент обнаружили во многих других органах и тканях — печени, почках, мышцах, мозге (Mc Geachin, Debnam, 1960). Было показано, что во всех тканях наряду с фосфоролитическим существует гидролитический путь расщепления гликогена (Stetten, Stetten, 1960). Особенно активен он в тканях рыб (Андреев, 1958; Burt, 1966).

Работы по изучению α -амилазы у моллюсков сводятся в основном к выяснению ее пищеварительных функций. Показана локализация фермента в кристаллическом стебельке двустворчатых и брюхоногих моллюсков, гемолимфе, пищеварительной железе и кишечнике (Viera, Ladeira, 1965; Horinche, Lane, 1966). Исследования мышечной активности амилазы у беспозвоночных и ее функций в расщеплении гликогена практически отсутствуют. О наличии амилолиза в мышцах беспоз-

воночных можно судить по косвенным данным, т.е. по высокому содержанию олигосахаридов (Fraga, Lopez — Capont, 1958), активному включению в мальтозу меченого углерода (Bryant et. al., 1964). Определение α -амилазы в мышцах моллюсков было проведено на брюхоножном моллюске *Anstratorbis glabratus* (Viera, Ladeira, 1965). Установлено, что активность ее имеет довольно высокий уровень — всего в 2 раза ниже, чем в гепатопанкреасе.

Мы определяли активность α -амилазы в отдельных тканях мидий. Наиболее высокой амилазной активностью обладает гепатопанкреас (270 мг глюкозы/г сырой массы в час). Это связано с тем, что в нем находятся пищеварительные железы, т.е. он совмещает функции желудка и печени, наиболее активно расщепляющих углеводы. Активность мышечной амилазы составляет 15,1 мг глюкозы/г сырой массы в час. В гонадах α -амилазная активность не обнаружена. За час инкубации в гепатопанкреасе мидий расщепляется 69% гликогена, в мышцах — 20%. В печени крабов, рыб и кролика амилолитическое расщепление гликогена составляет 40–70% его содержания (Blandamer, Beachey, 1964). В мышцах трески за 1 ч инкубации расщепляется амилолизом до 30% гликогена (Burt, 1966). В пересчете на амилазные единицы активность мышечной амилазы мидий составляет 94 ед./100 г ткани, что по своему уровню близко к амилазной активности мышц рыб (Mc Geachin, Debuau, 1960).

Определение активности α -амилазы гепатопанкреаса на протяжении годового цикла не показало значительных сезонных колебаний (табл. 2). Можно отметить, однако, некоторое снижение активности фермента в феврале, марте, июне, октябре и в декабре, что соответствует периодам размножения мидий. Отсутствие ритмичности секреции пищеварительных ферментов (амило-, глико- и протеолитических) отмечено у брюхоножного моллюска *Viviparus bengalensis*, являющегося по способу питания фильтратором (Biswass, Chose, 1968). Авторы связывают это с непрерывным питанием моллюска.

Поскольку активность фосфорилазы у мидий низка и, вероятно, не обеспечивает нужного для гликолиза количества глюкозы, представ-

Т а б л и ц а 2. Амилазная активность гепатопанкреаса мидий, мг глюкозы / г сырой массы за 20 мин ($\bar{X} \pm S\bar{X}$)

Месяц	$\bar{X} \pm S\bar{X}$ (n)	св, %
I	102,0 $\pm$ 9,2 (3)	15,6
II	89,6 $\pm$ 2,5 (5)	6,4
III	67,3 $\pm$ 9,6 (4)	28,7
IV	94,5 $\pm$ 5,1 (4)	10,8
V	100,6 $\pm$ 2,9 (3)	5,0
VI	85,0 $\pm$ 7,9 (4)	18,6
VII	96,3 $\pm$ 3,5 (3)	6,3
VIII	102,6 $\pm$ 2,9 (3)	4,9
IX	75,8 $\pm$ 5,8 (5)	17,2
X	86,7 $\pm$ 5,2 (3)	10,4
XII	86,7 $\pm$ 4,1 (3)	8,2

Т а б л и ц а 3. Содержание глюкозы и активность γ -амилазы в тканях мидий, мг/г сырой массы за 30 мин

Ткань	Глюкоза	γ -Амилаза
Мышцы	$0,12 \pm 0,07$	$0,20 \pm 0,05$
Жабры	$0,20 \pm 0,10$	$0,37 \pm 0,09$
Гонады	$0,10 \pm 0,06$	$0,60 \pm 0,13$
Печень	$0,30 \pm 0,11$	$0,73 \pm 0,17$

ляло интерес выяснить возможность введения в гликолиз продуктов α -амилазного распада. В связи с этим нами было проведено исследование по использованию в гликолизе в качестве субстрата мальтозы как основного продукта α -амилолитического расщепления гликогена. Полученные данные показали, что мальтоза стимулирует интенсивность гликолиза в той же степени, что и глюкоза, при этом выход молочной кислоты превышает эндогенный в 2 раза. Гликоген в качестве субстрата практически не влияет на интенсивность гликолиза.

Эти факты свидетельствуют о том, что в мышцах мидий преимущественным путем ввода гликогена в гликолиз является амилолизный, а основным субстратом гликолиза являются моно- и дисахариды, в частности дисахарид трегалоза (Zwaan, Marrewijk, 1973).

Помимо α -амилазы в расщеплении молекулы гликогена участвуют также γ -амилазы или глюкоамилазы, отщепляющие глюкозу от конечных ветвей гликогена (Розенфельд, 1969). Они широко распространены у бактерий и плесеней, а также найдены относительно недавно у позвоночных. Кислые γ -амилазы локализованы в лизосомах и единственным низкомолекулярным продуктом при их действии на гликоген является глюкоза. Подробное изучение γ -амилаз на высших позвоночных было начато в связи с тем, что они регулируются гормонами подобно фосфорилазе (Розенфельд, 1969). В связи с этим существует мнение, что кислая γ -амилаза способна подменять фосфорилазу при расщеплении гликогена.

Работы по изучению активности γ -амилазы на беспозвоночных нам неизвестны.

Нами было определено содержание истинной глюкозы и установлена γ -амилазная активность в тканях мидий (табл. 3). При сопоставлении уровня активности γ - и α -амилазы оказалось, что последняя имеет на два порядка более высокую активность в мышцах и гепатопанкреасе. В связи с этим мы считаем, что основную роль в распаде гликогена у мидий играет α -амилаза, мальтаза и другие олигоглюкозидазы.

Соотношение амилазной и фосфорилазной активности в мышечной ткани беспозвоночных. Очевидным является, что глюкоза — источник мышечного гликолиза может образовываться при расщеплении гликогена путем как фосфоролиза, так и амилолиза. Исходя из данных о специфической активности этих ферментов, нами было рассчитано количество глюкозы, образующейся в единицу времени при фосфоролизе и амилолизе. Оказалось, что в мускуле-аддукторе мидии фосфорилазным

Институт биологии
морей ДН УССР

БИБЛИОТЕКА

31997

путем образуется 0,14 мг глюкозы/г сырой массы, что составляет 36%, а амилазным — 0,25 мг глюкозы, или 64% общего количества.

В связи с важностью вопроса о соотношении амилазного и фосфорилазного путей расщепления гликогена в мышцах беспозвоночных нами была определена активность этих двух ферментов у ряда представителей черноморских беспозвоночных, отличающихся как по своей экологии, так и по филогении: из кишечнорастворимых — гидроид *Bougainvillea megas* и актиния *Actinia equina*; пластинчатожаберных и брюхоногих моллюсков — *Mytilus galloprovincialis* и *Rapana thomassiana*; ракообразных — усоногий рак *Balanus improvisus*, краб *Carcinus maenas*, креветка *Crangon crangon* и оболочников — асцидия *Ascidia aspersa*.

Активность α -амилазы обнаружена в мышечной ткани всех исследованных видов и составляет от 16 до 70 мг глюкозы/г сухой массы за 20 мин.

Уровень активности повышается в ряду кишечнорастворимых — моллюски — ракообразные, т.е. по мере возрастания филогенетического уровня видов, примерно в 5 раз. В то же время прослеживается зависимость амилазной активности мышц животных от степени их подвижности, т.е. от уровня функциональной нагрузки мышечной ткани. Так, у видов, ведущих прикрепленный образ жизни (асцидий и баянусов), активность фермента в 2 раза ниже, чем у таких подвижных видов, как крабы и креветки.

Фосфорилазная активность мышц беспозвоночных представлена в табл. 4. Здесь также четко видна связь между уровнем активности фермента и подвижностью данного вида животного. Так, у кардиума и рапаны активность фосфорилазы в 3 раза выше, чем у мидий. У баянуса и малоподвижной изоподы идотея уровень активности фосфорилазы в 3 раза ниже, чем у бокоплава гаммаруса, самая высокая активность фермента относится к наиболее подвижному виду ракообразных — креветкам. Активность фосфорилазы у креветок более чем на поря-

Т а б л и ц а 4. Фосфорилазная активность мышц моллюсков и ракообразных, мкг Р/г сырой массы мышц в минуту ($\bar{X} \pm SE$)

Объект исследования	Активность фосфорилазы	
	Форма α	Общая
Моллюски		
<i>Mytilus galloprovincialis</i> L.	16,0 $\pm$ 1,7 (8)	23,8 $\pm$ 2,2 (8)
<i>Cardium edule</i> L.	50,3 $\pm$ 5,3 (6)	64,2 $\pm$ 4,8 (6)
<i>Rapana thomassiana</i> Crosse	49,8 $\pm$ 4,2 (8)	72,3 $\pm$ 7,9 (8)
Ракообразные		
<i>Balanus improvisus</i> Darv.	16,7 $\pm$ 1,4 (5)	23,4 $\pm$ 2,3 (5)
<i>Idothea baltica basteri</i> (Aud.)	10,2 $\pm$ 1,2 (5)	21,8 $\pm$ 2,1 (5)
<i>Gammarus insensibilis</i> Stock	53,7 $\pm$ 5,7 (5)	61,3 $\pm$ 7,2 (5)
<i>Carcinus maenas</i> Cz	135,5 $\pm$ 11,7 (6)	149,7 $\pm$ 11,1 (6)
<i>Crangon crangon</i> Linne	219,1 $\pm$ 38,2 (6)	259,0 $\pm$ 34,0 (6)

П р и м е ч а н и е. В скобках указано количество определений.

Т а б л и ц а 5. Количество глюкозы, образованной фосфорилазным и амилазным путями

Объект исследования	Фосфорилазный путь		Амилазный путь		Суммарное количество глюкозы, мг/г в минуту
	мг/г сырой массы в минуту	%	мг/г сырой массы в минуту	%	
<i>Bougainvillea megas</i> (Kinne)	0,06	22	0,21	78	0,27
<i>Actinia equina</i> (L.)	0,06	30	0,25	70	0,31
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lam.)	0,14	36	0,25	64	0,39
<i>Rapana thomassiana</i> Crosse	0,42	48	0,45	52	0,87
<i>Balanus improvisus</i> Darv.	0,14	30	0,34	70	0,48
<i>Carcinus maenas</i> Cz	0,87	60	0,60	40	1,47
<i>Crangon crangon</i> Linne	1,51	67	0,75	33	2,26
<i>Ascidia aspersa</i> (Mull.)	0,05	22	0,18	78	0,23

док превышает таковую у баянусов. На основании приведенных данных рассчитано количество глюкозы, образующейся в мышцах беспозвоночных фосфорилазным и амилазным путем. Как видно из приведенных данных, интенсивность распада гликогена увеличивается по мере возрастания мышечной активности вида (табл. 5). При этом повышается интенсивность как амилазного, так и фосфорилазного пути расщепления гликогена. Однако относительное значение амилолиза понижается от 78 до 30% с возрастанием степени подвижности вида. Соответственно возрастает значение фосфоролиза. Наибольшая активность распада гликогена наблюдается у креветок и крабов, превышая таковую у малоподвижных видов более чем в 5 раз.

Рассмотренные данные позволяют заключить, что роль амилолиза в процессе распада мышечного гликогена велика на низших этапах эволюции. Кроме того, она тесно связана с экологией вида, в частности с уровнем его активности. Наблюдается прямая зависимость между подвижностью вида и уровнем утилизации гликогена в мышцах.

На зависимость уровня активности мышечной амилазы от подвижности вида рыб указывает А.К. Андреев (1958). Автор отмечает также, что в хвостовых мышцах активность фермента выше, чем в спинных, что, очевидно, связано с большой активностью первых при движении рыбы. Вполне возможно, что отмеченная закономерность сохраняется и на холоднокровных позвоночных животных.

Активность гексокиназы. Гексокиназа относится к группе аллостерических ферментов, под действием которых происходит фосфорилирование гексоз за счет макроэргических связей молекул АТФ: глюкоза + АТФ = АДФ + глюкозо-6-фосфат.

Сведения, касающиеся активности и свойств начальных этапов фосфорилирования гексоз в тканях пластинчатожабрных моллюсков и других беспозвоночных, крайне малочисленны. Прямое определение активности гексокиназы было проведено на мышечной ткани пластинчатожабрного моллюска *M. californianus* (Bennett, Nakada, 1968). В последующие годы активность гексокиназы была определена в мышеч-

Т а б л и ц а 6. Активность гексокиназы в тканях некоторых беспозвоночных и позвоночных животных

Вид	нмоль/мг белка в минуту	Литературный источник
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	17,5 ± 0,9	Шапиро, Бобкова, 1973
<i>M. californianus</i>	41 ± 0,8	Bennett, Nakada, 1968
<i>Nassa reticulata</i>	16,5	Вержбинская, 1972
<i>Pinna nobilis</i>	8	То же
<i>Murex truncularis</i>	7	"
<i>Eledone moshata</i>	40	"
<i>Sepia officinalis</i>	17	"
<i>Octopus vulgaris</i>	25	"
<i>Balanus improvisus</i>	48,6	Шапиро, Бобкова, 1973
<i>Carcinus mediterraneus</i>	20 ± 1,6	То же
<i>C. maenas</i>	8,1 ± 0,4	Boulton, Huggins, 1970
<i>Homarus vulgaris</i>	7,6 ± 0,4	То же
<i>Actinia equina</i>	66,8 ± 8	Шапиро, Бобкова, 1973
<i>Ascidia intestinalis</i>	29,3 ± 3,4	То же
<i>Torpedo marmorata</i>	4	Вержбинская, 1972
<i>Rattus</i>	6 ± 0,6	Boulton, Huggins, 1970

ной и нервной тканях ряда пластинчатожаберных и головоногих моллюсков (Вержбинская, 1972), в тканях различных ракообразных (Boulton, Huggins, 1970) и паразитических форм червей (Hutchinson, Oelshlegel, 1977). К этому же периоду относятся наши исследования по установлению уровня активности ферментов гликолиза у животных разных филогенетических линий и экологии.

Уровень активности гексокиназы у различных животных приведен в табл. 6. Анализируя результаты, полученные разными авторами, можно сказать, что, несмотря на общее сходство начальных реакций превращения углеводов у позвоночных и беспозвоночных, гексокиназа последних отличается некоторыми характерными свойствами. Эти отличия можно отнести прежде всего к уровню активности фермента.

У пластинчатожаберных и головоногих моллюсков активность гексокиназы одного порядка колеблется от 17 до 40 нмоль/мг⁻¹ в мин⁻¹, что в 5–15 раз выше активности гексокиназы в мышцах низших позвоночных (Вержбинская, 1972). Интенсивный пентозный шунт, обнаруженный в тканях моллюсков, также предполагает относительно высокую активность гексокиназы (Bennett, Nakada, 1968; Вержбинская, 1972). Высокая активность гексокиназы характерна для системы гликолиза и других беспозвоночных, ведущих прикрепленный неподвижный образ жизни, — актиний, баянусов и асцидий. Более низкие активности фермента обнаружены у высших ракообразных — *Carcinus mediterraneus*, *C. maenas* и низших позвоночных — миног, акул, скатов (Перцева, Желудкова, 1969; Вержбинская, Савина, 1971; Вержбинская, 1972).

Из приведенных данных следует, что величину активности гексокиназы определяет экология вида. У прикрепленных форм активность фермента в 5–7 раз выше, чем у активных. Особенно четко это положение подтверждается на примере ракообразных, у которых наблюдается сниже-

ние активности гексокиназы от низших представителей (цирипедиевых раков) к высшим (десятиногим ракам). При этом, как было отмечено, падение активности гексокиназы в мышечной ткани этих организмов сопровождается увеличением фосфорилазной активности, что хорошо согласуется с положением о высокой гексокиназной активности гликолитической системы мышечной ткани животных с более примитивным уровнем организации (Вержбинская, Савина, 1971).

Как было установлено для позвоночных животных, гексокиназа в общей цепи ферментов гликолиза имеет низкую активность и является лимитирующим звеном процесса. В результате низкой активности гексокиназы скелетные мышцы рыб могут фосфорилировать только десятую часть того количества глюкозы, которую может гликолизировать (Black et al., 1961) мышечная ткань. Высокая активность гексокиназы является отличительной чертой гликолитической системы мышечной ткани малоактивных беспозвоночных. По нашим данным, активность гексокиназы в тканях мидий со стократным избытком обеспечивает свойственную этим организмам интенсивность дыхания. Избыток гексокиназной активности в мышечной ткани настолько велик, что во всех ситуациях, когда происходит усиление интенсивности гликолиза, этот фермент не может явиться лимитирующим звеном процесса. Однако на тканях гепатопанкреаса мидий была отмечена тенденция лимитирования процесса гликолиза на стадии гексокиназы (Cameselle et al., 1980).

Значительная роль ГК как ключевого фермента углеводного обмена обусловила всестороннее изучение ее свойств: кинетических, специфику локализации в клетке, тканевую специфичность, изменение активности в онтогенезе, при интенсивных мышечных сокращениях, при смене условий внутренней и внешней среды организма и т.д. (Ньюс-Холм, Старк, 1977). Установлено, что ГК тканей млекопитающих состоит из четырех изоферментов, отличающихся родством к глюкозе (табл. 7).

Набор изоферментов ГК определяется функциональной активностью ткани, возрастом организма, его физиологическим состоянием. Изоферменты I, II и III широко распространены в тканях. Изофермент IV сначала был обнаружен только в печени, однако более поздние данные свидетельствуют о наличии этого изофермента и в других тканях, в частности в скелетных мышцах крыс (Алексашина, Ситнина, 1972). Некоторые авторы считают, что ГК IV поддерживает высокий уровень Г-6-Ф в тканях в условиях ингибирования активности других изоферментов.

Т а б л и ц а 7. K_M изоферментов тканей млекопитающих
(Мильман, Юровицкий, 1973)

Ткань	I	II	III	IV
Мозг	$3,0 \cdot 10^{-5}$ М	—	—	—
Мышцы	$2,5 \cdot 10^{-5}$ М	$2 \cdot 10^{-4}$ М	—	—
Печень	$2,4 \cdot 10^{-5}$ М	$1 \cdot 10^{-4}$ М	$5 \cdot 10^{-3}$ М	$1,6 \cdot 10^{-2}$ М
Жировое тело	—	$1 \cdot 10^{-4}$ М	—	—

Изоферментный состав ГК беспозвоночных обнаружен у моллюсков, ракообразных, кишечнорастворимых, иглокожих, насекомых. Столь широкое исследование изоферментных спектров у филогенетически и экологически различных беспозвоночных обусловлено их большой информативностью для решения многих задач теоретической и прикладной биологии. В частности, метод электрофореза отдельных белков нашел широкое применение в систематике, в популяционных исследованиях, в теории марикультуры. Установлено, что на электрофореграммах ГК различных тканей беспозвоночных может быть обнаружена одна (цифойдная медуза *Cyanea capillata*, морская звезда *Arbacia punctulata*), две (голотурия *Haliplanella lucial*), три (омар *Homarus americanus*, паразитический червь *Dirofilaria immitis*) и четыре (дрозофила *Drosophila robusta*) зоны.

Приведенные данные свидетельствуют о больших различиях изоферментного спектра у различных беспозвоночных. Данные о значениях K_M для ГК беспозвоночных малочисленны. В основном они относятся к паразитическим червям, что связано с широким изучением их метаболизма для разработки эффективных противогельминтных препаратов (Hutchoinson et al., 1977).

У ракообразных сродство фермента к субстрату зависит от их вида. У циррипедиевых раков *Balanus improvisus* значение K_M низко (Бобкова, 1980). Величина K_M , рассчитанная последним автором по методу Эди-Хофсти, равна $1,5 \cdot 10^{-3}$ М. По данным этого автора, в мышцах краба *Carcinus mediterraneus* сродство ГК к глюкозе выше, чем для усоножек баянусов и составляет $4,4 \cdot 10^{-4}$ М. Наши данные, полученные на частично очищенном белке, выделенном из супернатанта 10% гомогената мышц — аддуктора мидий на геле фосфата кальция или 70% насыщением супернатанта сульфатом аммония, свидетельствуют о низком сродстве ГК к глюкозе. K_M ГК этих препаратов соответственно

составляет $5 \cdot 10^{-3}$ и $7 \cdot 10^{-3}$ М (рис. 3, 4). Полученные нами и литературные данные свидетельствуют о зависимости K_M ГК от экологии вида. У прикрепленных гидробионтов сродство к ГК к субстрату низко. С повышением активности организма сродство фермента к глюкозе усиливается. При этом абсолютная активность фермента снижается.

Известно, что основным энергетическим субстратом у пластинчатожаберных моллюсков является гликоген. Нами показано, что включение гликогена в углеводный обмен происходит в значительной степени

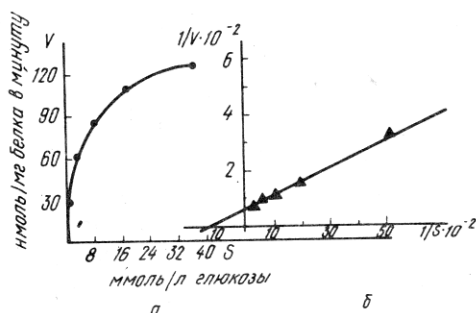


Рис. 3. Зависимость скорости реакции ГК от концентрации глюкозы (белок выделен на геле фосфата кальция); S — концентрация субстрата; V — скорость реакции; a — в координатах V и S ; b — в координатах $1/S$ и $1/V$

через амилолиз. В условиях гипоксии концентрация глюкозы в тканях мидий повышается. В этих условиях, вероятно, может функционировать фермент с низкой чувствительностью к субстрату.

Низкое K_M ГК к глюкозе и ее высокая активность у прикрепленных гидробионтов имеет адаптивное значение, обусловленное экологией исследуемого вида.

Активность и регуляторные свойства фосфофруктокиназы. ФФК (фосфофруктокиназа) катализирует фосфорилирование Ф-6-Ф (фрук-

тозо-6-фосфат) с образованием в качестве конечного продукта ФДФ (фруктозодифосфат).

В связи с тем что этот фермент катализирует неравновесную реакцию (Ньюс-Холм, Старт, 1977), фосфорилирование Ф-6-Ф является второй после гликогенфосфорилазы в гликогенолизе или гексокиназы в гликолизе лимитирующей стадией процесса катаболизма углеводов. Роль ФФК в процессе гликолиза значительна, и механизм действия фермента явился предметом глубокого изучения многих исследователей. Данные по этим вопросам обобщены в ряде обзоров (Мильтман, Юровицкий, 1973; Ньюс-Холм, Старт, 1977).

Было установлено, что ФФК — аллостерический фермент. В ее молекуле имеется, по крайней мере, два центра — каталитический и аллостерический. Наличие двух центров обуславливает специфические особенности взаимоотношения между ферментом и его двумя субстратами — АТФ и Ф-6-Ф. Эти вещества выступают одновременно как субстраты и как модуляторы фермента. АТФ при высоких концентрациях является потенциальным ингибитором фермента, в то время как Ф-6-Ф — положительный модулятор. Присоединение первых молекул Ф-6-Ф к ферменту увеличивает его сродство к последующим молекулам. В связи с этим кривая зависимости скорости реакции от концентрации Ф-6-Ф имеет отчетливо выраженный S-образный характер (рис. 5).

Между ферментом, его субстратом (Ф-6-Ф и АТФ) и продуктом реакции ФДФ устанавливаются определенные взаимоотношения. Ингибирующее действие АТФ может быть снято увеличением концентрации в среде как Ф-6-Ф, так и ФДФ.

Регуляторами ФФК, кроме ее субстратов и продукта реакции, является ряд метаболитов процесса гликолиза, цикла Кребса, жирового обмена и компонентов адениннуклеотидной системы (Ньюс-Холм, Старт, 1977). Регулирующее действие оказывает неорганический фосфор (P_n), фосфат, креатинфосфат, фосфоэнолпируват, цитрат, изоцит-

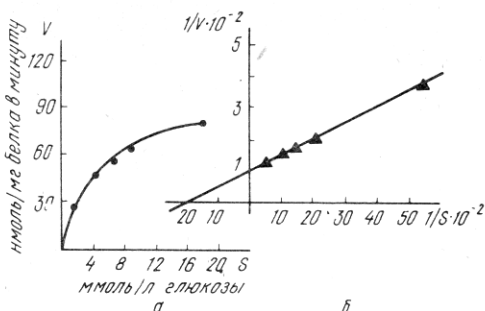


Рис. 4. Зависимость скорости реакции ГК от концентрации субстрата (глюкозы). Фермент выделен 70%-ным насыщением сульфатом аммония 10%-ного гомогената. Обозначения те же, что на рис. 3

рат, α -кетоглутарат, АДФ, АМФ (аденозинмонофосфат) и циклический 3,5-АМФ. Большинство перечисленных веществ являются ингибиторами фосфофруктокиназы. Число активаторов фермента незначительно. К ним относятся АДФ и АМФ, особенно циклическая, ФДФ и Φ_n .

Одним из регулирующих факторов активности ФФК является ее взаимосвязь с ФДФазой (фруктозодифосфатаза). Взаимодействие между этими двумя ферментами осуществляется через фосфофруктокиназный Ф-дифосфатазный субстратный цикл, основное значение которого сводится к ферментативному расщеплению ФДФ до Ф-6-Ф в обход фосфофруктокиназной реакции (рис. 6). При этом происходит непрерывный гидролиз АТФ. По регуляторным свойствам ФДФаза является ферментом-антагонистом ФФК. В условиях усиления интенсивности гликолиза и увеличения в клетке концентрации ФДФ, АДФ, АМФ и Φ_n создаются условия для повышения внутриклеточной активности ФФК и снижения ФДФазы. В аэробных условиях снижения уровня ФДФ способствует активизации процесса глюконеогенеза, т.е. расщеплению ФДФ ФДФазой.

Имеется ряд концепций о физиологическом значении рассматриваемого цикла, основная из которых сводится к предположению о возможности увеличения эффективности контроля скорости гликолиза этим циклом при усиленных мышечных нагрузках (Мильман, Юровицкий, 1973; Хочачка, Сомеро, 1977).

Исследования кинетических свойств и механизмов регуляции ФФК у животных разного филогенетического уровня показали, что характер зависимости кривой субстратного насыщения, некоторые кинети-

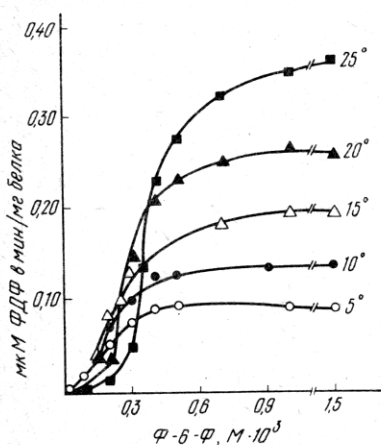


Рис. 5. Зависимость скорости реакции ФФК от концентрации Ф-6-Ф при разных температурах (по Freed, 1971):

по оси абсцисс — концентрация субстрата; по оси ординат — скорость реакции

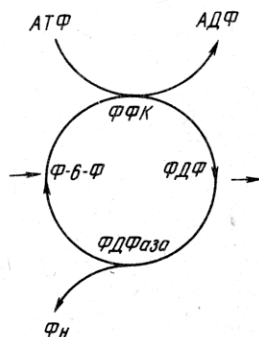


Рис. 6. Фосфофруктокиназный-фруктозодифосфатазный (ФФК/ФДФ) цикл (Ньюс-Холм, Старт, 1977)

ческие параметры и схема регуляции активности фермента у различных видов являются в основном одинаковыми. Обнаруженные различия в кинетике фермента в основном относились к концентрационным и температурным параметрам. Концентрации АТФ, Ф-6-Ф, 3,5-цАМФ (циклический аденозинмонофосфат) и P_n (неорганический), вызывающие регуляцию ФФК сердечной мышцы дельфина, резко отличалась от аналогичных величин для мышц крысы (Hochachka et al., 1974). Изменение кинетических параметров фермента в зависимости от температуры были получены на тканях королевского краба *Paralithodes camtschatica* (Freed, 1971). Так, в мышцах этого гидробионта с увеличением температуры от 5 до 25°C наблюдается изменение коэффициента Хилла от 2,9 до 9,2.

О свойствах ФФК в тканях моллюсков известно очень мало. В основном это данные об общей активности фермента в мышечной ткани *Mytilus galloprovincialis* (Шапино, Бобкова, 1973); *M. californianus* (Bennett, Nakada, 1968); *Crassostrea virginica* (Storey, 1976); мышечной и нервной тканях *Pinna nobilis* (Вержбинская, 1972) головоногих моллюсков (Вержбинская, 1972). Имеется ряд данных, относящихся к ракообразным: *Balanus improvisus*, *Carcinus mediterraneus* (Шапино, Бобкова, 1973); *Carcinus maenas*, *Elminius modestus* (Boulton, Huggins, 1970); *Paralithodes camtschatica* (Freed, 1971) и *Orconectes limasus* (Lesicki, 1980) (табл. 8).

Сравнение активности ФФК с другими ферментами гликолиза в мышечной ткани мидий показывает, что этот фермент не лимитирует общую интенсивность процесса гликолиза. Об этом свидетельствуют некоторые характеристики этого процесса у моллюсков. Так, отношение активности ГК к ФФК равно 1. Это может свидетельствовать о том, что в оптимальных условиях функционирования гликолитического процесса практически вся глюкоза, фосфорилированная в гексокиназной реакции, включается в фосфофруктокиназную. Об этом также свидетельствуют данные интенсивности гликолитического процесса, измеренного в инкубационных средах с промежуточными метаболитами процесса, в частности с ФДФ. Об отсутствии лимитирования гликолиза фосфофруктокиназой в мышцах мидий свидетельствуют также данные по содержанию в тканях моно- и дифосфорилированных гексоз. При сравнении концентрации этих веществ четко прослеживается связь уровня активности ФФК и соотношения концентрации Г-6-Ф (глюкозо-6-фосфат) и ФДФ. Так, в тканях позвоночных содержание Г-6-Ф в 10–20 раз выше ФДФ (Ньюс-Холм, Старт, 1977), в мышцах королевского краба — в 5 раз, в мышцах мидий концентрации этих веществ практически одинаковы.

Значительное преобладание содержания Г-6-Ф над ФДФ в тканях позвоночных связано с тем, что у этих организмов ФФК является лимитирующей стадией процесса гликолиза. В мышечной ткани мидий это соотношение таково, что можно говорить об отсутствии лимитирования процесса гликолиза фосфофруктокиназной реакцией. Однако Д.С. Камесели (Cameselle et al., 1980) на гепатопанкреасе *Mytilus edulis* отмеча-

Т а б л и ц а 8. Активность ФФК в тканях некоторых беспозвоночных и позвоночных животных

Объект исследования	нмоль/мг белка в минуту	Литературный источник
Кишечнополостные		
<i>Astina equina</i>	21,3 ± 5,0	Шапиро, Бобкова, 1973
Плстинчатожаберные моллюски		
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	32,0 ± 1,4	То же
<i>M. californianus</i>	47,0 ± 3,0	Bennett, Nakada, 1968
<i>Pinna nobilis</i>	10,0 ± 0,0	Вержбинская, 1972
Головоногие моллюски		
<i>Ostopus vulgaris</i> (нервная ткань)	13,0 ± 0,0	То же
Усоногие раки		
<i>Balanus improvisus</i>	16,0 ± 2,1	Шапиро, Бобкова, 1973 б
Десятиногие раки		
<i>Crangon crangon</i>	42,6 ± 4,1	То же
<i>Cr. crangon</i>	87,0 ± 4,0	Boulton, Huggins, 1970
<i>Paralitodes camchatica</i> (жаберная ткань)	30,0 ± 0,0	Hochachka et al., 1970
<i>Carcinus mediterraneus</i>	33,0 ± 1,2	Шапиро, Бобкова, 1973
<i>maenas</i> жаберная ткань	69,0 ± 0,0	Thabrew et al., 1971
мышечная ткань	61,0 ± 10	Boulton, Huggins, 1970
<i>Orconectes limosus</i> Rai.		
гепатопанкреас	170,0 ± 0,0	Lesicki, 1980
абдоминальный мускул	80,0 ± 0,0	То же
Рыба		
<i>Torpedo marmorata</i> (нервная ткань)	10,0 ± 0,0	Вержбинская, 1972
Крыса		
<i>Rattus</i> (пищеварительный мускул)	16,0 ± 2,0	Boulton, Huggins, 1970

ет некоторое лимитирование интенсивности гликолитического процесса ФФК в нормальных условиях обитания, а Р.А. Эберинк (Ebberink, de Zwaan, 1980) такую же роль ФФК обнаружил на мышцах *Mytilus galloprovincialis* при кратковременной гипоксии. При длительной гипоксии лимитирование гликолитического процесса в точке фосфофруктокиназной реакции снимается и перемещается на стадию превращения фосфознолпирувата.

Слабое лимитирование интенсивности гликолитического процесса фосфофруктокиназной реакцией были получены на усоножках баянуса *Balanus improvisus*. В этой ткани в опытах *in vitro* скорость образования молочной кислоты в инкубационных средах, усиленных субстратными количествами ФДФ, была выше, чем в средах с Г-6-Ф в качестве субстрата. Кроме того, активность ГК у этих гидробионтов почти в 2 раза превышала активность ФФК. Еще большее усиление роли ФФК как лимитирующего звена гликолиза отмечено у высших ракообразных (Бобкова, 1980).

О сравнительно высокой активности ФФК в цепи гликолиза мидий свидетельствуют также величины активности этого фермента по отношению к энзимам, действующим на фосфорилированные моногексозы ФГМ (фосфоглюкомутаза) и ГФИ (глюкофосфоизомеразы).

Как было установлено, активность этих ферментов определяется видовой принадлежностью животных и их экологией. У прикрепленных видов (мидий и баянусов) активность перечисленных ферментов в 2—4 раза ниже, чем у высших ракообразных (крабов), и составляет для этих животных соответственно 350, 615 и 1266 нмоль/мг белка в минуту для ГФИ, 63 ± 8 ; $43 \pm 2,7$ и $366 \pm 7,3$ нмоль/мг белка в минуту для ФГМ. На основании изложенных данных можно сказать, что по абсолютным активностям перечисленные ферменты как у мидий, так и у млекопитающих превышают активность ГК и ФФК, однако у мидий эти ферменты менее активны, чем у организмов, ГК которых является лимитирующим звеном процесса гликолиза (Ньюс-Холм, Старт, 1977). Можно ожидать, что у организмов, обладающих значительными активностями ферментов, действующих на фосфорилированные моногексозы, превращение последних происходит в основном по гликолитическому пути.

При незначительном преобладании активности ФГМ и ГФИ над ГК и ФФК, как это имеет место у моллюсков и низших ракообразных, удельный вес этих ферментов в превращении фосфорилированных гексоз уменьшается. Активным конкурентом в превращении фосфорилированных гексоз является Г-6-ФДГ (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа). Это подробно будет рассмотрено ниже.

Гексозомонофосфатный шунт

Альтернативным путем превращения Г-6-Ф в тканях животных и растений является гексозомонофосфатный шунт. Метаболическое значение этого процесса заключается в обеспечении клетки такими важными продуктами, как фосфорилированными рибозами, эритрозами и восстановленными пиридиннуклеотидами, т.е. веществами, необходимыми для синтеза нуклеотидов, липидов и белков. В связи с этим гексозомонофосфатный шунт имеет большое значение в процессах липогенеза и гаметогенеза. Велика роль шунта и в адаптационных процессах. Г-6-ФДГ — первый фермент шунта относится к "адаптивным" ферментам, активность и синтез которых изменяются под влиянием таких факторов, как характер питания, действие гормонов, нервная импульсация. В течение последнего десятилетия выяснены многие специфические черты функционирования этого процесса у животных разного уровня организации и в тканях с различной функциональной активностью (Мильман, Юровицкий, 1973; Кудрявцева, 1980).

В данной главе мы не будем подробно рассматривать уровень активности и особенности функционирования Г-6-Ф шунта в тканях различных беспозвоночных. В исследованиях, проводимых нами, этот процесс представлял интерес, главным образом, с точки зрения конкурентных взаимоотношений между ним и процессом гликолиза.

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

В отношении общего уровня активности начальных ферментов шунта следует подчеркнуть, что у многих беспозвоночных обнаружена относительно высокая активность указанных ферментов и на основании этих данных было высказано предположение о существенном участии шунта в обмене углеводов (Вержбинская, Савина, 1971). Высокая активность Г-6-ФДГ, во много раз превышающая активность фермента в печени крысы (для которой характерна высокая интенсивность пентозофосфатного шунта), обнаружена в мышечной ткани разных видов пластинчатожаберных моллюсков: *Mytilus californianus* (Bennett, Nakada, 1968); *Mytilus edulis*; *Ostrea gigas* и *Ostrea edulis* (Gabbot, Head, 1980).

Во всех перечисленных выше работах отмечено, что высокая активность Г-6-ФДГ обеспечивает организм необходимым количеством восстановленного НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат), используемого для синтеза половых продуктов и для липогенеза.

Высокая активность Г-6-ФДГ и 6-ФДГ была обнаружена у всех исследованных нами форм. Определение активности Г-6-ФДГ у гидробионтов с различной экологией дало возможность проследить связь между степенью подвижности организма и уровнем активности фермента в мышцах (табл. 9). Особенно высокая активность ферментов характерна для таких прикрепленных организмов, как актинии, мидии, низшие ракообразные, асцидии. У высших ракообразных она в 5–10 раз ниже, чем у прикрепленных форм. Однако в литературе имеются сведения о повышении активности фермента в определенные периоды годового цикла у карбов, в частности перед линькой и размножением (McWhinnie, Kirchenberg, 1962).

Активность Г-6-ФДГ в различных тканях исследованных нами моллюсков *Mytilus galloprovincialis*, *Pecten ponticus* неодинакова. Наибольшая активность фермента обнаружена у *M. galloprovincialis*: в гонадах ($52,9 \pm 2,9$ нмоль/мг белка в минуту); в мышцах и гепатопанкреасе она одного порядка, но в 2 раза ниже, чем в гонадах ($24,9 \pm 1,5$ и $28,8 \pm 1,7$ нмоль/мг белка в минуту соответственно). У *Pecten*, как у мидий, распределение активности фермента в тканях следующее: для мышц, гепатопанкреаса, ресничного края мантии и для гонад соответственно составляет $17,6 \pm 32$; $29,2 \pm 36$; $80 \pm 2,4$ и $4,1 \pm 4$ нмоль/мг белка в минуту.

Отмеченное распределение активности фермента в тканях моллюсков отлично от высших позвоночных, у которых максимальная активность ферментов обнаружена в печени. Несмотря на то что в мышцах и гепатопанкреасе моллюсков активность фермента ниже, чем в гонадах, но и в этих тканях она значительно выше, чем в мышцах млекопитающих. Высокую активность Г-6-ФДГ в гонадах мидий можно объяснить интенсивным синтезом в этой ткани большого количества половых продуктов, метаболиты которых поставляются шунтом для синтеза нуклеиновых кислот.

Т а б л и ц а 9. Активность Г-6-ФДГ в тканях некоторых беспозвоночных и позвоночных животных

Объект исследования	нмоль/мг белка в минуту	Литературный источник
Кишечнополостные		
<i>Astria equina</i>	51,3 ± 2,6	Наши данные
Плстинчатожаберные		
моллюски		" "
<i>Mytilus galloprovincialis</i>		
мышцы	24,9 ± 1,5	
гонады	52,9 ± 2,9	
гепатопанкреас	28,8 ± 1,7	
<i>Mytilus californianus</i>	47,8 ± 4,8	Bennett, Nakada, 1968;
<i>Mytilus edulis</i> *		Gabbot, Head, 1980
пищеварительная железа	69 ± 20	
мантия	30 ± 9	
<i>Ostrea edulis</i> *		То же
пищеварительная железа	60	
мантия	80	
<i>Grassostrea gigas</i> *		"
пищеварительная железа	40	
мантия	30	
<i>Cardium edule</i>	22	Наши данные
<i>Pecten ponticus</i>		" "
гонады	41 ± 4	
мышцы	17,6 ± 3,2	
гепатопанкреас	29,2 ± 3,6	
ресничный край	80 ± 2,4	
<i>Pinna nobilis</i>	20	Вержбинская, 1972
Брюхоногие моллюски		
<i>Nassa reticulata</i>	36	Наши данные
<i>Murex truncularis</i>	25	Вержбинская, 1972
Головоногие моллюски		
<i>Eledona moshata</i>	69	То же
<i>Sepia officinalis</i>	17	"
<i>Octopus vulgaris</i>	22	"
Усоногие раки		
<i>Balanus improvisus</i>	100 ± 2	Наши данные
Десятиногие раки		
<i>Idotea baltica</i>	5	То же
<i>Crangon crangon</i>	4,4 ± 0,9	"
<i>Carcinus maenas</i>	4,6 ± 0,6	Boulton, Huggins, 1970
Оболочники		
<i>Ascidia intestinalis</i>	18,7 ± 2,2	Наши данные
Рыбы		
<i>Torpedo marmorata</i>	3	Вержбинская, 1972
Крыса	2,3 ± 1,1	Boulton, Huggins, 1970

* Активность фермента выражена в нмоль/мг Р в минуту.

В мышцах и гонадах мидий (другие ткани в этом плане не исследовались) активность Г-6-ФДГ изменяется в течение годового цикла. Наибольшая активность ($30 \pm 0,09$ нмоль/мг белка в минуту) фермента наблюдалась в период, предшествующий размножению, когда гонады находились в IV стадии зрелости (июль — август, январь — февраль), а наименьшая ($9,4 \pm 0,09$ нмоль/мг белка в минуту) отмечалась в период размножения (апрель, октябрь, ноябрь).

Аналогичные сезонные колебания активности Г-6-ФДГ отмечены в пищеварительной железе и мантии *Mytilus edulis* и *Ostrea edulis* (Gabbot, Head, 1980). По мнению этих авторов, повышение активности Г-6-ФДГ может быть частично связано с увеличением количества пищи и уровнем углеводов в тканях, что может привести к усилению синтеза фермента.

Роль пентозофосфатного шунта в углеводном обмене. Роль пентозофосфатного шунта в углеводном обмене мидий может быть оценена по интенсивности включения Г-6-Ф в процесс гликолиза и шунта. Относительная интенсивность включения Г-6-Ф в эти два процесса может быть прослежена по уровню активности ферментов, преобразующих это вещество: ГФИ (гексофосфоизомеразы), ФФК-фермента гликолиза и Г-6-ФДГ-фермента шунта (Вержбинская, 1972).

Сопоставление отношения активностей ФФК и Г-6-ФДГ к ГФИ и ФФК к Г-6-ФДГ дает возможность представить, как происходит в тканях распределение потока углеводов между этими двумя процессами. Данные, приведенные в табл. 10, показывают, что отношение ФФК к ГФИ у мидий, баланусов и крабов одинаково, отношение Г-6-ФДГ к ГФИ у исследованных видов последовательно снижается. Иная закономерность наблюдается в отношении показателя ФФК/Г-6-ФДГ. Этот показатель в ряду мидий — баланусы — крабы увеличивается.

Таким образом, рассмотренные отношения ферментов гликолиза и шунта свидетельствуют о том, что у различных гидробионтов возможность включения фосфорилированных моногексоз в эти процессы неодинакова. У организмов, ведущих неподвижный образ жизни, значительная часть фосфорилированных гексоз включается в глюкозо-6-фосфатный шунт. Это обеспечивает возможность синтеза большого количества гонадной ткани в преднерестовый период. Подтверждением этому является повышение активности Г-6-ФДГ в преднерестовый период у моллюсков и низших ракообразных (Шапиро, Бобкова, 1973; Бобкова, 1980).

Нами были исследованы некоторые кинетические характеристики Г-6-ФДГ. На высолонной и частично очищенной дегидрогеназе из гонад мидий показано, что зависимость активности фермента от концентрации Г-6-Ф подчиняется гиперболической зависимости. K_M , рассчитанная

Таблица 10. Отношение активности ферментов гликолиза и шунта в мышцах некоторых гидробионтов

Вид	ФФК/ГФИ	Г-6-ФДГ/ГФИ	ФФК/Г-6-ФДГ
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	0,050	0,080	0,57
<i>Balanus improvisus</i>	0,024	0,160	0,78
<i>Carcinus mediterraneus</i>	0,028	0,002	7,60

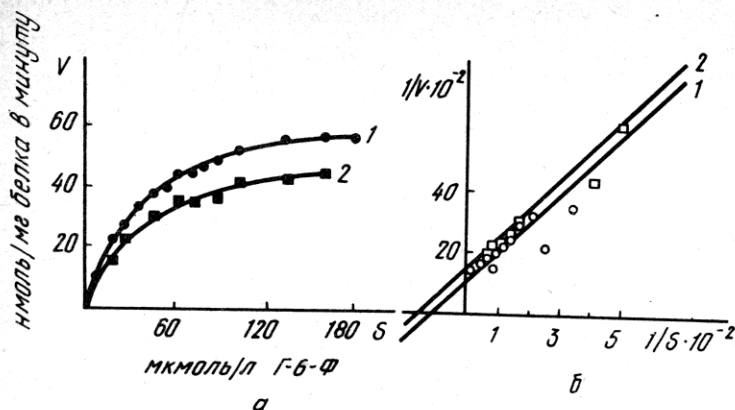


Рис. 7. Зависимость скорости реакции Г-6-ФДГ от концентрации Г-6-Ф (1) и Г-6-Ф+АТФ (2)

по методу Лайнуивера-Бэрка, для Г-6-Ф зависит от физиологического состояния мидий. В период, предшествующий размножению, и после него этот показатель соответственно равен $4,02 \cdot 10^{-5} \pm 0,23 \cdot 10^{-5}$ и $7,22 \cdot 10^{-5} \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$ М. Приведенные величины совпадают с K_M для печени крысы ($4 \cdot 10^{-5}$ М), эритроцитов крови человека ($3,9 \cdot 10^{-5}$ М) и *Escherichia coli* ($3,5 \cdot 10^{-5}$ М) (Кудрявцева, 1980). Таким образом, полученные нами K_M для Г-6-ФДГ идентичны данным, полученным для других животных. Это подтверждает мнение о том, что Г-6-ФДГ у разных животных существенно не отличается по своим молекулярно-кинетическим параметрам.

Как показали многие исследования, регуляция активности Г-6-ФДГ в клетке осуществляется НАДФ, в частности соотношением его окисленной и восстановленной форм и АТФ, который является аллостерическим отрицательным эффектором фермента.

Данных о регуляции Г-6-ФДГ и АТФ в тканях пластинчатожаберных моллюсков в литературе нет. Как показали наши исследования, АТФ ингибирует активность Г-6-ФДГ. Ингибитор не изменяет гиперболическую форму кривой субстратного насыщения, снижая максимальную скорость реакции при высоких концентрациях Г-6-Ф на 25% (рис. 7). Это ингибирование начинает проявляться только при концентрациях АТФ $0,003$ мкмоль/мл, что близко к физиологическим концентрациям. На основании этих данных можно предположить наличие регуляции фермента в условиях *in vivo*. У высших позвоночных обнаружено наличие нескольких изоэнзимов Г-6-ФДГ с различной чувствительностью к АТФ (Мильман, Юровицкий, 1973). Наши данные свидетельствуют о том, что ингибирование Г-6-ФДГ вызывают только высокие концентрации АТФ. На основании этого можно считать, что в молекуле Г-6-ФДГ мышц мидий преобладает изофермент со слабой чувствительностью к АТФ.

Центральное звено гликолиза

Вторая стадия процесса гликолиза характеризуется разрывом ФДФ альдозазой с образованием двух молекул триозофосфатов, равновесие между которыми осуществляется триозофосфатизомеразой. Дальнейшие превращения триозофосфатов зависят от относительной активности действующих на них дегидрогеназ, к которым относятся глицеринальдегид-3-ФДГ и α -глицерофосфатДГ. Глицеринальдегид-3-ФДГ окисляет глицеральдегид-3-фосфат до фосfogлицерата с одновременным превращением эквивалента НАД в НАДН. Диоксиацетонфосфат, подвергаясь действию α -глицерофосфатДГ, может превращаться в глицерол-3-фосфат; при этом происходит окисление эквивалента НАДН в НАД. В зависимости от относительной активности глицеринальдегид-3-фосфатДГ и α -глицерофосфатДГ поток триозофосфатов может включаться в гликолитический процесс или сместиться в направлении α -глицерофосфатного цикла (см. рис. 2).

Литературные данные об активности ферментов центрального звена гликолитической цепи для различных тканей моллюсков малочисленны (табл. 11). Это работы на мышечной и нервной тканях различных моллюсков (Вержбинская, 1972), на мышечной ткани *Mytilus californianus* (Bennett, Nakada, 1968) и на гепатопанкреасе *M. edulis* (Cameselle et al., 1980). В перечисленных работах авторы не пришли к единому мнению об уровне активности ферментов центрального звена процесса гликолиза. Н.А. Вержбинская считает, что у моллюсков как в мышечной, так и в нервной тканях глицеринальдегид-3-ФДГ является лимитирующим ферментом всего гликолитического процесса. Противоположные данные получены Р.Беннетом и Х.Накадой, которые показали, что глицеринальдегид-3-ФДГ не является лимитирующим звеном

Таблица 11. Активность глицеринальдегид-3-ФДГ в тканях беспозвоночных и позвоночных животных

Объект исследования	Активность глицеринальдегид-3-ФДГ, нмоль/мг белка ⁻¹ в мин ⁻¹	Литературный источник
<i>M. galloprovincialis</i>	120–600*	Данные авторов
<i>M. californianus</i>	39	Bennett, Nakada, 1968
<i>Pinna nobilis</i>	10	Вержбинская, 1972
<i>Murex trancularis</i>	10	То же
<i>Eledona moshata</i>	53	"
<i>Sepia officinalis</i>	18	"
<i>Octopus vulgaris</i>	25	"
<i>Crangon crangon</i>	787 ± 27	Boulton, Higgins, 1970
<i>Carcinus maenas</i>	3059 ± 27	То же
<i>Lepralia pallasiana</i>	26,8	Данные авторов
<i>Obelia loveni</i>	37,5	" "
<i>Torpedo marmorata</i>	865	Вержбинская, 1972
<i>Rattus</i>	8900 ± 163	Boulton, Higgins, 1970

* Весна — осень.

процесса, поскольку его активность не отличается от активности других ферментов гликолитической цепи. Большой интерес представляют исследования лимитирующих звеньев гликолитической цепи на основании относительных концентраций промежуточных продуктов гликолиза и идентификации неравновесных реакций путем измерения отношения действующих масс и максимальных активностей ферментов (Cameselle et al., 1980). В результате проведенных исследований авторы пришли к выводу, что глицеринальдегид-3-ФДГ не лимитирует общую интенсивность процесса гликолиза у моллюсков.

Нами на мышечной ткани мидий получены следующие показатели активности ферментов, действующих на триозофосфаты: активность глицеринальдегид-3-ФДГ составляет $120 \text{ нмоль/мг белка}^{-1} \text{ в мин}^{-1}$ в весенний период и $600 \text{ в осенний период}$; активность триозофосфат-изомеразы — $89,2 \pm 6,6$, фосфоглицераткиназы — $145 \pm 15 \text{ нмоль/мг белка}^{-1} \text{ в мин}^{-1}$. Полученные нами величины активности глицеринальдегид-3-ФДГ как в абсолютной, так и в относительной величине по отношению к другим ферментам гликолитической системы высоки и, очевидно, этот фермент не является лимитирующим звеном процесса в мышечной ткани *M. galloprovincialis*.

Активность α -глицерофосфатДГ в мышечной ткани мидий не обнаружена. Этим мышечная ткань мидий напоминает мышечную ткань высших позвоночных и отлична от тканей насекомых, у которых этот фермент чрезвычайно активен. На основании полученных данных можно предположить, что у моллюсков, как и у высших позвоночных, для окисления цитоплазматического НАДН служит малатоксалоацетатный цикл.

Конечные этапы гликолиза и сопряженных с ним реакций ЦТК

Наиболее существенные отличия в биохимической организации углеводного катаболизма моллюсков относятся к конечным этапам этого процесса. У мидий и других факультативных анаэробов отличия от классической схемы Эмбдена-Мейергофа проявляются на уровне ФЭП (фосфоэндопируват), который не только переходит в пируват, но способен также при определенных условиях карбоксилироваться ФЭПКК (фосфоэндопируваткарбоксикиназа) с образованием ЩУК (щавелевоуксусная кислота). Последний по обращенной части цикла Кребса преобразуется через малат и фумарат в сукцинат, что сопровождается энергетическими реакциями и имеет решающее значение для анаэробного существования моллюсков. В связи с этим особый интерес представляют механизмы, контролирующие направленность потока ФЭП в сторону пирувата или ЩУК при переходе с аэробного пути на анаэробный. Эти механизмы тесно связаны со свойствами ферментов, катализирующих эти реакции, — ПК (пируваткиназа) и ФЭПКК.

Свойства ПК и ФЭПКК хорошо изучены на двух видах моллюсков — *M. edulis* и *Crassostrea gigas* — и описаны в литературе (Zwaan et al., 1976; Хочачка, Сомеро, 1977).

Активность пируваткиназы. Пируваткиназа мускула-аддуктора изученных моллюсков обладает в отличие от классической формы мышеч-

ной ПК аллостерическими свойствами (Mustafa, Hochachka, 1971, 1973; Zwaan, 1973; Zwaan et al., 1975 a, b). Энзим проявляет кооперативную кинетику по отношению к субстрату ФЭП и аллостерически активируется ФДФ. Действие ФДФ на ПК характеризуется перестройкой кривой субстратного насыщения из сигмоидной формы в гиперболическую со снижением кажущейся K_M и коэффициента Хилла по отношению к ФЭП. Аллостерическая активация фермента субстратом относится к типу прямой положительной связи. Активация ПК и ФДФ является важным свойством в регуляции ее активности как в условиях гипоксии, так и при глюконеогенезе.

Положительными эффекторами ПК кроме ФДФ являются ионы Mg^{2+} ГДФ и OH^- , отрицательным — аланин и АТФ.

Сильное влияние на свойства ПК оказывает pH. Фермент имеет нейтральный pH-оптимум 7,4–7,8. При снижении pH до 7,0 и стабильном уровне активности резко ослабляется действие эффекторов. ПК меняет заряд и конформацию белка, снижает его чувствительность к ФДФ. Наряду с ионами H^+ ингибирующее действие на энзим оказывают АДФ и ионы Ca^{2+} .

Таким образом, активность ПК мышц мидий и устриц контролируется координированными изменениями внутриклеточной концентрации ионов водорода, ФЭП, ФДФ, АТФ, аланина, регулируя направление реакции расщепления ФЭП. Эти свойства присущи L-типу ПК печени, где преобладает глюконеогенез, и резко отличны от мышечной ПК (М-типа) большинства животных. Аллостерические свойства ПК обнаружены также у простейших и зародышей вьюна (Мильман, Юровицкий, 1973), а также в мышцах дельфинов (Storey, Hoch, 1974). Во всех случаях ПК регулируется ФЭП, АДФ и ФДФ. При этом показано, что у всех указанных видов основной путь метаболизма углеводов идет по цепи ФЭП $\rightarrow$ ЩУК $\rightarrow$ малат. Вероятно, у видов, способных утилизировать ФЭП через ФЭПКК в ЦТК (цикл трикарбоновых кислот), а не по пути гликолиза, мышечная ПК обладает аллостерическими свойствами.

Активность фосфоэнолпируваткарбоксикиназы. ФЭПКК у высших позвоночных является ферментом глюконеогенеза, участвующим в процессе образования ФЭП из ЩУК по обходному пути, поскольку прямая реакция пируват $\rightarrow$ ФЭП требует большой затраты энергии и в живом организме практически не осуществляется. Этот фермент обнаружен и хорошо изучен в печени млекопитающих и в дрожжах, где он имеет высокую активность. Донором фосфата в этой реакции служит ГТФ (гуанозинтрифосфат) или ИТФ (инозинтрифосфат). В мышцах млекопитающих ФЭПКК находится в незначительных количествах, поскольку глюконеогенез в них практически отсутствует.

В мускуле-аддукторе мидий и устриц ФЭПКК имеет необычно высокую активность, на 1–2 порядка превышающую активность этого фермента в мышцах других объектов и близкую к активности в печени млекопитающих (Zwaan et al., 1973). Данные о кинетических свойствах этого фермента показали, что он выполняет у моллюсков функции гликолитического характера, катализируя реакцию в направлении

Т а б л и ц а 12. Свойства ПК и ФЭПКК из мышцы устриц (Hochachka, Mustafa, 1972)

Показатель	ПК	ФЭПКК
pH-Оптимум	7,5–8,5	5,0–6,0
Ионы	Mg ²⁺ , Mn ²⁺	Zn ²⁺
Косубстраты	АДФ	ИДФ, ГДФ
Положительные эффекторы	ФДФ, OH ⁻	Аланин, H ⁺
ФДФ (восстановление)	+	—
Аланин (восстановление)	—	+
Отрицательные эффекторы	АТФ, аланин	ИТФ, ГТФ, OH ⁻

Т а б л и ц а 13. Энзимная кинетика ФЭПКК из мускула-аддуктора *Mytilus edulis* и *Crasostrea gigas* (Zwaan et al., 1976)

Показатель	<i>M. edulis</i>	<i>C. gigas</i>
Потребность в ионах	Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Mg ²⁺	Zn ²⁺ , Mn ²⁺
Эффект Ca ²⁺	Ингибитор	—
pH-Оптимум	6,0 (Zn ²⁺), 6,6 (Mn ²⁺)	5,1 (Zn ²⁺), 6,0 (Mn ²⁺)
K _М для ФЭП	0,2 (Zn ²⁺ , pH 6,6)	0,5 (pH 5,1), 0,2 (pH 6,0)
Эффект ИТФ	Конкурентный ингибитор	Конкурентный ингибитор
Положительный эффектор	H ⁺	H ⁺ , аланин
Восстановление аланином ингибирования ИТФ	—	+

ФЭП → ЩУК (Zwaan, de Marrewijk, 1973; Mustafa, Hochachka, 1973).

Основные свойства ФЭПКК мышц мидий и устриц противоположны свойствам ПК (табл. 12). Энзим имеет низкий pH-оптимум (5,1 – 6,6), активируется ионами H⁺ и аланином, ингибируется ионами OH⁻ и ИТФ.

Различия в кинетических свойствах ПК и ФЭПКК, а также тот факт, что оба фермента катализируют реакции, генерирующие высокоэнергетические связи (АТФ в случае ПК и ИТФ или ГТФ в случае ФЭПКК), привели к заключению, что ферменты не могут работать одновременно. Пути утилизации ФЭП меняются под влиянием таких специфических факторов, как уровень внутриклеточного pH и содержание аланина. Кислый оптимум pH для ФЭПКК свидетельствует о ее стержневой роли в утилизации ФЭП в период анаэробноза.

Свойства ФЭПКК мидий и устриц имеют некоторые различия в pH-оптимуме и активации металлами (табл. 13), что дает возможность предположить наличие видовой специфичности. Это предположение подтверждается исследованием свойств ФЭПКК у двух близких видов мидий *M. edulis* и *M. galloprovincialis*, различающихся по своей экологии. Первый живет в приливной зоне, где периодически подвергается воздействию фактора гипоксии, второй обитает в сублиторали.

Установлено, что специфическая активность ПК и ФЭПКК *M. galloprovincialis* ниже, чем *M. edulis*, причем отношение активности ФЭПКК

к ПК у последней в 3–5 раз выше (Vooys, 1980). ПК из мышцы *M. galloprovincialis* менее подвержена ингибирующему воздействию аланина и АТФ по сравнению с ПК *M. edulis*. Таким образом, уровень активности и кинетические свойства описанных ферментов отвечают особенностям обитания двух близких видов мидий, степени их адаптированности к условиям анаэробноз. Вероятно, уровень эндогенного аланина и рН ткани различаются у мидий в естественных местах обитания, что и сказалось на организации их энергетического обмена и на свойствах ПК и ФЭПКК. В результате этих различий *M. edulis* более приспособлена к переходу на анаэробный обмен, чем *M. galloprovincialis*. Приведенные данные являются ярким примером влияния экологических факторов на биохимические параметры, определяющие физиологический статус данного вида.

Активность лактатдегидрогеназы. Многими работами показано, что отличительной чертой организации последних стадий гликолиза в тканях моллюсков является низкое или практически полное отсутствие активности лактатДГ (лактатдегидрогеназа) (Вержбинская, Савина, 1971; Вержбинская, 1972; Hammen, 1975; Zwaan et al., 1975 *a, b*; Zwaan, Wijsman, 1976) (табл. 14). Отсутствие активности лактатДГ было показано в мышцах *Mytilus edulis*, *Ostrea gigas* (Хочачка, Сомеро, 1977).

Низкая, но проявляющаяся активность фермента обнаружена в мышце-аддукторе, ресничном крае и гепатопанкреасе *M. galloprovincialis* (Шапиро, Бобкова, 1973) и *M. californianus* (Bennett, Nakada, 1968). Более высокая активность фермента приведена для тканей *Mercenaria mercenaria* (Engel, Neat, 1970). Однако она была отмечена только в весенний период. В остальное время у этого моллюска, как и у других, активность фермента была низкой. Низкая лактатДГ обнаружена в мышцах брюхоногого моллюска *Nassa reticulata* (Шапиро, Бобкова, 1973). В отличие от пластинчатожаберных моллюсков, ведущих прикрепленный образ жизни, у свободных форм наблюдается более высокая активность фермента. Нами было установлено, что в мышце-аддукторе *Pecten* активность лактатДГ в 10 раз выше, чем у *M. galloprovincialis*.

Повышение активности фермента в мышцах морского гребешка по сравнению с мидиями, вероятно, связано с разной структурой мышц этих моллюсков. Мышца аддуктора *Mytilus* является преимущественно гладкой мышцей и служит для удержания створок раковины в сомкнутом состоянии. Аддуктор *Pecten* состоит из двух частей — небольшой гладкой, при помощи которой происходит смыкание створок раковины, и значительно большей поперечнополосатой, при помощи которой совершаются быстрые взмахи створок раковины, служащие для передвижения и очистки мантийной полости от посторонних частиц.

Вероятно, большую активность лактатДГ в аддукторе *Pecten* можно объяснить преобладанием поперечнополосатой мышцы, которая обеспечивает ее более высокую моторную активность. Относительно низкие активности лактатДГ обнаружены и у головоногих моллюсков — представителей высшего класса этого типа.

Т а б л и ц а 14. Активность конечных ферментов гликолиза в тканях некоторых беспозвоночных и рыб (нмоль/мг белка в минуту)

Объект исследования	ЛактатДГ	ПК	Литературный источник
Плстинчатожаберные моллюски			
<i>M. galloprovincialis</i>			
гонады	29 ± 2	170	Шапиро, Бобкова, 1973
гепатопанкреас	13 ± 4	65	То же
мышцы	54,5 ± 12	137,5 ± 22,5	"
<i>M. californianus</i>	83 ± 2	74 ± 13	Bennett, Nakada, 1968
<i>M. edulis</i>	0	20	Zwaan, Marrewijk, 1973
<i>Pecten ponticus</i>			
мышца замыкатель	186 ± 18,4		Шапиро, Бобкова, 1973
ресничный край мантии	59,8 ± 8,7		
гепатопанкреас	23,5 ± 5,5		То же
гонады	30,8 ± 4,6		"
<i>Cardium edulis</i>			
мышца замыкатель	42,6 ± 7,7		"
ресничный край	21,5 ± 4,2		"
<i>Pinna nobilis</i>	50	85	Вержбинская, 1972
Брюхоногие моллюски			
<i>Murex truncularis</i>	67	120	То же
<i>Nassa reticulata</i>	56,3 ± 8,3	57	Шапиро, Бобкова, 1973
Головоногие моллюски			
<i>Eledona moshata</i>	2	270	Вержбинская, 1972
<i>Sepia officinalis</i>	38	125	То же
<i>Octopus vulgaris</i>	50	100	"
Усоногие раки			
<i>Balanus improvisus</i>	258 ± 8,2		Шапиро, Бобкова, 1973
Десятиногие раки			
<i>Crangon crangon</i>	1116 ± 30		То же
<i>Carcinus mediterraneus</i>	843 ± 19		"
Рыбы			
<i>T. mortarata</i>			
красные мышечные волокна	450	190	Вержбинская, 1972

Таким образом, низкая активность лактатДГ характерна для всех представителей типа моллюсков, начиная от древних хитонов, прикрепленных пластинчатожаберных моллюсков и кончая высокоорганизованными головоногими моллюсками. По предположению Н.А. Вержбинской (1972), низкая активность лактатДГ у представителей всех классов моллюсков, как и других НАД — зависимых дегидрогеназ, наряду с низкой активностью дыхательной цепи (Вержбинская, Шапиро, 1968) сделала невозможным развитие сильной мышечной системы, работающей как движитель. Эволюция типа моллюсков пошла по направлению выработки реактивного типа движения, и лактатДГ по сравнению с другими ферментами гликолиза претерпела в эволюции более существенные изменения (Kaplan, Goodfriend, 1964).

Низкая активность лактатДГ в тканях моллюсков и других беспозвоночных может быть обусловлена незначительной концентрацией фер-

мента в тканях, слабой эффективностью и малой специфичностью ее действия (Kaplan, Goodfriend, 1964). Так, лактатДГ некоторых видов моллюсков функционирует как с НАД, так и с НАДФ. Для ракообразных самую высокую активность лактатДГ удалось получить с пиридин-производными аналогами НАД. Такая неспецифичность действия фермента обнаружена у многих беспозвоночных и низших позвоночных (Вержбинская, Шапиро, 1968).

Активность лактатДГ в тканях пластинчатожаберных моллюсков в отличие от лактатДГ высших животных ингибируется промежуточными продуктами цикла Кребса и некоторыми аминокислотами. В частности, 80%-ное ингибирование фермента наблюдалось под действием α -кетоглутарата, сукцината, аланина и глутамата (Doherty, Feltham, 1971). Авторы считают, что подавление активности лактатДГ субстратами цикла Кребса является результатом наличия обратной связи между активностью гликолитического процесса и циклом трикарбоновых кислот. Кроме того, отмеченное ингибирование можно рассматривать как один из механизмов, обеспечивающих подавление активности лактатДГ и усиленное образование в качестве одного из конечных продуктов гликолиза сукцината.

Активность малатдегидрогеназы. Относительно низкая активность лактатДГ в мышечной ткани моллюсков возмещается активностью фермента, способного окислять цитоплазматический НАДН. Таким ферментом является малатДГ (малатдегидрогеназа). Активность малатДГ исследована у различных моллюсков: пластинчатожаберных (прикрепленные и свободноживущие формы), брюхоногих (Шапиро, Бобкова, 1973) и головоногих (Вержбинская, 1972). Как показали исследования, активность ферментов у разных моллюсков довольно постоянна. По абсолютной активности малатДГ у моллюсков как чувствительных к недостатку кислорода, так и устойчивых к условиям гипоксии и аноксии отличается незначительно. Максимально обнаруженные различия составляют всего 2–2,5 раза.

Более существенные различия в активности фермента обнаруживаются у моллюсков при сопоставлении относительных активностей малатДГ и лактатДГ, т.е. двух ферментов, как указывалось выше, окисляющих цитоплазматический НАДН и поддерживающих цикличность функционирования центрального звена оксидоредукции гликолитического процесса — глицеринальдегид-3-ФДГ. При сопоставлении активностей этих ферментов оказалось, что между устойчивостью гидробионтов к условиям гипоксии и показателем малатДГ/лактатДГ существует прямая зависимость, т.е. чем выше этот показатель, тем выносливей организм к недостатку кислорода (табл. 15). Среди моллюсков это отношение оказалось минимальным в мышцах *Mizuchopecten jessoensis* — типичного аэроба, у которого снижение содержания кислорода в воде вызывало 80–85%-ную гибель молоди. Для моллюска *Placopecten magellanicus* эта величина также весьма значительна (Doherty, Feltham, 1971). У видов, живущих в хорошо аэрируемой воде, отношение малатДГ к лактатДГ ниже, чем у видов, живущих в среде с пониженным содержа-

Т а б л и ц а 15. Соотношение активностей малатДГ/лактатДГ
в тканях беспозвоночных

Объект исследования	МалатДГ/ лактатДГ	Литературный источник
<i>Mercenaria mercenaria</i>	110	Шапиро, Бобкова, 1973
<i>Spisula sachalinensis</i>	78	То же
<i>Mytilus grayanus</i>	75	"
<i>M. galloprovincialis</i>	56	"
<i>Glycymeris yessoensis</i>	43	"
<i>Mizuchopecten yessoensis</i>	11	"
<i>Placopecten magellanicus</i>	11	O'Doherty, Feltham, 1971
<i>Rangia cuneata</i>	104	Simpson, Awapara, 1966
<i>Crassostrea virginica</i>	210	То же
<i>Volsella demissus</i>	80	"
<i>Balanus improvisus</i>	5,6	Шапиро, Бобкова, 1973
<i>Carcinus mediterraneus</i>	1,9	То же
<i>Crangon crangon</i>	1,8	"

нием кислорода. Например, у *Glycymeris abdolineatus*, который обычно поселяется на участках с сильным движением воды, что всегда обеспечивает высокий приток кислорода, показатель отношения малатДГ/лактатДГ ниже, чем у других пластинчатожаберных моллюсков.

Самое высокое отношение малатДГ/лактатДГ обнаружено у прикрепленных малоподвижных форм пластинчатожаберных моллюсков *Mercenaria mercenaria*, *M. grayanus*, *M. galloprovincialis*, *Spisula sachalinensis*, проявляющих высокую выносливость к гипоксическим условиям. Аналогичная зависимость величины данного отношения от биологии вида показана на морских ежах (*Ellington, Lawrence, 1973*). Так, у морских ежей, зарывающихся в грунт, *Mellita quinquies perforata* и *Encore aberrans*, оно равно 150, тогда как у *Arbacia punctata*, живущих на поверхности грунта, этот показатель равен 60. У животных типа *Arthropoda* — балянусов, крабов, креветок и др. — абсолютные отношения малатДГ/лактатДГ ниже, чем в типе моллюсков. Об этом свидетельствуют как собственные, так и вычисленные на основании литературных данных числовые значения этого показателя (*Barnes, Blackstock, 1975*). Изменение отношения малатДГ/лактатДГ в сторону уменьшения у активных ракообразных связано с увеличением активности лактатДГ в их тканях.

Таким образом, между способностью организма к временному анаэробизму и величиной отношения малатДГ/лактатДГ существует прямая зависимость, т.е. чем величина отношения больше, тем большую выносливость проявляет организм к недостатку кислорода. Высокую активность малатДГ в цитоплазме пластинчатожаберных моллюсков, наряду с низкой активностью лактатДГ можно рассматривать как особенность биохимической организации углеводного обмена у этих животных.

Субклеточная локализация и кинетические характеристики малатдегидрогеназы. Одним из важных вопросов при исследовании особенностей функционирования и регуляции фермента, а также его роли в различных метаболических процессах является клеточная локализация

фермента. Известно, что малатДГ имеет двойную локализацию. Одна изоформа фермента растворена в цитозоле, другая ассоциирована со структурами мембран митохондрий. При двойной локализации фермента в митохондриальной фракции клетки позвоночных сосредоточено до 70% его активности и только 30% активности может быть отнесено к цитоплазме. МалатДГ цитоплазмы отличается от митохондриальной малатДГ электрофоретически, хроматографически и каталитически (Grimm, Doherty, 1961).

В цитоплазме и митохондриях моллюсков нами обнаружена активность малатДГ такая же, как и у высших животных. Однако в отличие от них более высокая активность фермента отмечается в цитоплазме. Такие данные были получены на мышечной ткани прикрепленного моллюска *Mytilus galloprovincialis*, в мантии *Rangia cuneata* (Chen, Awarara, 1969) и мышцах свободноживущего моллюска *Placopecten magellanicus* (Doherty, Felthem, 1971), у которых активность малатДГ в цитоплазме в 2 раза выше, чем в митохондриях. Такие же результаты получены для других беспозвоночных, в частности для ракообразных (*Balanus improvisus*, *Carcinus mediterraneus*, *Crangon crangon*) и полихет (*Neanthes arenaceodentata*) (Cripps Reish, 1973). Известно, что активность фермента в клеточных фракциях зависит от сезона. Наиболее резкое отличие активности обнаружено в летне-осенний период. В зимний период активность малатДГ в обеих фракциях практически одинакова. Таким образом, активность малатДГ в цитоплазме моллюсков такова, что этот фермент может брать на себя роль лактатДГ, окисляя цитоплазматический НАДН, поддерживая таким образом активность гликолитического процесса как аутокаталитической полиферментной системы.

Первые исследования по кинетике малатДГ, проведенные на бактериях и тканях позвоночных, появились в 60-е годы. На мышцах сердца быка (Grimm, Doherty, 1961) было показано, что зависимость скорости фермента (v) от концентрации субстрата (s) в основном подчиняется уравнению Михаэлиса—Ментена, т.е. гиперболической зависимости с коэффициентом K_M для ШУК $5,1 \cdot 10^{-5}$ и кофактора НАДН $3,8 \cdot 10^{-5}$ (табл. 16). Однако на бактериях был показан сложный характер зависимости активности фермента от концентрации субстрата и кофактора, подчеркивалась аллостерическая природа фермента (Ioshida et al., 1964).

Т а б л и ц а 16. Константы Михаэлиса (K_M) малатДГ в тканях разных животных

Объект исследования	K_M				Литературный источник
	малат	ШУК	НАД	НАДН	
Пропионовые бактерии	$9,0 \cdot 10^{-3}$	$6,0 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-5}$	Ioshida et al., 1964
Мышечная ткань устриц	—	$3,5 \cdot 10^{-5}$	—	$2,9 \cdot 10^{-5}$	Sarkissian, Gomolinski, 1976
Сердце быка	$5,4 \cdot 10^{-4}$	$5,1 \cdot 10^{-5}$	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^{-5}$	Grimm, Doherty, 1961

Получено, что K_M для прямой реакции малат → ЦУК и пропионовых бактерий равнялась $9,7 \cdot 10^{-3}$, что на порядок выше, чем у млекопитающих.

Кинетические свойства малатДГ у различных беспозвоночных и, в частности у пластинчатожабрных моллюсков, начали исследовать лишь в последнее время.

Сведения о K_M малатДГ получены для мышечной ткани устриц *Crassostrea virginica* (Sarkissian, Gomolinski, 1976) и мидий *Mytilus galloprovincialis* (Livingstone, 1976). Изоферментный спектр фермента исследован в тканях моллюска *Biophalarea glabrata* (Narang, Narang, 1974).

В перечисленных работах показано, что кинетические характеристики малатДГ определяются особенностью исследуемых тканей. В мышцах мидий и устриц обнаружена гиперболическая зависимость v от s с K_M по ЦУК и НАДН близкими для мышц позвоночных (см. табл. 16). Препараты фермента, выделенные из мантии мидий, лучше описывались S-образной зависимостью с коэффициентом Хилла 1,14. Особенно четко S-образная зависимость проявлялась по отношению к кофактору НАДН. Коэффициент Хилла для этого вещества равен 1,5. Появление S-образной зависимости на кривой субстратного насыщения повышает его чувствительность к изменению метаболитов внутренней среды, в данном случае к НАДН. Исходя из этого считают, что мышечная ткань мидий, для малатДГ которой характерна гиперболическая зависимость v от s , лучше адаптировалась к условиям гипоксии, чем ткань мантии (Livingstone, 1976).

При исследовании кинетики ферментов разные авторы сталкивались с большим разбросом экспериментальных данных. Единого мнения, за счет чего такой разброс наблюдается, нет. Так, Э. Корниш-Боуден (1979) считает, что получаемый разброс может быть обусловлен ошибками двух типов. Это либо ошибки измерения, либо ошибки, получаемые за счет неидентичности измеряемых образцов, в данном случае выделенного белка-фермента. Большинство авторов придерживаются второй точки зрения, подчеркивая, что выделяемый белок настолько разнокачествен, что объединение многих опытов не представляется возможным. Аналогичные результаты получены и в наших исследованиях.

В разных опытах нами была обнаружена различная активность малатДГ при сохранении единого характера кинетики фермента. В связи с этим

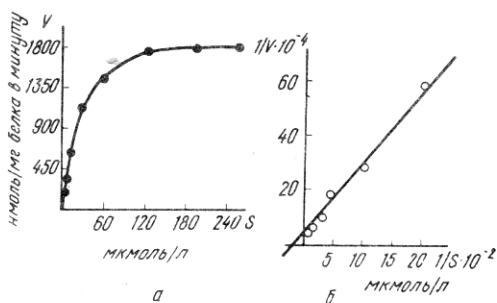


Рис. 8. Зависимость скорости реакции малатДГ (V , нмоль/мг¹ белка в минуту) от концентрации ЦУК (S , мкмоль/л) в координатах V от S (а) и $1/V$ от $1/S$ (б)

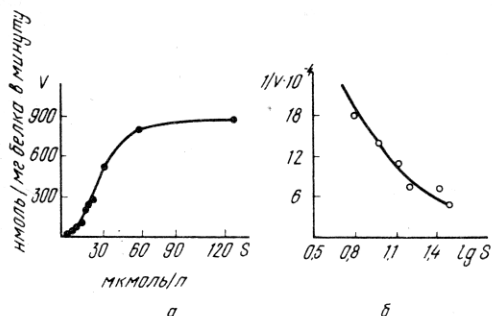


Рис. 9. Зависимость скорости реакции малатДГ (V) от концентрации ЩУК (S) в координатах V от S (а) и 1/V от 1/S (б)

рата (s) может иметь как гиперболическую, так и сигмоидную зависимость. В апреле, т.е. в период после размножения мидий, v от s по ЩУК имеет гиперболическую зависимость с K_M по ЩУК $4,6 \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$ (рис. 8). Такое же K_M отмечено для фермента в летний период (август), что соответствует K_M по ЩУК для тканей млекопитающих. В осенний период (сентябрь), период подготовки к осеннему размножению, кривая зависимости v от s имеет S-образный характер (рис. 9). Коэффициент Хилла для малатДГ в этом случае равен $1,4 \pm 0,2$. Иногда на кривой зависимости v от s наблюдаются две точки перегиба и промежуточное плато. Эта кривая напоминает зависимость, полученную для пируваткиназы мышц королевского краба (Somero, 1969). Д.Н. Сомеро интерпретировал этот результат как одновременное присутствие в ферменте двух взаимопревращающихся форм, одна из которых характеризуется гиперболической зависимостью v от s , а другая — сигмоидной. Наложение этих двух кривых дает сложную форму зависимости v от s . Однако существует и другая точка зрения, т.е. появление промежуточных плато на кривой зависимости v от s может свидетельствовать о наличии в системе нескольких форм аллостерических ферментов, характеризующихся различной степенью кооперативности по субстрату или относительно медленной изомеризацией фермента.

Исследование работы фермента в прямом направлении, т.е. в направлении окисления малата в щавелевоуксусную кислоту, показало, что реакция в направлении малат $\rightarrow$ ЩУК не работает. Этим малатДГ цитоплазмы моллюсков отличается от малатДГ цитоплазмы высших позвоночных. Известно, что у малатДГ, выделенной из сердечной мышцы быка, наблюдается функционирование фермента в обоих направлениях. Однако при работе фермента в обратном направлении его сродство к субстрату и кофактору на порядок выше, чем в прямом, что способствует более легкому течению реакции в обратном направлении. Можно предположить, что работа малатДГ в тканях мидий в направлении ЩУК $\rightarrow$ малат (в обратном) обеспечивает функционирование цепи ФЭП $\rightarrow$ ЩУК толь-

объединение всех экспериментов не представлялось возможным, и в данном разделе приведены графики, которые представляют группы близких опытов. Такое рассмотрение экспериментального материала позволило установить, что выделенный нами из мышц аддуктора мидий при насыщении 40–70% препарат малатДГ в разные сезоны неоднороден. Кривая зависимости скорости реакции (v) от концентрации субст-

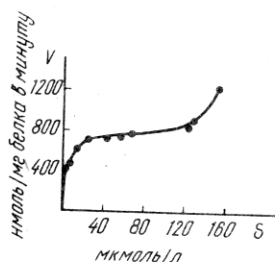


Рис. 10. Зависимость скорости реакции малатДГ (V) от концентрации НАДН (S). Концентрация ЦУК — 33 мкмоль, pH 7,6

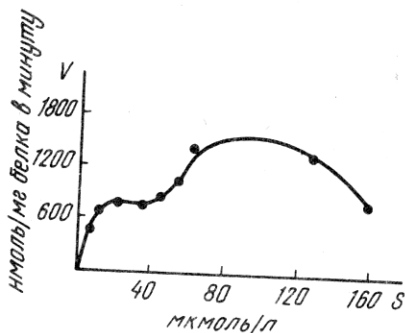


Рис. 11. Зависимость скорости реакции малатДГ (V) от концентрации НАДН (S). Концентрация ЦУК — 33 мкмоль, pH 6,2

ко в направлении образования сукцината, энергетическое преимущество которого уже неоднократно отмечалось (Кондрашова и др., 1973; Горомосова и др., 1975).

Зависимость активности фермента от концентрации НАДН была рассмотрена в инкубационных средах при трех концентрациях ЦУК — 33, 66, 264 мкмоль. Такая постановка эксперимента показала, что характер зависимости скорости реакции от концентрации кофактора НАДН определяется концентрацией ЦУК. При концентрации ЦУК 33 мкмоль зависимость v от s (НАДН) описывалась сложной кривой с коэффициентом Хилла 1,7 (рис. 10). При снижении pH инкубационной среды до 6,2 кривая зависимости скорости реакции от концентрации кофактора имеет сложный вид с двумя точками перегиба (рис. 11). С увеличением концентрации ЦУК в среде до 264 мкмоль кривая приобретает гиперболический характер с K_M для НАДН, равной $2,4 \cdot 10^{-5}$ (рис. 12).

Концентрация НАДН, вызывающая ингибирование активности фермента, определялась pH инкубационной среды. При pH 7,8 ингибирование наступало в области концентраций НАДН 160 мкмоль. В среде, где pH равна 6,2, аналогичные концентрации НАДН не вызывали снижения активности фермента.

Содержание НАДН в мышечной ткани моллюсков, по нашим данным, составляет 41 нмоль/г влажной массы, и отношение восстановленной формы НАДН к окисленной равно 1,6, в то время как аналогичное отношение для тканей крыс значительно ниже. Повышенный уровень концентрации НАДН в тканях мидий, очевидно, выработал устойчивость малатДГ к восстановленной форме НАД в клетке.

Таким образом, в препарате малатДГ цитоплазмы мышечной ткани мидий обнаружены две формы фермента, которые обладают различными свойствами: одна — сигмоидной зависимостью скорости реакции от концентрации субстрата, другая — гиперболической. В связи с тем что обе формы обладают различной чувствительностью к изменению содержания субстратов и кофакторов, наличие в препарате двух форм фер-

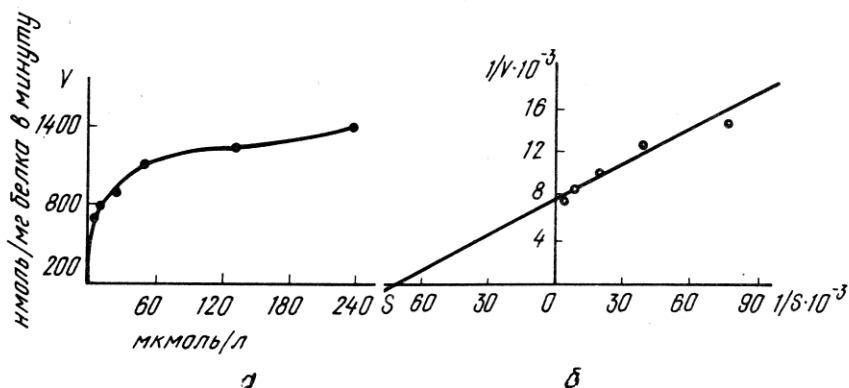


Рис. 12. Зависимость скорости реакции малаТДГ (v) от концентрации НАДН при концентрации ЩУК 264 мкмоль в координатах V от S (а) и $1/V$ от $1/S$ (б)

ментов обеспечивает лабильность его функционирования при изменении метаболического фона клетки.

Регуляция активности малаТДГ адениннуклеотидами и некоторыми метаболитами. Известные нам сведения о механизмах регуляции активности малаТДГ относятся к тканям позвоночных. Подобные исследования на беспозвоночных не проводились. Учитывая важную роль малаТДГ в метаболизме пластинчатожаберных моллюсков, нами исследовано влияние некоторых метаболитов-регуляторов на активность этого фермента.

Как мы уже отмечали, существует много методов изучения регуляции активности ферментов (Корниш-Боуден, 1979). Одним из основных методов исследования взаимодействия ферментов и метаболитов является кинетический. При кинетическом методе влияние ингибиторов и активаторов изучается в широком интервале концентраций субстратов и кофакторов. Только при таком подходе к изучению ферментов можно показать характер воздействия метаболита-регулятора на активность фермента и многие другие кинетические характеристики взаимодействия.

На необходимость такой постановки эксперимента указывает Корниш-Боуден (1979), который считает, что действие регулирующих веществ в инкубационной среде может быть различным в зависимости от концентрации субстратов. Например, конкурентные ингибиторы оказывают наибольшее влияние при низких концентрациях субстрата и что наблюдения, проведенные исключительно при высоких концентрациях субстрата, часто не позволяют оценить константу ингибирования, сколько бы велико ни было число измерений.

Влияние адениннуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ) на активность малаТДГ изучалось при pH 7,6. Физиологические значения pH были выбраны в связи с тем, что, несмотря на то что максимум активности фермента

проявляется в щелочной области при pH 8, наибольшая его чувствительность к активаторам и ингибиторам проявляется при более физиологических pH (Livingstone, 1976). Аналогичные данные получены и для других ферментов. Особенно тщательно этот вопрос разработан на ФФК мышечной ткани краба (Freed, 1971). Для этого фермента показано, что одна и та же степень ингибирования достигается при pH 6,2 600-кратным увеличением концентрации АТФ по сравнению с pH 7,2. Многократно усиливающийся эффект ингибирования Г-6-ФДГ АТФ при изменении pH среды до физиологического уровня был отмечен на препаратах фермента, выделенного из зародышей вьюна (Мильман, Юровицкий, 1973).

Нами исследовано влияние адениннуклеотидов АТФ, АДФ и АМФ, а также метаболитов — фумарата, сукцината, кетоглутарата и аланина на активность малаТДГ мидий при различных концентрациях ЩУК в инкубационной среде.

Обнаружено, что концентрация АТФ 0,03 мкмоль/мл инкубационной среды незначительно снижали активность малаТДГ при низких концентрациях ЩУК — до 3 мкмоль; 0,3 мкмоль/мл АТФ действуют в области концентрации ЩУК до 10 мкмоль. С увеличением концентрации АТФ до 0,7 мкмоль/мл ингибирующий эффект проявляется до 16 мкМ ЩУК. 3 и 7 мкмоль/мл АТФ вызвали ингибирование фермента при всех исследованных концентрациях ЩУК (рис. 13).

Ингибирующий эффект АДФ на малаТДГ в отличие от АТФ усиливался с увеличением ЩУК в среде. Уровень ЩУК, при котором отмечалось ингибирование фермента, зависел от концентрации АДФ. При 1,5 мкмоль/мл АДФ снижение активности малаТДГ было обнаружено при концентрации ЩУК 16,5 мкмоль. С увеличением концентрации АДФ в 2 раза степень ингибирования фермента возрастала и проявлялась при более низкой концентрации ЩУК — 6,6 мкмоль (рис. 14).

Действие метаболитов (фумарата, сукцината, α -кетоглутарата и аланина) на активность малаТДГ определялось их природой и концентрацией, а также содержанием ЩУК в среде. Как и для АДФ, ингибирующий

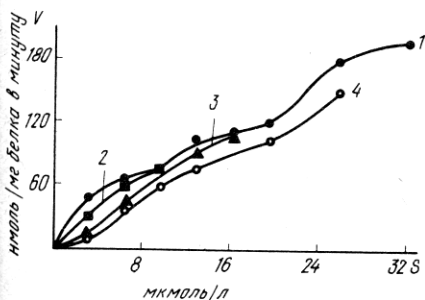


Рис. 13. Зависимость скорости реакции малаТДГ от концентрации ЩУК при действии АТФ (мкмоль в 1 мл):

1 — контроль; 2 — 0,03; 3 — 0,3; 4 — 3

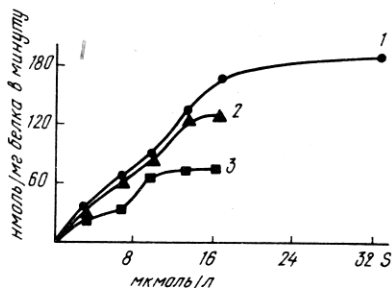


Рис. 14. Зависимость скорости реакции малаТДГ от концентрации ЩУК при действии АДФ (мкмоль в 1 мл):

1 — контроль; 2 — 1,5; 3 — 3

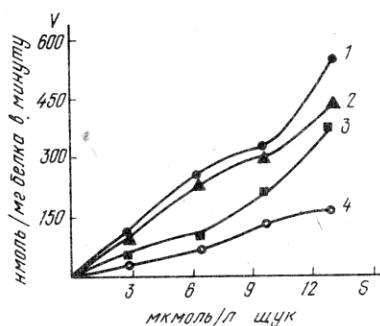


Рис. 15. Зависимость скорости реакции малатДГ от концентрации фумарата (мкмоль в 1 мл):

1 — контроль; 2 — 2,5; 3 — 8; 4 — 10

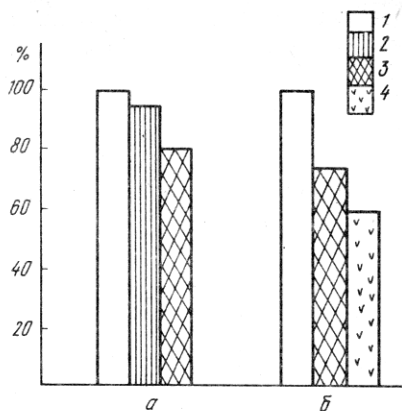


Рис. 16. Влияние α -кетоглутарата и аланина на активность малатДГ. Концентрация ЩУК в пробе, мкмоль:

а — 13; б — 330; 1 — контроль; 2 — концентрация аланина 7 мкмоль в 1 мл; 3 — концентрация аланина 3 мкмоль в 1 мл; 4 — концентрация α -кетоглутарата 2 мкмоль в 1 мл

эффект этих веществ усиливался с увеличением концентрации ЩУК. Такие результаты были получены при исследовании 2, 5, 8 и 10 мкмоль/мл фумарата в инкубационных средах с концентрацией ЩУК от 3,3 до 13,4 мкМ (рис. 15), а также 2 мкмоль/мл α -кетоглутарата и 3 и 7 мкмоль/мл аланина при двух концентрациях ЩУК (13 и 330 мкмоль) (рис. 16).

На основании полученных данных можно предположить, что в условиях *in vivo* регулятором активности малатДГ могут быть АТФ и АДФ, поскольку как концентрации этих веществ, так и области концентраций ЩУК, в которых проявляется их действие, близки к физиологическим.

Таким образом, на основании полученных нами данных можно сделать некоторые заключения как относительно механизмов функционирования малатДГ, так и методических подходов к исследованию такого рода. Во-первых, при исследовании влияния каких-либо веществ на активность малатДГ эксперимент следует проводить в широком диапазоне концентраций субстрата, так как действие веществ-регуляторов в большей степени определяется концентрацией субстрата. Во-вторых, малатДГ цитоплазмы мышечной ткани мидий является регулируемым ферментом. Ее активность регулируется субстратами, кофакторами реакции, АТФ и АДФ.

Рассмотренные свойства ферментов гликолиза у мидий позволяют представить особенности его функционирования в экстенсивных условиях. Выявлены общие для малоподвижных видов показатели оксифильности, что имеет значение для оценки их выживаемости.

ГЛАВА 3. КЛЮЧЕВЫЕ ФЕРМЕНТЫ ГЛИКОГЕНЕЗА И ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА

Высокое содержание гликогена в тканях двусторчатых моллюсков и его важное значение в процессах обмена хорошо известны. Особенно велика роль этого полисахарида в энергетическом обмене в тех случаях, когда моллюски переходят на анаэробное дыхание, так как в этих условиях он является основным субстратом обмена, поставляющим энергию. В связи с этим представляет интерес вопрос о регуляции скорости синтеза гликогена в тканях мидий.

Синтез гликогена или гликогенез осуществляется с помощью фермента ГС (гликогенсинтетазы) из глюкозы путем переноса гликозильных остатков на молекулу гликогена. Глюкоза в свою очередь синтезируется из неуглеводных предшественников в процессе глюконеогенеза. Глюконеогенез — упорядоченный процесс, регуляторные системы которого тесно связаны с ЦТК, гликолизом, окислением жирных кислот. Интеграция обеспечивается рядом химических, структурных и генетических факторов (Юровицкий, Ермолаева, Мильман, 1976).

Синтез глюкозы в тканях животных протекает в условиях высокой скорости ресинтеза АТФ, т.е. при высоком энергетическом заряде. К ферментам глюконеогенеза относятся пируваткарбоксилаза, пируваткарбоксикиназа, ФЭПКК и ФДФаза (фруктозодифосфатаза). Активность первых двух ферментов в тканях мидий ничтожно мала, о свойствах ФЭПКК было сказано выше. В настоящей главе остановимся на свойствах и уровне активности ключевых ферментов гликогенеза и глюконеогенеза: ГС и ФДФазе.

Активность гликогенсинтетазы. Интенсивное использование моллюсками гликогена в качестве основного энергетического субстрата предполагает и активный его биосинтез. Основным ферментом, катализирующим гликогенез или синтез гликогена, является гликогенсинтетаза. Фермент имеет две формы: активную, независимую от Г-6-Ф J-форму и зависимую D-форму, которая активируется высокими концентрациями Г-6-Ф. Синтез гликогена осуществляется путем переноса на его молекулу глюкозильных остатков с УДФГ (уридиндифосфатглюкоза).

Активность и свойства ГСазы (гликогенсинтетазы) хорошо изучены на холоднокровных и теплокровных позвоночных животных (Danforth, 1965; Розенфельд, 1969; Goto, 1971; Sevall, Kim, 1971; Юровицкий, Мильман, 1974).

Регулирующие свойства ГСазы в процессе синтеза гликогена описаны в литературе (Е.Л. Розенфельд, 1969). Переход зависимой D-формы в независимую J-форму осуществляется с помощью специфической фосфатазы путем дефосфорилирования. Фосфорилирование J-формы и переход ее в D-форму происходит с помощью киназы, при этом утилизируется макроэргическая связь АТФ. Для гликогенфосфорилазы фосфорилирование, наоборот, приводит к активации фермента. В этих особенностях заложены, по-видимому, важные условия регуляции процессов гликолиза и глюконеогенеза. Однако системы киназ и фосфатаз для фосфорилазы и синтетазы различны. Роль Г-6-Ф в реакции синтеза гликогена заключается в снижении K_M для обеих форм синтетаз, при

этом смещается рН-оптимум от 7,6 до 8,5. Очевидно, Г-6-Ф является аллостерическим активатором ГСазы.

Гликоген тормозит действие фосфатазы и ГСазы, тем самым регулирует свой собственный синтез по принципу отрицательной обратной связи. Снижение содержания гликогена в эксперименте сопровождается повышением активности гликогэнсинтетазы J.

Показан механизм активации синтеза гликогена инсулином, введение которого повышает активность J-формы за счет перехода в нее D-формы. Адреналин снижает активность обеих форм синтетазы и повышает активность фосфорилазы α . Активация ГСазы гормонами проводилась на печени и мышцах рыб, на печени лягушек (Sevall, Kim, 1971).

Свойства ГСазы печени, белых и красных мышц рыб мало отличаются от свойств этого фермента у теплокровных животных. Однако у головастиков и у зародышей вьюна ГСаза обнаружена только в неактивной D-форме (Sevall, Kim, 1971; Мильман, Юровицкий, 1973). Найдены различия в природе ингибирования АТФ — при действии инсулина ингибирование снижается.

Наличие ГСазы обнаружено в тканях ракообразных и моллюсков (Wang a. Scheer, 1963), уровень ее активности схож с таковой у рыб и амфибий. Авторы нашли, что энзим активируется Г-6-Ф и ингибируется экстрактом глазных стебельков краба, что, возможно, связано с наличием в них гормона типа адреналина. Установлена активация ГСазы в мышцах черноморских мидий и пектена и повышение содержания гликогена при введении инсулина (Плисецкая, Солтицкая, Лейбсон, 1979).

По имеющимся данным, уровень активности ГСазы в тканях исследованных беспозвоночных несколько ниже, чем у высших позвоночных, и такой же, как у земноводных (Wang a. Scheer, 1963).

В работе, выполненной на нескольких видах *Nereis*, показана корреляция между содержанием гликогена, уровнем активности J-формы фермента и способностью данного вида выживать в бескислородных условиях (Augenfeld, 1978). Нами на мидиях изучена активность фермента в отдельных тканях и прослежена его сезонная динамика. Позднее фермент был получен в чистом виде, что дало возможность определить

Т а б л и ц а 17. Активность гликогэнсинтетазы в тканях беспозвоночных (мкмоль превращенного субстрата/мг белка в минуту)

Объект исследования	Мышцы		Гепатопанкреас		Жабры		Гонады	
	J*	J + D**	J	J + D	J	J + D	J	J + D
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	0,013	0,029	0,009	0,021	0,014	0,026	0,008	0,028
<i>Carcinus maenas</i>	0,028	0,055	0,005	0,009	0,016	0,037	—	—
<i>Balanus improvisus</i>	0,028	0,043	—	—	—	—	0,004	0,029

* Активная форма фермента.

** Общая активность.

некоторые его кинетические характеристики (Cook, Gabbot, 1978). Среднегодовые значения активности ГСазы представлены в табл. 17. Как видно из таблицы, уровень активности ГС в тканях мидий выражается величинами одного порядка и близок к активности этого фермента у краба и баянуса. Только в мышцах мидий активность ГС в 2 раза ниже, чем в мышцах раков, что, вероятно, связано с их меньшей функциональной нагрузкой. Уровень активности фермента во всех тканях мидий выражается величинами одного порядка, хотя в жабрах и мышцах он несколько ниже, чем в гепатопанкреасе и гонадах. Обнаружены обе формы фермента J и D (независимая и зависимая), причем соотношение их различается по сезонам. В среднем независимая J-форма составляет 20–40% общей активности фермента. Приведенные данные близки к данным, полученным на мантии и мускуле-аддукторе *M. edulis* (Cook, Gabbot, 1978) (0,008–0,016 ед/мг белка), хотя авторы дают более низкий процент J-формы ГСазы (2–2,6%), и на полихетах (Augenfeld, 1978). K_M ГСазы мидий для УДФГ составляет 0,32 ммоль для D-формы и 2,8 ммоль – для J-формы. K_M для Г-6-Ф равна 0,76 ммоль (Cook, Gabbot, 1978).

Активность и кинетические свойства фруктозодифосфатазы. Фермент ФДФаза (фруктозодифосфатаза) является ключевым ферментом глюконеогенеза, он осуществляет необратимый гидролиз ФДФ. Конкурентные функции ФДФазы и ФФК определяют направленность потока углерода в сторону гликолиза или глюконеогенеза, контролируя таким образом круговорот внутриклеточного метаболизма. В связи с важными функциями ФДФазы в регуляции глюконеогенеза этот фермент достаточно хорошо исследован на печени и мышцах теплокровных (Taketa, Rogell, 1963; Krebs, Woodford, 1965) и у целого ряда пойкилотермных животных (Behrlich, 1975; Behrlich, Hochachka, 1969; Мильман, Юровицкий, 1973; Behrlich, Jonson, 1974 и др.).

Основным регулирующим фактором ФДФазы млекопитающих является концентрация субстрата и отрицательного модулятора АМФ (Taketa, Rogell, 1963). Изучение работы ФДФазы в тканях рыб, ракообразных и головоногих моллюсков выявило целый ряд дополнительных механизмов, меняющих уровень активности фермента. Показано, что кинетические свойства ФДФазы пойкилотермов отличаются более сложной и многообразной регуляцией активности, связанной с температурным фактором (Behrlich, Hochachka, 1969; Behrlich, Jonson, 1974).

При холодной акклимации мышц пектена ингибирующий эффект АМФ на ФДФазу понижается в 5 раз (O'Doherty, Feltham, 1971).

Авторы считают, что это является механизмом метаболического контроля глюконеогенеза. Изучение активности и свойств ФДФазы у моллюсков представляет интерес в связи с тем, что эти объекты отличаются низкой энергетической вооруженностью и высоким уровнем АМФ – основного ингибитора фермента, с одной стороны, и высоким уровнем пирилата – с другой.

Нами были изучены некоторые кинетические свойства ФДФазы мышц и печени мидий и уровень ее активности во всех тканях мидий.

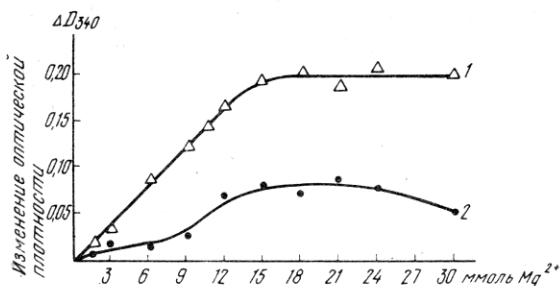


Рис. 17. Скорость ФДФазной реакции в печени (1) и мышцах (2) мидий как функция концентрации магния

Рис. 18. Влияние ионов калия (1) и натрия (2) на активность ФДФазы печени мидий

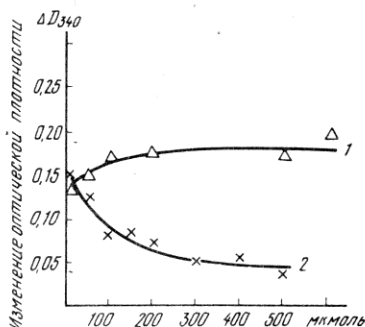
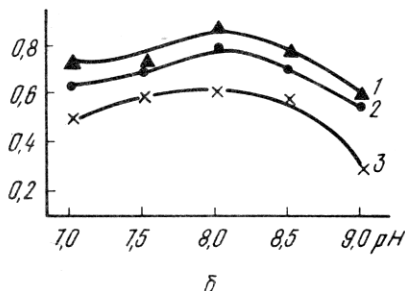
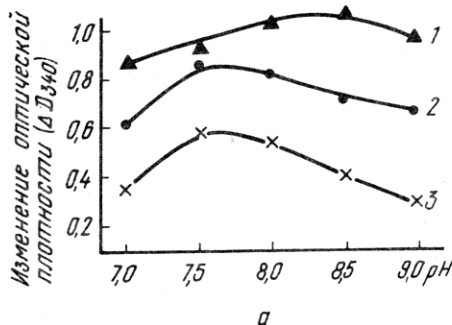


Рис. 19. Кривые pH-зависимости ФДФазы мышц (а) и печени (б) мидий при температурах, °С:
1 — 25; 2 — 15; 3 — 7



ФДФаза мидий проявляет абсолютную зависимость от ионов Mg^{2+} , причем максимальная активность наблюдается в пределах концентраций 15–18 ммоль (рис. 17). Кривая насыщения ФДФазы печени магнием напоминает по форме гиперболу, тогда как в мышцах имеет сигмоидный характер. При расчетах этих данных методом двойных обратных величин оказалось, что ФДФаза мышц при низких концентрациях магния проявляет отрицательную кооперативность, а при насыщающих — положительную.

ФДФаза исследуемых тканей мидий по-разному реагирует на содержание моновалентных катионов в инкубационной среде. Влияние ионов калия и натрия на фермент печени противоположно (рис. 18). Физиологические

Таблица 18. Энергия активации ФДФазы тканей мидий, ккал/моль

Температурный диапазон, °C	Мышцы	Печень
5-15	$7,81 \pm 0,82$	$6,03 \pm 0,57$
15-25	$2,22 \pm 0,30$	$7,61 \pm 0,93$
25-35	$1,92 \pm 0,17$	$2,83 \pm 0,24$

концентрации K^+ (50–100 ммоль) активируют ФДФазу из печени. При повышении концентрации ионов калия до 600 ммоль ее активность не изменяется. Ионы натрия угнетают активность ФДФазы печени при концентрации 100 ммоль на 50%, а 300 ммоль – на 70%. В мышечной ткани активирующее действие на фермент оказывает только 50 ммоль K^+ , более высокое содержание калия, например 100–300 ммоль, угнетает скорость реакции на 20–30%. Влияние ионов калия на сродство фермента к субстрату и ингибитору будет описано ниже.

Каталитическая активность ФДФазы мидий слабо регулируется ионами водорода. Кривые зависимости уровня активности от pH сглажены (рис. 19). Оптимум pH для фермента из обеих тканей лежит в области значений 7,5–8,5. Добавление в инкубационную среду ионов калия не меняет pH-оптимума. Температура также оказывает относительно слабое влияние на положение pH-оптимума, лишь мышечная ФДФаза при низких температурах способна уменьшить величину pH-оптимума, а при высоких температурах – увеличить.

Зависимость скорости ФДФазной реакции от температуры незначительна (табл. 18). Энергия активации мышечной ФДФазы максимальна в диапазоне температур 5–15°C и составляет 7,8 ккал/моль. Наиболее низкие энергии активации в мышцах и печени наблюдаются в интервале температур 25–35°C.

Для фермента мышц и печени мидий кривая Аррениуса нелинейна, как это характерно для большинства ФДФаз пойкилотермов (рис. 20).

ФДФаза мышц и печени мидий проявляет сигмоидную кинетику по отношению к ФДФ (рис. 21). Примерный уровень кажущейся $S_{0,5}$, рассчитанный по графику зависимости v от s , составляет для мышц $4 \cdot 10^{-5}$ моль и печени $6 \cdot 10^{-5}$ моль. Эти величины близки физиологическим концентрациям ФДФ в тканях мидий. По нашим данным, в мышцах мидий $7-12 \cdot 10^{-5}$ моль ФДФ. Ионы калия в концентрации 100 ммоль не изменяют форму кривой, но снижают максимальную скорость ферментативной реакции в мышцах, повышая при этом сродство к субстрату в 2 раза. При этом наблюдается активация ферментативной реакции ионами калия в области низких концентраций ФДФ около 20–60 мкмоль. Аналогичное влияние оказывают ионы калия на ФДФазу арктического краба (Hochachka, 1972; Behrisch, Jonson, 1974). Кроме того, в присутствии ионов калия насыщение фермента субстратом происходит быстрее почти в 2 раза. Повышение концентраций ФДФ до 3 ммоль практически не ингибирует активность мышечной ФДФазы, однако наблюдается снижение уровня активности ФДФазы печени примерно на 30% при концентрациях субстрата $3-5 \cdot 10^{-4}$ моль. Сигмоидный характер кривых суб-

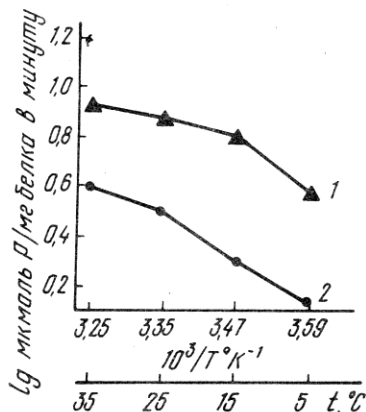
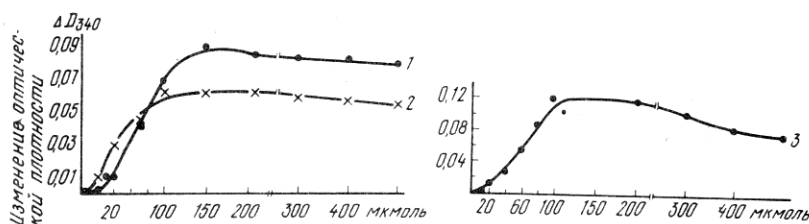


Рис. 20. Кривая Аррениуса для ФДФазы мышц (1) и печени (2) мидий

Рис. 21. Зависимость скорости реакции ФДФазы в мышцах и печени мидий от концентрата ФДФ:

1 — мышцы; 2 — мышцы (100 ммоль калия); 3 — печень



стратного насыщения и положительную кооперативность подтверждают экспериментальные данные, рассчитанные в координатах Лайнуивера—Бэрка, и коэффициенты Хилла. Для ФДФазы мышц в присутствии ионов калия коэффициент равен 2,56, без них он равен 2,29. Рассчитанный по кривой субстратного насыщения ФДФазы печени мидий коэффициент Хилла составляет 0,63 для начального ее участка и возрастает до 2,65 при концентрациях ФДФ в интервале 60–200 мкмоль. Это свидетельствует об усилении положительных кооперативных свойств фермента печени при насыщении его субстратом.

Низка чувствительность фермента к основному его ингибитору АМФ. Кривая ингибирования ФДФазы мышц и печени мидий имеет сложную форму с двумя точками перегиба, которые более четко выражены в печени (рис. 22). После первоначального снижения уровня активности при концентрациях АМФ 1–4 мкмоль на 30–50% наблюдается повышение активности почти до первоначального уровня в диапазоне концентраций АМФ 6–10 мкмоль. Последующее увеличение содержания АМФ (100–200 мкмоль) вызывает ингибирование фермента на 50%, 1 ммоль АМФ — на 70%. Полной инактивации фермента мы не наблюдали. Добавление ионов калия в инкубационную среду усиливает ингибирующий эффект АМФ на ФДФазу обеих тканей, увеличивая при этом отрицательную кооперативность. Аналогичное действие, увеличение инактивации фермента аденозинмонофосфатом, оказывает изменение рН инкубационной среды.

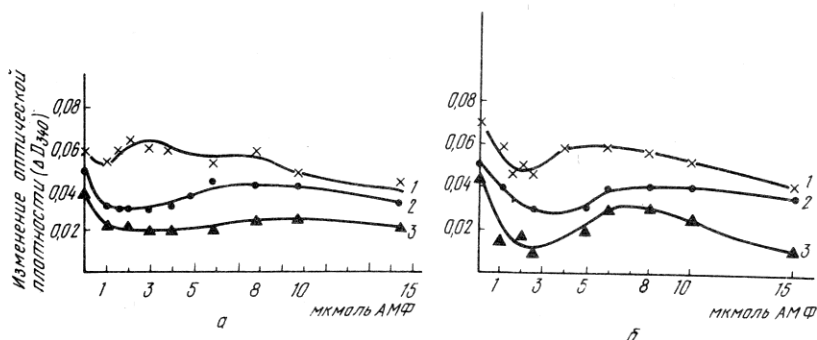


Рис. 22. Зависимость скорости ФДФазной реакции от концентрации АДФ в мышцах (а) и печени (б) мидий при различных рН:
1 — 7,8; 2 — 7,0; 3 — 9,0

Описанные свойства ФДФазы мышц и печени мидий в значительной степени отличаются от данных, полученных на других беспозвоночных (крабах и головоногих моллюсках), в сторону более низкой чувствительности к АДФ и избытку субстрата. Основным отличием является отсутствие полного ингибирования фермента субстратом и АДФ при миллимолярных концентрациях. Наши данные по этим показателям сходны с описанными для ФДФазы печени мигрирующего лосося (Behrlich, Hochachka, 1969) и зародышей вьюна (Мильман, Юровицкий, 1973). Х. В. Бериш отмечает, что в регуляции ФДФазы лосося существует две особенности — активация фермента после его первоначального ингибирования и отсутствие полного ингибирования фермента высокими концентрациями АДФ. Автор считает, что эти особенности регуляции фермента у мигрирующего лосося связаны с его низким энергетическим потенциалом и голоданием на протяжении миграции. Все эти факторы имеют место и у мидий, часто оказывающихся в условиях недостаточного снабжения кислородом. Высокое содержание АДФ (1,7 — 2,9 мкмоль/г) и низкий энергетический потенциал (0,41) тканей мидий обусловили, очевидно, низкую чувствительность ФДФазы к этим регуляторам. Позитивная кооперативная кинетика фермента по отношению к субстрату, усложняющаяся ионами калия, и низкое его сродство с АДФ, возможно, являются основными контролирующими механизмами.

Особенно четко эти свойства ФДФазы проявляются в условиях гипоксии, когда энергетический потенциал тканей мидий снижается еще в 1,5–2 раза. В этих условиях, по нашим данным, активно проходят процессы глюконеогенеза, так как содержание олигосахаридов в тканях мидий повышается на 50–100%. Наличие глюконеогенеза в анаэробных условиях обнаружено и у зародышей вьюна (Мильман, Юровицкий, 1973).

Резкие колебания в содержании кислорода в естественной среде обитания мидий, наблюдающиеся в течение суток, а также при штормовых явлениях и заморах обусловили устойчивость ФДФазы к гипоксии. С этими же факторами тесно связаны изменения величины внутриклеточ-

ного рН в тканях мидий, по отношению к которым фермент проявляет слабую чувствительность.

Дополнительным механизмом контроля ФДФазной активности является низкая энергия активации в широком диапазоне температур. Кривая Аррениуса с точками перегиба, свойственной и ФДФазе краба, является, по мнению Х.В.Бериша (1975), следствием перехода низкотемпературной формы фермента в высокотемпературную.

Из всего вышесказанного следует, что особенности кинетических свойств ФДФазы тканей мидий заключаются в слабой регуляции ее активности температурой, рН, ионами калия. Фермент проявляет низкое сродство к субстрату и ингибитору, что позволяет ему сохранять активность при значительных изменениях условий внешней среды и внутриклеточной среды. Проявление ФДФазной активности при гипоксии является важнейшим фактором метаболизма мидий, способствуя функционированию глюконеогенеза в этих условиях.

Уровень активности ФДФазы во всех исследованных тканях мидий (мышцах, печени, гонадах и жабрах) близок и составляет по среднегодовым данным 0,07–0,11 мкмоль Р/мг белка в минуту. Приведенные величины близки к таковым у двусторчатых моллюсков *Mercenaria mercenaria* и *Placopecten magellanicus* (Engel, Neat, 1970; O'Doherty, Feltham, 1971) и арктических крабов *Ch. bairdi* (Behrisch, Jonson, 1974).

Сезонная динамика гликогенсинтетазы и фруктозоdifосфатазы. Сезонная изменчивость активности ФДФазы и ГСазы в отдельных тканях мидий носит общий характер (рис. 23, 24). Кривые имеют два пика: весенний (март–май) и осенний (сентябрь–октябрь), более четко выраженные для ГСазы. В эти же периоды отмечается максимальное содержание независимой J-формы фермента. Летом и зимой активность обоих ферментов находится на низком уровне, ГСаза почти полностью представлена D-формой.

При сопоставлении приведенных данных сезонной динамики углеводов в тканях мидий видно, что изменения активности обоих ферментов обратны колебаниям содержания гликогена и сходны с динамикой

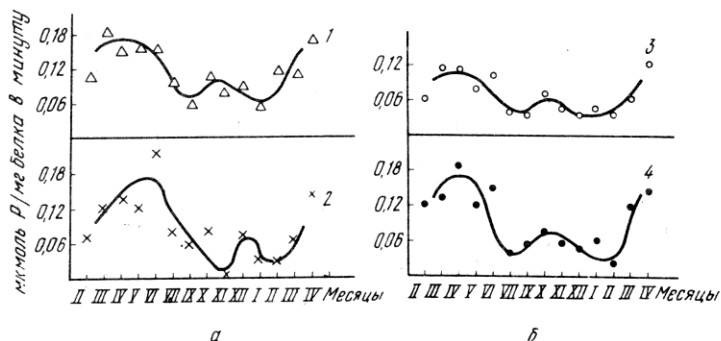


Рис. 23. Сезонная изменчивость ГСазы в тканях мидий:
1 – жабры; 2 – гонады; 3 – гепатопанкреас; 4 – мышцы

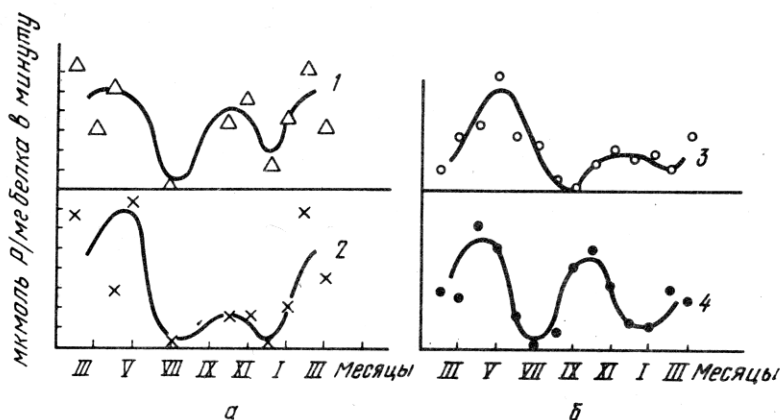


Рис. 24. Сезонная изменчивость ФДФазы в тканях мидий:
1 — жабры; 2 — гонады; 3 — гепатопанкреас; 4 — мышцы

олигосахаридов. Обратная зависимость между содержанием гликогена и интенсивностью его синтеза наблюдается также у устриц (Fando, Garcia — Fernandes, Candela, 1972). Осенний и весенний пики содержания в тканях мидий олигосахаридов и активности ферментов глюконеогенеза объясняются активными процессами синтеза гонадной ткани, прежде всего белковым синтезом. Углеводы являются, как известно, основным энергетическим субстратом, обеспечивающим конструктивный синтез половых клеток.

Таким образом, наиболее высокий уровень синтеза гликогена наблюдается не в периоды его максимального содержания в тканях, а во время весеннего и осеннего репродуктивных циклов. В это же время наблюдается и максимальный уровень содержания АТФ в тканях мидий.

Полученные данные дают представление о скорости синтеза основных энергетических субстратов глюкозы и гликогена. Наиболее высокая активность ферментов глюконеогенеза в весенний и осенний периоды обуславливают высокую пищевую ценность мидий, как объектов марикультуры.

ГЛАВА 4. ФЕРМЕНТЫ ПЕРЕАМИНИРОВАНИЯ

Изучение ферментов переаминирования ААТ (аспартаттрансаминазы) и АЛАТ (аланинтрансаминазы) в тканях мидий было начато в связи с важным значением аминокислотного обмена как в процессе глюконеогенеза, так и в энергетическом метаболизме в целом. Аминокислоты — не только основные предшественники глюкозы, но и модуляторы глюконеогенеза, существенно увеличивающие продукцию глюкозы в печени млекопитающих. Аланин, играющий важную роль в углеводном обмене, считается ключевой аминокислотой глюконеогенеза (Браунштейн, 1969).

У двустворчатых моллюсков аминокислотный обмен играет большую роль как в аэробном энергетическом обмене, так и при переключении на анаэробный обмен (Hochachka et al., 1973; Zwaan, Wijzman, 1976; Zwaan et al., 1976; Hochachka, Somero, 1976; Хочачка, Сомеро, 1977), а также в процессах осморегуляции (Hammen, 1968). В экскретируемой жидкости у моллюсков содержится 25–38% аминокислот. При помещении моллюсков в воду с повышенной соленостью наблюдается резкое увеличение содержания и экскреции свободных аминокислот, особенно аланина (30–70%). Как известно, аминокислоты являются важными компонентами в поддержании осмотического градиента (Sansone et al., 1977). Наиболее важным путем в метаболизме аминокислот являются реакции трансаминирования с превращением α -кетокислот в аминокислоты, причем реакции обратимы.

Активность двух основных энзимов трансаминирования – ААТ и АлАТ – впервые продемонстрирована на *M. edulis* Lam. и *Modiolus modiolus* (Read, 1962). На семи видах двустворчатых моллюсков показана связь между активностью трансаминаз и уровнем экскретируемых аминокислот (Hammen, 1968). Однако в литературе мало данных об активности этих ферментов в отдельных тканях моллюсков, об их субклеточной локализации и кинетических характеристиках (Addink, Veenhot, 1974; Hochachka, Somero, 1976). Нами были получены данные об активности трансаминаз в отдельных тканях мидий, их субклеточной локализации, сезонной динамике и кинетических свойствах (Горомосова, Таможняя, 1979, 1980).

Активность аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы и их субклеточная локализация. Определение трансаминазной активности в исследованных тканях мидий показало, что активность АлАТ и ААТ находится примерно на одном уровне и во всех тканях выражается величинами одного порядка (табл. 19). Отношение ААТ к АлАТ, характеризующее сравнительную активность двух ферментов, во всех тканях близко к 1, а в жабрах – 2. Такое же соотношение трансаминаз наблюдается и у других видов двустворчатых моллюсков (Hammen, 1968; De Rosa, Swick, 1975) в отличие от большинства других групп беспозвоночных и позвоночных животных, где оно составляет 5–10, т.е., как правило, преобладает активность ААТ. Высокая активность АлАТ в тканях мидий и других двустворчатых моллюсков свидетельствует о большой роли этого фермента в их энергетическом обмене, что связано с их способностью к факультативному анаэробизму.

Для более четкого представления об участии ферментов переаминирования в различных звеньях процесса метаболизма изучалась их субклеточная локализация, т.е. приуроченность к цитоплазматической или митохондриальной ферментной системе.

Во всех исследованных тканях мидий как в цитоплазматической, так и в митохондриальной фракции проявляется активность аминотрансфераз. При сопоставлении активности обеих фракций в различные сезоны видно, что цитоплазматическая ААТ во всех тканях находится на одном уровне, тогда как митохондриальная фракция в гепатопанкре-

Т а б л и ц а 19. Среднегодовая активность ферментов переаминирования ($\bar{X} \pm \bar{x}$) в тканях мидий, мкмоль/мг белка в минуту

Исследуемая ткань	Фракции	
	цитоплазматическая	митохондриальная
	$\bar{X} \pm \bar{x}$	$\bar{X} \pm \bar{x}$
АлАТ		
Гепатопанкреас	0,180 $\pm$ 0,012	0,118 $\pm$ 0,017
Мышцы	0,205 $\pm$ 0,005	0,125 $\pm$ 0,009
Жабры	0,195 $\pm$ 0,010	0,123 $\pm$ 0,009
Гонады	0,202 $\pm$ 0,011	0,110 $\pm$ 0,008
ААТ		
Гепатопанкреас	0,091 $\pm$ 0,003	0,135 $\pm$ 0,011
Мышцы	0,111 $\pm$ 0,005	0,055 $\pm$ 0,007
Жабры	0,141 $\pm$ 0,004	0,128 $\pm$ 0,009
Гонады	0,082 $\pm$ 0,005	0,101 $\pm$ 0,011

Т а б л и ц а 20. Внутриклеточная локализация аминотрансфераз ($\bar{X} \pm \bar{x}$) в тканях мидий

Исследуемая ткань	Цитоплазматическая фракция		Митохондриальная фракция	
	мкмоль/г сырой ткани	%	мкмоль/г сырой ткани	%
АлАТ				
Гепатопанкреас	6,22 $\pm$ 0,50	87,5	0,89 $\pm$ 0,12	12,5
Мышцы	4,04 $\pm$ 0,08	92,4	0,33 $\pm$ 0,02	7,6
Жабры	2,55 $\pm$ 0,17	92,4	0,21 $\pm$ 0,02	7,6
Гонады	2,48 $\pm$ 0,09	87,9	0,34 $\pm$ 0,02	12,1
ААТ				
Гепатопанкреас	2,28 $\pm$ 0,07	70,4	0,96 $\pm$ 0,07	29,6
Мышцы	1,82 $\pm$ 0,08	94,8	0,10 $\pm$ 0,01	5,2
Жабры	1,63 $\pm$ 0,06	90,1	0,18 $\pm$ 0,01	9,9
Гонады	0,71 $\pm$ 0,04	64,5	0,39 $\pm$ 0,04	35,5

асе и гонадах в зимний период в 2 раза выше, чем в летний. Активность цитоплазматической АлАТ во всех случаях в 1,5 раза выше митохондриальной. Поскольку митохондрии составляют значительную часть белка клетки, то для представления о количественном распределении ферментов в субклеточных фракциях данные были рассчитаны на массу митохондриального и цитоплазматического белка (табл. 20). Из приведенных расчетов видно, что подавляющая часть активности ферментов в мышцах и жабрах приурочена к цитоплазматической фракции, где составляет более 90% тканевой активности. В гепатопанкреасе и гонадах цитоплазматическая фракция содержит 64–88% активности, остальная часть приходится на митохондрии.

Имеющиеся в литературе данные о внутриклеточной локализации аминотрансфераз свидетельствуют о том, что она качественно различается в зависимости от вида ткани. На млекопитающих показано, что в гликолитических тканях — скелетной и сердечной мышцах — более

90% активности ААТ приходится на цитоплазматическую фракцию, тогда как в глюконеогенетических — печени и почках — значительная часть фермента локализована в митохондриях (De Rosa a. Swick, 1975). В мышцах рыб и земноводных свыше 90% аминотрансфераз локализовано в цитоплазме, причем АЛАТ в митохондриях мышц пресноводных рыб вообще не обнаружена (Лызлова, 1974).

Субклеточное распределение ферментов у мидий согласуется с литературными данными. В мышцах и жабрах мидий аминотрансферазы распределяются по типу гликолитических тканей т.е. более 90% ферментов приурочено к цитоплазме, а в гепатопанкреасе и гонадах — по типу глюконеогенетических: АЛАТ в митохондриях содержится до 12, ААТ — до 30%. Такое субклеточное распределение аминотрансфераз у мидий соответствует функциональным особенностям этих тканей.

Специфика субклеточного распределения аминотрансфераз в тканях мидий свидетельствует, очевидно, о разной направленности их работы в двух фракциях. Высокое содержание этих ферментов в митохондриальной фракции гепатопанкреаса и гонад связано с участием их в глюконеогенезе, более активном в этих тканях. В мышцах и жабрах, где преобладают энергетические процессы, основная функция цитоплазматической фракции ферментов связана с участием их в процессе гликолиза. Особенно велика роль АЛАТ в гликолизе у тех беспозвоночных, которые имеют низкую активность лактатДГ. Было показано, что у таких беспозвоночных АЛАТ выполняет частично функции лактатДГ в окислении цитоплазматического НАДН (Orlicky et al., 1977; Хочачка, Сомеро, 1977). По подсчетам Орlickи, отношение активности лактатДГ к АЛАТ в мышцах рака составляет 1,8, тогда как в мышцах кролика — 158. У мидий такое соотношение составляет, по нашим данным, 0,3. Таким образом, у мидий АЛАТ выполняет исключительно важную роль в анаэробном обмене.

Сезонная динамика ферментов переаминирования. Сезонная изменчивость АЛАТ представлена на рис. 25, 26. Во всех исследованных тканях

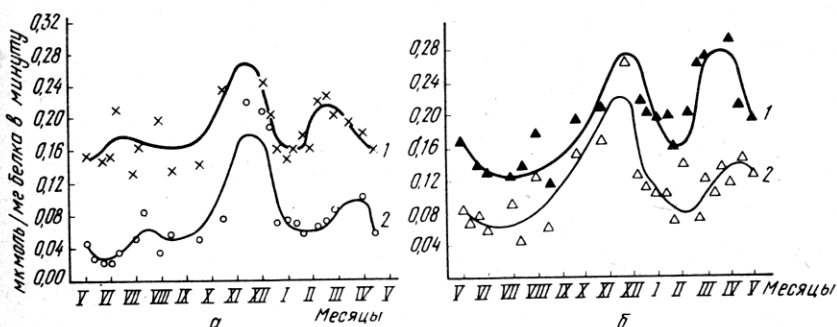


Рис. 25. Сезонные изменения активности АЛАТ:

а — мышцы; б — жабры; 1 — цитоплазматическая форма; 2 — митохондриальная форма

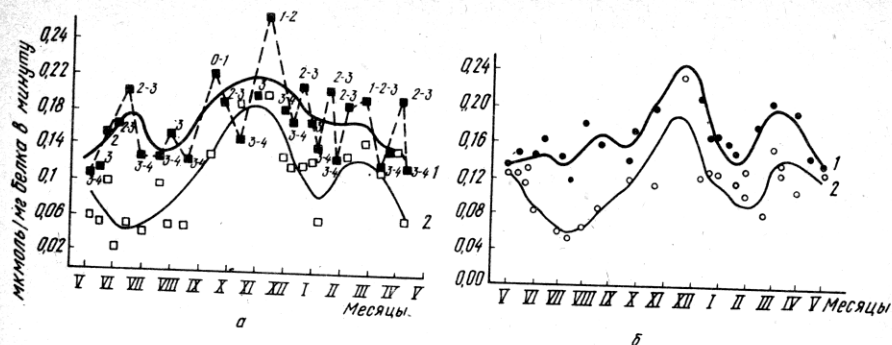


Рис. 26. Сезонные изменения активности АЛАТ:
а — гонады; б — гепатопанкреас; 1 — цитоплазматическая форма; 2 — митохондриальная форма

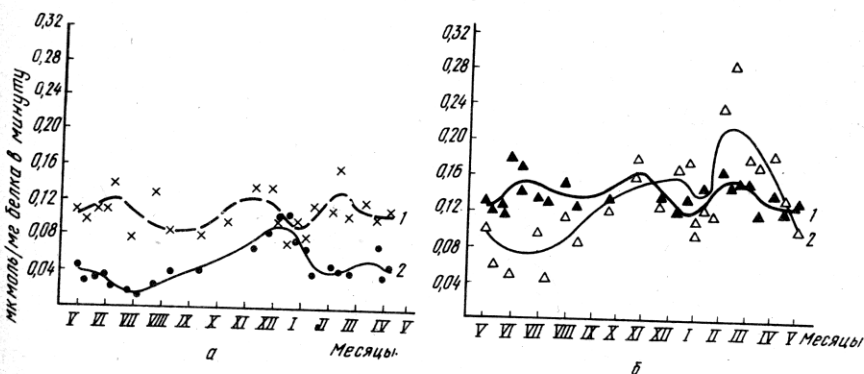


Рис. 27. Сезонные изменения активности ААТ:
а — мышцы; б — жабры; 1 — цитоплазматическая форма; 2 — митохондриальная форма

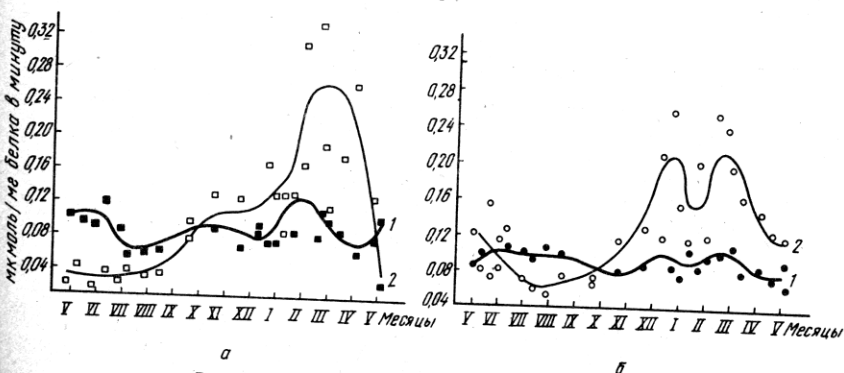


Рис. 28. Сезонные изменения активности ААТ:
а — гонады; б — гепатопанкреас; 1 — цитоплазматическая форма; 2 — митохондриальная форма

наблюдается два четко выраженных пика активности: осенний (октябрь — декабрь) и весенний (март—май). Наиболее четко осенний и весенний пики выражены в мышцах и жабрах, где максимальная активность в 3—5 раз превышает летний уровень. В гонадах кроме указанных пиков наблюдается более частая периодичность в колебаниях активности цитоплазматической АЛАТ с максимумами через 1,5—2 мес, что связано, вероятно, с различными стадиями зрелости половых продуктов. ААТ имеет несколько иной характер сезонной динамики (рис. 27, 28). В теплое время года активность цитоплазматической и митохондриальной фракции во всех тканях находится на низком уровне, причем митохондриальная активность несколько ниже цитоплазматической. Начиная с ноября, наблюдается возрастание активности митохондриальной фракции всех тканей, исключая мышцы, и на протяжении зимне-весеннего периода активность митохондриального фермента в несколько раз превышает цитоплазматическую. В гепатопанкреасе мидий наблюдается два пика активности митохондриальной ААТ подобно АЛАТ. Сезонные колебания цитоплазматической ААТ имеют ту же направленность, но выражены слабо.

Для выяснения зависимости активности ферментов от стадии зрелости гонад исследована интенсивность переаминирования в этой ткани на разных стадиях зрелости. Данные показали, что активность АЛАТ по мере созревания гонад постепенно понижается, достигая минимума в гонадах IV стадии зрелости. Активность ААТ в митохондриях возрастает с максимумом в гонадах IV стадии. В цитоплазме она сохраняется на одном уровне. В летние месяцы митохондриальная активность ферментов остается на низком уровне независимо от стадии зрелости гонад (0,04 мкмоль/мг белка в минуту) (табл. 21).

Исходя из сезонной динамики аминотрансфераз, можно заключить, что процессы переаминирования в тканях мидий высокоактивны в осенне-зимний и весенний периоды, когда наблюдается интенсивный гаметогенез. Высокий уровень белкового обмена в указанные периоды

Т а б л и ц а 21. Активность аминотрансфераз в гонадах мидий, мкмоль/мг белка в минуту

Стадия зрелости гонад	Фракция			
	цитоплазматическая		митохондриальная	
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	n
АЛАТ				
0—I	0,220 $\pm$ 0,039	(3)	0,134	
I—II	0,196 $\pm$ 0,015	(8)	0,156 $\pm$ 0,014	(7)
II—III	0,178 $\pm$ 0,006	(15)	0,136 $\pm$ 0,011	(8)
III—IV	0,126 $\pm$ 0,003	(10)	0,057 $\pm$ 0,009	(7)
ААТ				
0—I	0,086 $\pm$ 0,015	(3)	0,076	
I—II	0,085 $\pm$ 0,005	(9)	0,146 $\pm$ 0,009	(7)
II—III	0,080 $\pm$ 0,005	(9)	0,137 $\pm$ 0,013	(6)
III—IV	0,109 $\pm$ 0,013	(7)	0,198 $\pm$ 0,027	(6)

подтверждается данными по сезонной динамике аминокислот в тканях мидий, которые носят сходный с аминотрансферазами характер. Высокое содержание аминокислот и белков в тканях мидий отмечено осенью, в феврале — апреле и мае — июне, причем повышение их содержания происходит в основном за счет накопления глутаминовой кислоты и аланина, являющихся непосредственными субстратами аминотрансфераз. Очевидно, синтез гонадотропной ткани сопровождается высоким уровнем как пластического, так и энергетического обмена. Большая масса гонад у мидий, занимающая в период половой зрелости 40–50% общей массы тела, требует интенсивных синтетических процессов, что объясняет ярко выраженную динамику субстратов и ферментов белкового и углеводного обмена. Динамика двух ферментов глюконеогенеза — фруктозодифосфатазы и гликогенсинтетазы, описанная ранее, также четко связана с репродуктивными циклами мидий.

Связь активности АЛАТ с созреванием половых продуктов прослежена на баянусах, хотя она менее четко выражена (Barnes, Blackstock, 1975). Высокая активность ААТ наблюдается в мышцах лягушки весной (Серебренникова, Лызлова, 1977), что также, вероятно, связано с половым циклом. Авторы отмечают, что в это время происходит перераспределение активности в субклеточных фракциях за счет возрастания митохондриальной ААТ. Это явление наблюдается и в тканях мидий при возрастании активности ААТ, что было отмечено ранее.

Некоторые кинетические характеристики трансаминаз. В литературе имеются немногочисленные данные о кинетических свойствах АЛАТ мышц устриц (Hochachka, Somero, 1976). Свойства трансаминаз субклеточных фракций моллюсков практически не изучались. Нами получены данные по рН-оптимумам и определению константы Михаэлиса (K_M) для цитоплазматической и митохондриальной АЛАТ и ААТ тканей мидий (рис. 29). Как видно из рисунков, кривые сходны между собой по характеру. рН-Оптимум цитоплазматической ААТ мышц, жабр и митохондриальной фракции мышц сдвинут в щелочную область (рН 7,0–9,0), а в митохондриальной фракции жабр — в кислую (6,0–7,0). При рН 6,0 активность митохондриальной ААТ в обеих тканях сохраняет высокую активность, тогда как цитоплазматический энзим теряет 40% активности.

Фракции АЛАТ различаются как по характеру кривых рН-оптимума, так и по зонам максимальной активности. Кривая митохондриальной фракции из обеих тканей имеет характерные колоколообразные

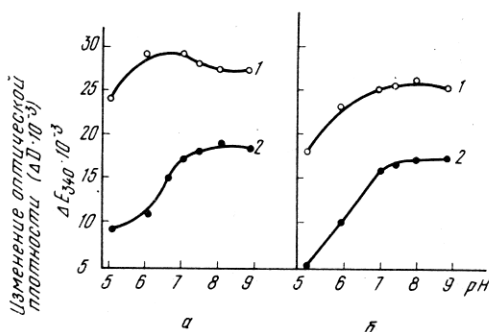


Рис. 29. Кривые рН-зависимости ААТ:
а — жабры; б — мышцы; 1 — митохондриальной; 2 — цитоплазматической

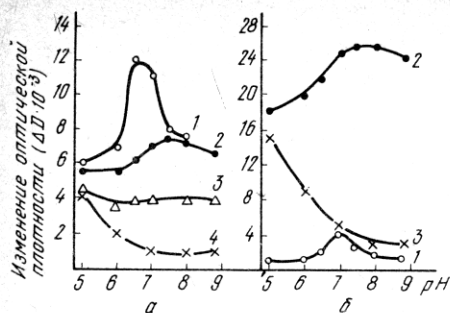


Рис. 30. Кривые рН-зависимости активности АЛАТ:

а — жабры; б — мышцы; 1 — митохондриальная фракция; 2 — цитоплазматическая фракция

вершины с пиком активности 6,5–7,0. В цитоплазматической фракции пик, как и для ААТ, лежит в области рН 7,0–8,0. Однако при понижении содержания ферментного белка в цитоплазматической фракции рН-оптимум меняется. При концентрации белка 20–30 мкг кривая рН-оптимума сглажена, а при снижении концентрации до 8–14 мкг оптимум рН резко смещается в кислую зону (рис. 30).

При сравнительном анализе кривых рН-оптимумов, полученных для субклеточных фракций трансаминаз из тканей мидий, обращает внимание отсут-

ствие четкой зависимости уровня активности трансаминаз от рН. Активность остается практически постоянной в широком диапазоне рН как для ААТ, так и для АЛАТ. Это связано, вероятно, с адаптацией данных ферментов к относительному непостоянству рН внутриклеточной среды в тканях мидий.

Оптимальные зоны рН-оптимумов обеих трансаминаз из тканей мидий лежат в тех же пределах, что и у холоднокровных позвоночных, для которых также характерно смещение рН-оптимума митохондриальных изоформ в кислую сторону (Философова-Лызлова, 1972).

Расчет констант Михаэлиса для митохондриальной фракции ААТ показан на рис. 31, все остальные данные приведены в табл. 22. Во всех исследованных тканях мидий наблюдается следующая закономерность: цитоплазматическая форма обеих трансаминаз имеет более высокую K_M для аминокислот и низкую для α -кетоглутарата по сравнению с митохондриальной. Значения K_M для одноименных субстратов близ-

ки между собой в отдельных тканях мидий в обеих фракциях АЛАТ и ААТ. Определение K_M для обоих субстратов АЛАТ в цитоплазме и митохондриях при рН 6,5, которые наблюдаются в тканях мидий при гипоксии, показало, что сродство фермента и субстратов в этих условиях не изменяется.

Рассмотрим соотношение между величинами K_M АЛАТ и ААТ для двух субстратов (аланин/ α -кетоглутарат и аспартат/ α -кетоглутарат) в обеих фракциях тканей мидий. В цитоплазме для этих ферментов оно выражается соотношением 100:1, в митохондриях оно значительно ниже — 10:1 для АЛАТ и 3:1 для ААТ. Подобные соотношения характерны для изоэнзимов АЛАТ и ААТ мышц холоднокровных позвоночных (Философова-Лызлова, 1972), у теплокровных митохондриальный изоэнзим ААТ имеет обратное соотношение между субстратами (De Rosa, Swick, 1975; Поляновский, 1977).

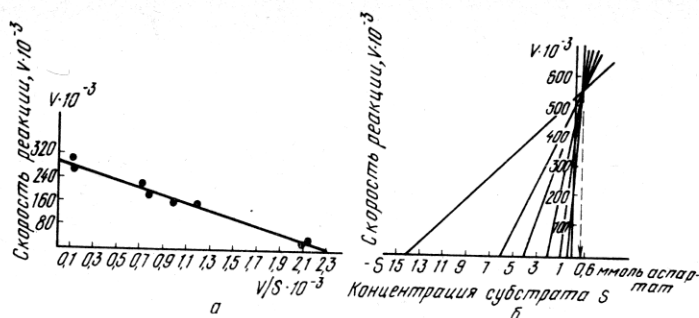


Рис. 31. График расчета кажущейся K_M для митохондриальной ААТ:
 а — по методу Эди-Хофсти (v от v/S); б — прямая линейная зависимость (Корниш-Боуден)

K_M , полученные для трансаминаз цитоплазматических фракций мидий, позволяют судить о степени сродства этих ферментов и субстратов. Исходя из приведенных данных, цитоплазматические и митохондриальные трансаминазы из тканей мидий различаются по степени сродства к аминокислотам и α -кетоглутарату. Цитоплазматические формы обеих трансаминаз характеризуются более низким сродством к аминокислотам (аспартату и аланину) и более высоким сродством с α -кетоглутаратом, чем митохондриальные, что свойственно изоэнзимам АЛАТ и ААТ позвоночных животных. Обращает внимание исключительно высокое сродство цитоплазматической и митохондриальной ААТ мидий с α -кетоглутаратом и сравнительно низкое сродство цитоплазматической АЛАТ к аланину.

Сродство цитоплазматической фракции АЛАТ из тканей мидий к аланину в 2–5 раз ниже, чем у холоднокровных позвоночных и дель-

Т а б л и ц а 22. $K_M (10^{-3} M; \bar{x} \pm S_x)$ трансаминаз во фракциях тканей мидий

Исследуемая ткань	Цитоплазма		Митохондрии	
	Аланин	Кетоглутарат	Аланин	Кетоглутарат
Аланин-трансаминаза				
Мышцы	$20,82 \pm 1,47$	$0,12 \pm 0,03$	$4,36 \pm 0,41$	$0,35 \pm 0,11$
Гепатопанкреас	$23,33 \pm 3,05$	$0,17 \pm 0,07$	$7,10 \pm 0,60$	—
Жабры	$18,08 \pm 1,92$	$0,22 \pm 0,05$	$8,13 \pm 1,36$	$0,31 \pm 0,07$
Продолжение				
Исследуемая ткань	Цитоплазма		Митохондрии	
	Аланин	Кетоглутарат	Аланин	Кетоглутарат
Аспартат-трансаминаза				
Мышцы	$4,47 \pm 0,65$	$0,04 \pm 0,01$	$0,62 \pm 0,10$	$0,14 \pm 0,02$
Гепатопанкреас	$7,00 \pm 0,44$	$0,14 \pm 0,06$	$1,41 \pm 0,23$	—
Жабры	$6,67 \pm 0,52$	$0,07 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,07$	$0,18 \pm 0,05$

финов (Хочачка, Сомеро, 1977). Это свойство цитоплазматического изоэнзима АлАТ определяет направление хода реакции от пирувата к аланину. Действительно, если сравнить нормальную концентрацию аланина в тканях мидий и при гипоксии (3–7 ммоль/г) (Zwaan et al., 1976) с K_M АлАТ, то видно, что она значительно ниже насыщающей концентрации, необходимой для определения оптимальной скорости реакции. K_M митохондриального изоэнзима АлАТ составляет 4–6 ммоль и находится в пределах физиологической концентрации аланина, т.е. в митохондриях реакция может идти в сторону образования пирувата, что имеет место в процессе глюконеогенеза (De Rosa, Swick, 1975). Что касается ААТ, то K_M ее изоэнзимов значительно ниже концентрации аспартата в тканях (30 мкг/мг) (De Zwaan et al., 1976), и, следовательно, реакция может идти в обоих направлениях в зависимости от ситуации, сложившейся в организме. Высокое родство цитоплазматической и митохондриальной форм ААТ к обоим субстратам — аспартату и α -кетоглутарату — свидетельствует о большой эффективности работы этого фермента в тканях мидий.

Данные о рН-оптимуме и K_M двух изоформ трансаминаз, а также данные о разных уровнях активности этих изоформ в тканях мидий и их сезонной динамике позволяют говорить о наличии у мидий двух изоферментов АлАТ и ААТ — цитоплазматического и митохондриального. Свойства изоферментов трансаминаз мышц и жабр мидий близки к свойствам этих изоферментов из мышц круглоротых, земноводных и морских млекопитающих.

Обобщая результаты исследования кинетических свойств ферментов пластинчатожаберных моллюсков, можно отметить некоторые характерные для них особенности. Основные отличия этих ферментов у мидий от позвоночных заключаются в степени их регуляции субстратами, кофакторами и метаболитами. Для ферментов ПК, лактатДГ и гликосинтетазы обнаруженные K_M на порядок выше аналогичных величин у позвоночных. При наличии в молекуле нескольких изоферментов преобладающей является изоформа с высоким K_M . Для малатДГ, Г-6-ФДГ и трансаминаз K_M аналогичны позвоночным. Однако и у этих ферментов наблюдается пониженное или полное отсутствие чувствительности к высоким концентрациям субстратов и кофакторов.

Характерным для многих изученных ферментов является также слабая регуляция активности температурой, рН, специфическими активаторами и ингибиторами. Перечисленные особенности позволяют ферментам сохранять активность при изменении метаболического фонда клетки, которое наблюдается при значительных колебаниях абиотических факторов внешней среды (содержание кислорода, солёности, температуры).

Специфика организаций ферментативных систем гликолиза и глюконсегенеза лежит в основе биохимической адаптации мидий к анаэробным и другим неблагоприятным условиям среды. Эти адаптации определяют жизнеспособность мидий и других двустворчатых моллюсков в условиях антропогенного загрязнения.

ГЛАВА 5. ПИРИДИН- И АДЕНИННУКЛЕОТИДНАЯ СИСТЕМА В ТКАНЯХ МИДИЙ

Пиридиннуклеотиды. За последние 20 лет проведено много исследований, показавших важную роль никотинамидных нуклеотидов в регуляции метаболических процессов в тканях теплокровных животных. Важная роль этих соединений заключается в их участии в качестве кофакторов во многих окислительно-восстановительных реакциях. Относительные концентрации окисленных и восстановленных форм этих соединений служат центральным звеном контроля активности многих дегидрогеназ (Северин и др., 1969). Кроме этого, отношение НАД/НАДН, как правило, отражает физиологическое состояние ткани и характер обмена (Мильман, Юровицкий, 1973; Маляревская, 1979).

Содержание окисленных и восстановленных форм никотиновых нуклеотидов подробно исследовано в мышцах и печени млекопитающих.

Содержание пиридиннуклеотидов (НАД, НАДН, НАДФ, НАДФН) в печени млекопитающих составляет соответственно 560, 300, 8, 280 мкмоль/г сырой массы (Телепнева, Мештер, 1969). Из приведенных выше данных видно, что концентрация НАД в скелетных мышцах кролика выше, чем НАДН; концентрация НАДФ ниже НАДФН. На долю НАДФ приходится не более 10% общего содержания коферментов ткани (Беляев и др., 1972). Таким образом, для клетки характерно высокое отношение НАД/НАДН и низкое НАДФ/НАДФН. Следовательно, можно сказать, что системы НАД/НАДН и НАДФ/НАДФН выполняют разные функции в клетке. Система НАД/НАДН поддерживает окислительную способность ткани, в то время как система НАДФ/НАДФН — ее восстановительную способность.

Сведений о содержании никотинамидных коферментов у низших позвоночных значительно меньше. Обзор работ по содержанию никотинамидных коферментов у рыб разных видов и экологии проведен А.Я. Маляревской (1979), которая показала, что соотношение между отдельными фракциями никотинамидных нуклеотидов НАД и НАДН, НАДФ и НАДФН, а также соотношения между НАД и НАДФ в тканях рыб аналогичны тканям высших животных, т.е. в сумме НАД и НАДН основное их количество находится в виде НАД, а в сумме НАДФ и НАДФН — в виде НАДФН. Высокое содержание всех никотинамидных нуклеотидов отмечено в мышцах активных пловцов.

Концентрацию пиридиннуклеотидов в тканях беспозвоночных, в частности пластинчатожаберных моллюсков, практически не исследовали. Сведения о содержании пиридиннуклеотидов в тканях морских и пресноводных пластинчатожаберных моллюсков приведены в работах В.Н. Карнаухова (1978), в тканях некоторых пресноводных беспозвоночных — в работах Т.И. Биргера (1979). Перечисленными выше авторами было определено содержание не отдельных форм пиридиннуклеотидов, а суммарное количество окисленных НАДФ и НАД и восстановленных НАДН и НАДФН-форм. Содержание никотинамидных коферментов у исследованных видов беспозвоночных варьирует в значительных пределах (Биргер, 1979). Так, у хирономид содержание окисленной формы НАД и НАДФ составляло $82,8 \pm 8,9$ мкг/г, у дафний — $93,2 \pm 8,06$, у дрейсены бугской — $85,7 \pm 6,5$ и речной — $155 \pm 5,17$, у прудовика малого — $253 \pm 7,24$ мкг/г. Данные по отдельным пиридиннуклеотидам приведены для жаберной ткани краба *Carcinus maenas* (Thabrew et al., 1971). Содержание НАД, НАДН, НАДФ, НАДФН соответственно составляет $87 \pm 17,48 \pm 3,156 \pm 20,65 \pm 4,65 \pm 4,65 \pm 5$ нмоль/г сырой массы.

Приведенные немногочисленные данные показывают, что никотинамидная система в тканях беспозвоночных несколько отличается от таковой в тканях высших животных. Основные отличия относятся к соотношению окисленной и восстановленной форм НАДФ. Так, из приведенных выше данных для жабр краба следует, что в отличие от тканей высших животных, у которых только 3–4% НАДФ находится в окисленной форме, до 40% общего количества НАДФ + НАДФН находится в окисленной форме.

Состояние пиридиннуклеотидной системы для разных тканей мидий различно. Из четырех изученных тканей (мышцы, гонады, гепатопанкреас и жабры) наибольшая окислительная способность системы НАД — НАДН обнаружена в гона-

дах. До 75% НАД в этой системе находится в окисленной форме, что аналогично состоянию в тканях крысы (Thabrew et al., 1971). Соотношение НАДФ и НАДФН в системе НАДФН – НАДФ тканей мидий несколько отлично от такового в тканях млекопитающих. По нашим данным, в тканях мидий до 30% НАДФ находится в окисленной форме (табл. 23). Более того, в гонадотропной ткани окисленной формы НАДФ больше, чем восстановленной. Преобладание восстановленных пиридиннуклеотидов над окисленными в системе НАДФ – НАДФН является специфичной тканевой мидий, особенно гонад и мышц. Из-за отсутствия данных о состоянии никотинамидной системы в ряду беспозвоночных мы не можем сделать вывод, насколько полученные закономерности являются характерными для беспозвоночных разных филогенетических линий. В этом отношении интерес представляют данные, которые показывают, что в жаберной ткани краба наблюдаются такие же соотношения пиридиннуклеотидов, как и в тканях мидий (Thabrew et al., 1971). Аналогичные результаты были получены для ооцитов рыб. Так, А.С. Мильман и Ю.Г. Юровицкий (1973) подчеркивают, что в ооцитах преобладают окисленные формы НАД и НАДФ. Эти авторы считают, что преобладание содержания НАДФН над НАДФ ассоциируется с высокой активностью пентозного шунта. Действительно, определение активности Г-6-ФДГ показало, что наиболее высокая активность фермента проявляется в гонадах и гепатопанкреасе мидий (Шапиро, Бобкова, 1973). Это, вероятно, обеспечивает активное функционирование в этих тканях синтетических процессов, связанное с увеличением массы гонадотропной ткани в период половой активности.

Степень восстановленности пиридиннуклеотидной системы в тканях мидий зависит от интенсивности их дыхания. Наибольшая интенсивность дыхания характерна для жаберной ткани. Исходя из этого, можно предположить, что дыхательная цепь митохондрий этой ткани характеризуется меньшей степенью восстановления пиридиннуклеотидов по сравнению с другими тканями. Действительно, наши экспериментальные данные подтвердили это предположение. Уровень НАДН в сумме НАД и НАДН составляет соответственно в жабрах, мышцах и гепатопанкреасе мидий 32, 34 и 58%. Поскольку пиридиннуклеотиды являются регуляторами многих процессов, то воздействия, приводящие к изменению их содержания, могут также влиять на соотношение аэробных и анаэробных процессов. Такие данные были получены на перезрелой икре рыб, у которой наряду с увеличением концентрации НАДН и снижением дыхания на 50% наблюдается увеличение анаэробного гликолиза почти в 2 раза (Гош, Жукинський, 1976).

Особенности адениннуклеотидной системы у беспозвоночных. Одним из важных факторов, определяющих интенсивность и регуляцию метаболических процессов в организме, является концентрация в тканях отдельных компонентов адениннуклеотидной системы: АТФ, АДФ, АМФ. Степень энергизации этой системы, т.е. мера заряженности АМФ высокоэнергетическими фосфатными связями, определяется соотношением концентраций АТФ + 0,5 АДФ/АТФ + АДФ + АМФ и характеризуется как энергетический заряд клетки. Величина такого заряда в тканях организмов обычно находится в пределах 0,7–0,9. При этих же условиях осуществляется регуляция активности многих ферментов. Можно сказать, что регуляция активности ферментов находится в плену у энергетического заряда аденилатов клетки. Поскольку содержание компонентов адениловой системы интересует нас с точки зрения характеристики степени обеспеченности тканей моллюсков энергией при разном физио-

Таблица 23. Содержание окисленных и восстановленных форм НАД и НАДФ в тканях мидий, нмоль/г сырой массы

Ткань	НАД	НАДН	НАДФ	НАДФН
Жабры	156 ± 12,4	76,3 ± 6,4	53 ± 5,8	260 ± 20,1
Мышцы	97,7 ± 6,1	41 ± 3,4	50,5 ± 4,6	100 ± 7,8
Гонады	138,7 ± 9,4	65,4 ± 4,1	76 ± 6,4	218 ± 16,5
Печень	39,7 ± 3,6	52,5 ± 3,5	49 ± 3,4	18 ± 2,4

логическом состоянии организма, мы определяли общий уровень аденилатов в тканях моллюсков и других беспозвоночных.

При исследовании функционирования метаболических процессов одним из главных является вопрос о генерировании молекул АТФ (Zwaan et al., 1976). Существует два пути генерирования АТФ: субстратное фосфорилирование и фосфорилирование при окислении НАДН или $\text{ФАД} \cdot \text{H}_2$ в терминальной цепи окисления. У аэробных организмов в ходе гликолитического процесса при окислении 1 моль глюкозы образуется всего 2 моль АТФ. При полном аэробном окислении 1 моль глюкозы количество образовавшегося АТФ во много раз возрастает и составляет 36 моль. Энергетическая эффективность аэробного дыхания связана с тем, что наибольшее количество АТФ (28 моль из 36) образуется в терминальной цепи окисления в процессе окислительного фосфорилирования АДФ (Ленинджер, 1966). Интенсивность процесса окислительного фосфорилирования АДФ выражается коэффициентом окислительного фосфорилирования, который представляет отношение числа молекул этерифицированного фосфора к числу атомов поглощенного кислорода (P/O). Величина отношения P/O для различных субстратов, подвергающихся окислению, находится в пределах 2—4.

Процесс окислительного фосфорилирования в тканях пластинчатожаберных моллюсков является лабильным и труднообнаруживаемым (Weinbach, 1956). Для митохондрий сердечной мышцы виноградной улитки (Michejda, 1964) и для митохондрий тканей мидий прямым методом по убыли неорганического фосфата в инкубационных средах обнаружено сопряжение окисления с фосфорилированием. Однако полученные коэффициенты фосфорилирования были несколько ниже, чем для высших животных. При использовании в качестве субстратов пирувата и малата P/O равно 2,1; для глутамата и сукционата P/O были соответственно равны 1,9 и 1,5. С другими субстратами коэффициенты низки и весьма изменчивы.

Получаемые при изучении окислительного фосфорилирования в митохондриях беспозвоночных разнообразные и низкие коэффициенты в значительной степени определяются тем, что сопряжение окисления с фосфорилированием в мышцах этих организмов происходит не во всех точках дыхательной цепи, которые имеют место у высших позвоночных. Такие низкие коэффициенты могут также зависеть от низкой активности и специфических физических свойств митохондрий, выделенных из разных тканей животных (Сопрунов и др., 1967). На слабую эффективность процесса окислительного фосфорилирования кроме перечисленных выше причин влияет также вариабельность внутриклеточной среды беспозвоночных, в значительной степени определяемая интенсивностью протекающих в ней обменных процессов и проницаемостью митохондриальных мембран (Сопрунов и др., 1967).

Вследствие низкой способности к окислительному фосфорилированию и его лабильности у пластинчатожаберных моллюсков большое значение в производстве энергии приобретает анаэробная фаза окисления. Одно из основных отличий процесса гликолиза у моллюсков от высших животных заключается в том, что в тканях этих гидробионтов функционируют многочисленные ответвления от основного ствола ферментативных реакций гликолиза (Zwaan et al., 1975a). Существование таких разветвленных цепей приводит к тому, что в результате анаэробного расщепления углеводов образуется не только молочная кислота, но и ряд таких органических кислот, как аланин, сукцинат, октопин, пропионат, бутират и ацетат. Пути образования этих веществ весьма разнообразны, о чем говорят разработанные схемы (Hochachka et al., 1973; Zwaan et al., 1976). Из этих схем следует, что при аэробном обмене в тканях высших животных имеет место только одно субстратное фосфорилирование на уровне реакции глицерин-1, 3ДФ $\rightarrow$ глицерин-3-фосфат, в то время как в анаэробном обмене у факультативных анаэробов роль субстратного фосфорилирования резко возрастает. Субстратное фосфорилирование может происходить в следующих реакциях.

1. Субстратное фосфорилирование

1,3-Дифосфоглицерат $\rightarrow$ 3-фосфоглицерат + 1 моль АТФ

Фосфоэнолпируват $\rightarrow$ пируват + 1 моль АТФ
 Фосфоэнолпируват $\rightarrow$ оксалоацетат + 1 моль АТФ
 Сукцинил-СоА $\rightarrow$ ацетат + 1 моль АТФ
 Ацетил-СоА $\rightarrow$ пропионат + 1 моль АТФ
 Пропионил-СоА $\rightarrow$ пропионат + 1 моль АТФ
 Метилмалонил-СоА $\rightarrow$ пропионил + 1 моль АТФ

II. Электронно-сопряженное фосфорилирование

Фумарат $\rightarrow$ сукцинат + 1 моль АТФ

НАДН + восстановленный липохром $\rightarrow$ НАД + окисленный липохром + 2 моль АТФ.

Зваан (Zwaan et al., 1976) приводит эквивалентные количества АТФ, которые образуются при превращении 1 моль глюкозы с образованием в качестве конечных продуктов сукцината, аланина, α -кетоглутарата и лактата.

Ниже приведен выход АТФ при разных конечных продуктах гликолиза.

Конечный продукт	АТФ-эквивалент
Д-лактат	1,5
Аланин	1,5
Сукцинат	2,5
Пропионат	2,5–3,5

Эти цифры позволяют оценить эффективность гликолитического процесса в различных условиях обитания организмов. Из приведенных данных следует, что эффективность гликолитического процесса у факультативных анаэробов в несколько раз выше, чем у аэробов, так как при превращении глюкозы по пути Г-6-Ф $\rightarrow$ сукцинат образуется 5 моль АТФ на 1 моль Г-6-Ф, а по пути Г-6-Ф $\rightarrow$ пропионат $\rightarrow$ 7 моль АТФ.

Производительность гликолитического процесса у пластинчатожаберных моллюсков низка, например в сердечной мышце устриц за 1 с превращается менее 1 мкмоль глюкозы/г сырой массы (Hochachka, Somero, 1976). У рыб за этот же промежуток времени в гликолитическом процессе расщепляется до 40 мкмоль глюкозы/г сырой массы. Однако, несмотря на низкую производительность гликолитического процесса, у пластинчатожаберных его уровень и специфические адаптации, т.е. сопряженность с обращенной частью ЦТК в анаэробных условиях, обеспечивают образование макроэргов в количестве, достаточном для длительного существования мидий в условиях гипоксии.

Поскольку методом убыли неорганического фосфата в инкубационной среде процесс сопряжения окисления с фосфорилированием обнаружить не удалось, представляло интерес исследовать содержание АТФ в тканях мидий и проследить за изменением его концентрации в разные сезоны.

Содержание адениннуклеотидов в тканях мидий. В различных тканях мидий были определены: содержание адениннуклеотидов и процентное соотношение их концентраций (АТФ:АДФ:АМФ); величина энергетического заряда системы АТФ–АДФ–АМФ, определяемая как соотношение: $\text{АТФ} + 0,5\text{АДФ}/\text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ}$; общее состояние энергетического пула $\text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ}$; отношение концентраций $\text{АТФ}/\text{АДФ}$ и $\text{АТФ}/\text{АМФ}$. Уровень перечисленных показателей определялся спецификой и функциональной активностью тканей. Наиболее высокое содержание АТФ обнаружено в мышцах и гонадах мидий. По сравнению с этими тканями жабры и гепатопанкреас содержат АТФ в 2–2,5 раза меньше. В последних отмечен более низкий уровень энергетического заряда. По сравнению с мышечной тканью позвоночных для всех тканей мидий характерно более низкое отношение аденозинтрифосфатов к ди- и мононуклеотидам ($\text{АТФ}/\text{АДФ}$, $\text{АТФ}/\text{АМФ}$) и равномерное соотношение адениннуклеотидов ($\text{АТФ}/\text{АДФ}/\text{АМФ}$) в общем энергетическом пуле ($\text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ}$) (табл. 24). Следует подчеркнуть, что абсолютные цифры содержания АТФ в тканях моллюсков, приводимые разными авторами, неодинаковы. Некоторые утверждают, что полученные различия зависят от неадекватности применяемых методов экстракции адениннуклеотидов (Wijsman, 1976). Напри-

Т а б л и ц а 24. Содержание и соотношение компонентов адениловой системы в тканях мидий и некоторых позвоночных, мкмоль НАД или НАДФ/г сырой массы

Ткань	АТФ	АДФ	АМФ	АТФ + АДФ + + АМФ	Энергети- ческий заряд	АТФ/АДФ	АТФ/АМФ	АТФ: АДФ: :АМФ, %
Мидия								
Жабры	1,02 ± 0,1	1,4 ± 0,07	1,18 ± 0,1	3,6	0,43	0,73	0,86	30:38:32
Гонады	2,64 ± 0,3	2,0 ± 0,21	2,79 ± 0,3	7,5	0,49	1,30	0,95	35:28:37
Гепатопанкреас	0,96 ± 0,1	1,3 ± 0,06	1,70 ± 0,1	3,9	0,37	0,57	0,44	24:33:43
Мышцы	2,42 ± 0,2	2,7 ± 0,10	2,85 ± 0,3	8,0	0,47	0,80	0,85	31:34:24
Ставрида *								
Красная латеральная ткань	3,13 ± 0,1	1,2 ± 0,05	0,51 ± 10,02	4,8	0,65	2,61	6,10	65:25:10
Крыса**								
Сердечная мышца	5,3	1,1	0,9	7,3	0,80	5,3	6,90	72:15:12

* По данным В.В. Трусевича (1978).

** По данным Звана (Zwaan, Wijsman, 1976).

мер, одни исследователи экстракцию нуклеотидов производили в HClO_4 (Zs-Nagy, 1977), другие в ТХУ (трихлоруксусная кислота) (Wijman, 1976). По данным Т.С. Визмана, хлорная кислота для экстракции нуклеотидов является очень сильной кислотой и экстрагируемый в ней АТФ разлагается на АДФ и Р_н, что и объясняет низкие величины, полученные И.Наги. Однако дальнейшие исследования И. Наги, проведенные по этому вопросу, отрицают результаты Т.С. Визмана (Zs-Nagy, 1977).

Мы проверили влияние этих кислот на уровень содержания адениннуклеотидов и установили, что разложение АТФ в HClO_4 экстрактах происходит при длительном хранении препаратов. Обработка экстрактов непосредственно после их выделения не отражается на количестве содержания АТФ. Вероятно, более низкие цифры, полученные нами для *M. galloprovincialis*, объясняются влиянием окружающих условий на мидий.

Влияние температуры и половой цикличности на энергетический заряд мидий. В течение годового цикла отношения АТФ/АТФ + АДФ + АМФ и АДФ + АМФ/АТФ + АДФ + АМФ изменяются. Летом для всех исследуемых тканей, исключая гонады, наблюдается незначительное снижение концентрации АТФ и возрастание суммы АДФ и АМФ. В количественном отношении последние два соединения являются преобладающими в аденилатной системе (рис. 32).

Снижение концентрации АТФ при повышении температуры окружающей среды было отмечено и в условиях эксперимента, когда мидии, взятые из моря при температуре 18°С, выдерживались в термостате при температуре 25°С. Пребывание мидий в этих условиях в течение 48 ч вызывало значительное снижение концентрации АТФ и незначительное повышение АМФ. Энергетический заряд при этом падал почти в 2 раза (табл. 25).

Снижение содержания АТФ в тканях мидий при повышении температуры окружающей среды, очевидно, связано с тем, что мидии являются бореальными формами и наиболее благоприятным температурным режимом для них является 14–20°С (Воробьев, 1938).

Динамика аденилатной системы в гонадах мидий в течение годового цикла несколько отлична от динамики этой системы в других тканях и зависит от интенсивности протекающих в ней процессов синтеза и созревания половых продуктов. Летом, в период полового покоя, отмечено увеличение содержания АТФ в гонадах. Осенью, когда происходит подготовка к осеннему размножению, содержание АТФ в гонадах падает. Такое же снижение содержания АТФ наблюдается и перед весенним размножением мидий. Очевидно, колебание содержания АТФ в тканях, аналогичное колебаниям содержания таких основных органических веществ, как жиры, белков и углеводов, связано с состоянием гонад, которые в период гаметогенеза составляют до 70% массы моллюска, и цикличностью процессов размножения моллюсков в течение года. Высокое содержание макроэргов в гонадах летом определяется периодом полового покоя. В сентябре – октябре, когда происходит подготовка к осеннему размножению, концентрация АТФ в гонадах сни-

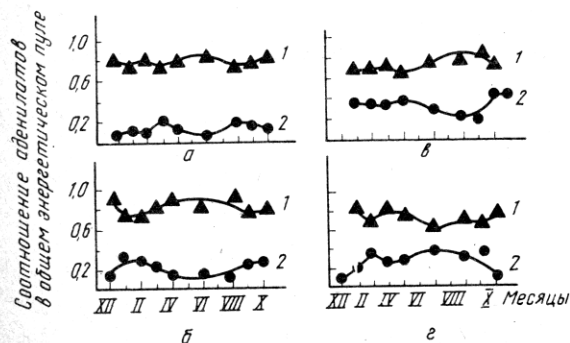


Рис. 32. Сезонная изменчивость аденилатов в общем энергетическом пуле тканей мидий:

а – печень; б – жабры; в – мышцы; г – гонады; 1 – АДФ + АМФ/АТФ + АДФ + АМФ; 2 – АТФ/АТФ + АДФ + АМФ

Т а б л и ц а 25. Влияние температуры на содержание аденилатов в тканях мидий, мкмоль НАД или НАДФ/г сырой массы

Время пребывания мидий при 24° С, ч	Аденилатная система тканей			
	Мышцы			
	АТФ	АДФ	АМФ	Энергетический заряд
Контроль	2,45 ± 0,10	2,05 ± 0,15	2,17 ± 0,11	0,52
17	1,54 ± 0,13	2,70 ± 0,03	3,46 ± 0,03	0,37
48	0,93 ± 0,09	1,27 ± 0,08	3,69 ± 0,69	0,26

Продолжение

Время пребывания мидий при 24° С, ч	Аденилатная система тканей			
	Жабры			
	АТФ	АДФ	АМФ	Энергетический заряд
Контроль	0,49 ± 0,05	2,12 ± 0,02	1,09 ± 0,01	0,41
17	—	—	—	—
48	0,18 ± 0,05	1,6	1,5	0,29

Примечание. $P = 0,01$.

жается. Нами также было показано, что содержание АТФ зависит от стадии зрелости гонад. Наименьшее ее количество содержится в гонадах I и II стадий зрелости и повышается в III и IV.

Установить прямую зависимость между интенсивностью дыхания мидий и уровнем содержания АТФ в гонадах не удалось, несмотря на то что в период гаметогенеза интенсивность дыхания особой повышается. Очевидно, более низкий уровень содержания АТФ в гонадах в период гаметогенеза, несмотря на высокую активность дыхания этой ткани, можно объяснить преобладанием в этот период процессов потребления энергии над процессами ее генерации.

Таким образом, все приведенные показатели аденилатной системы свидетельствуют о том, что в тканях мидий по сравнению с тканями позвоночных отмечается более низкий уровень концентрации АТФ. Противоположные данные получены для АДФ и АМФ, содержание которых как по абсолютным, так и относительным показателям выше, чем у позвоночных. По нашим и литературным данным, процентное соотношение между концентрациями отдельных адениннуклеотидов (АТФ:АДФ:АМФ) в тканях мидий и позвоночных различно. В аденилатной системе мышц мидий это соотношение составляет 31:34:24, в то время как в мышцах ставриды оно равно 65:25:10, а в сердечной мышце крыс — 75:15:12 (см. табл. 31). Эти данные показывают, что основное отличие системы аденилатов мышц мидий и позвоночных заключается в равномерном содержании АТФ, АДФ, АМФ в мышечной ткани моллюсков. Поскольку энергетическое состояние ткани определяет степень заряженности АМФ высокоэнергетическими фосфатными связями, аденилатную систему тканей мидий можно охарактеризовать как слабоэнергизированную. Такое же состояние аденилатной системы обнаружено у пресноводных двустворчатых моллюсков рода *Anodonta* и некоторых низших позвоночных (Деркачев и др., 1976; Трусевич, 1978).

Таким образом, в тканях *M. galloprovincialis* по сравнению с тканями других организмов обнаружен более низкий энергетический заряд.

Полученное различие мы не можем объяснить методическими причинами, поскольку, несмотря на то что экстракция аденилатов проводилась нами HClO_4 , спектрофотометрическое их определение было сделано непосредственно после выделения. Очевидно, более низкий энергетический заряд обусловлен низкой соленостью

морской воды, в которой обитает черноморская мидия *M. galloprovincialis*. По данным А. Ивановского (Ivanović, 1980), с уменьшением солености ниже 20‰ величина энергетического заряда снижается до 0,5.

Как отмечалось в начале этой главы, уровень энергетического заряда в тканях высших животных находится в пределах 0,7–0,9, в этих же пределах осуществляется регуляция активности ферментов. Поскольку энергетический заряд в тканях мидий колеблется в пределах 0,5–0,6, можно предположить, что, во-первых, максимальная регуляция ферментов у мидий происходит в пределах ниже 0,7–0,9, во-вторых, ферменты, регулирующие АМФ, менее чувствительны к этому аденилату, так как его концентрация в тканях мидий повышена.

В последнее время в литературе появились работы, в которых предпринималась попытка установить связь между такими показателями, как интенсивность дыхания, таксономия и морфология вида, его экологические характеристики (уровень подвижности, глубина обитания) и содержанием в тканях АТФ (Ansell, 1977). Однако установить такую зависимость не удалось. Вариации в интенсивности потребления кислорода у разных моллюсков не отражались на уровне концентрации АТФ в тканях (Ansell, 1977). Не были обнаружены достоверные различия в содержании АТФ у моллюсков из двух разных популяций (искусственно созданной и естественной), отличающихся устойчивостью к анаэробизму, а также между популяциями, живущими на разных глубинах (Wijsman, 1976). Наибольшие различия в содержании АТФ найдены только у видов, отличающихся экологически. Наибольшее содержание АТФ было обнаружено в теле моллюсков, ведущих более активный образ жизни (Ansell, 1977). Среди видов эпифауны *Chlamys opercularis* АТФ содержат несколько больше, чем менее подвижный *Lima hians*, и значительно больше, чем прикрепленные формы *Mytilus edulis*, *Modiolus phaseolinus* и *Ostrea* (Ansell, 1977). Увеличение содержания АТФ в теле моллюсков, связанное с увеличением подвижности, очевидно, обуславливается интенсификацией в митохондриях окислительных процессов, приводящих к усиленному образованию молекул АТФ.

Данные о состоянии адениннуклеотидной системы тканей мидий в отдельные периоды годового цикла могут служить, как показатели их состояния, так и для оценки качества среды.

ГЛАВА 6. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН МИДИЙ В АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

Одним из важных приспособлений у моллюсков к существованию в среде с пониженным содержанием кислорода является снижение интенсивности обмена. Интенсивность обмена у *M. edulis* в условиях гипоксии снижается более чем в 18 раз (Zwaan, Wijsman, 1976). Аналогичные расчеты, проведенные нами для *M. galloprovincialis*, свидетельствуют о снижении расхода энергии в 20 раз. Столь близкие цифры, полученные для двух видов моллюсков разными авторами, позволяют утверждать, что допустимый уровень снижения обмена для пластинчатожаберных моллюсков находится в указанных пределах. Уменьшение интенсивности поглощения кислорода происходит не только при снижении напряжения кислорода, но и при других экстремальных условиях, например при резком понижении температуры и осмотического давления (Baume, 1974; Биргер, 1979), увеличении концентрации ионов тяжелых металлов, нехватке пищи (Swani, Reddy, 1978). Так, брюхоногие моллюски *Pila ovata*, *Balimulus nassatus* потребляют при голодании только 17% того количества кислорода, которое требуется им при активном состоянии. Т.И. Биргер (1979) подчеркивает, что время переключения бентосных животных на анаэробный обмен зависит от оксифильности организмов и степени развитости у них приспособительных механизмов. К физиологическим механизмам относится запасание кислорода в мантийной жидкости. К молекулярным механизмам адаптации моллюсков к условиям гипоксии можно отнести большое содержание каротиноидов, являющихся аккумуляторами кислорода в клетке (Карнаухов, 1978), увеличение концентрации кальция в лимфе за счет растворения раковин-

ны (Алякринская, 1979), который регулирует уровень pH крови и дает возможность избежать ацидоза тканей.

Основным механизмом молекулярной адаптации моллюсков — факультативных анаэробов к существованию в среде, лишенной кислорода, являются особенности биохимической организации их гликолитической системы и дикарбоновой частью ЦТК, позволяющие функционировать в этих условиях длительное время и достаточно эффективно. Такого рода адаптации обозначили как эксплуативную, поскольку она способствует лучшей приспособленности популяции к прежней среде обитания и проникновению ее в новые биотопы (Хочачка, Сомеро, 1977).

Субстраты анаэробного обмена

Гликоген. Углеводы являются основным энергетическим источником дыхания у двусторчатых моллюсков при анаэробных условиях, когда доминирующую роль в обмене играет гликолиз или гликогенолиз. Это отражается и на структуре органических компонентов их тела. Запасы углеводов у двусторчатых моллюсков чрезвычайно высоки (до 40% на сухую массу) и резко преобладают над запасами липидов, играющих в основном роль структурных элементов (Bourcart, Lubet, 1965; Giese, 1966).

Углеводы представлены у моллюсков в основном гликогеном. Количество свободных сахаров в гемолимфе *M. edulis* колеблется от 16 до 77% (Бауне, 1973). Содержание олигосахаров в тканях *M. edulis* 100–1100 мг·% на сырую массу ткани (Fraga, Lopez-Carout, 1958). В тканях *M. galloprovincialis* свободные сахара составляют, по нашим данным, от 100 до 300 мг·% и только в гепатопанкреасе количество их достигает 1,5–2%. Свободные сахара могут служить энергетическим источником при анаэробии примерно от 25 до 190 мин в зависимости от сезона (Бауне, 1973).

Мы провели анализ содержания основных энергетических резервов — жира и гликогена — у отдельных групп морских беспозвоночных. Выявлено три группы,

Т а б л и ц а 26. Содержание основных энергетических резервов у различных групп морских беспозвоночных, % на 1 г сухой массы

Группа животных	Жир	Гликоген	Жир/Гликоген	Литературный источник
Губки	2,7–13,3	0,2–0,9	16,0	Giese, 1966
Кишечнополостные	8,0–10,1	0,3–1,0	15,0	То же
Черви				
планктонные	2,5–4,4	1,3–5,9	0,9	”
бентосные	5,7–10,9	9,3–13,7	0,7	”
Ракообразные				
планктонные	15,0–22,3	0,1–0,2	110,0	”
мигрирующие				
планктонные	1,2–2,3	0,2–0,4	5,0	”
немигрирующие				
бентосные	2,3–6,3	0,5–1,2	5,0	”
Моллюски				
панцирные	3,5–10,6	0,7–1,6	6,0	”
пластинчатожаберные	4,6–10,6	3,9–30,0	0,5	Данные авторов
брюхоногие	4,1–7,5	1,1–10,8	0,9	Giese, 1966
головоногие	0,8–1,0	0,08–0,1	13,0	Данные авторов
(осьминоги)				
Кальмары	1,0–1,4	0,07–0,09	17,0	То же
Иглокожие	2,4–3,2	0,03–0,1	27,0	Giese, 1966
Оболочники	4,0–11,3	0,63–1,1	6,0	То же

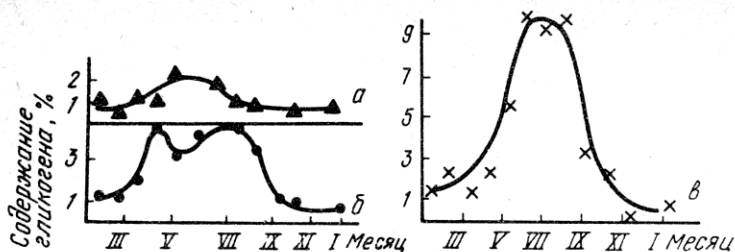


Рис. 33. Сезонная изменчивость содержания гликогена в тканях мидий:
а — мышцы; б — гепатопанкреас; в — гонады

четко различающиеся по соотношению жира и гликогена. К группе с самым низким отношением — меньше единицы — относятся двусторчатые моллюски, прикрепленные иглокожие, бентосные черви и оболочники (табл. 26). Количество гликогена у этой группы составляет 6–30% на сухую массу ткани. Ко второй группе относятся планктонные немигрирующие формы, большинство нектобентосных и многие бентосные формы. Содержание гликогена у них достигает 0,2–3,9% на сухую массу, отношение жира и гликогена находится в пределах от 5 до 27. К третьей группе относятся планктонные мигрирующие формы, в основном ракообразные. Содержание гликогена у них самое низкое — до 0,2% на сухую массу, а отношение жира к гликогену достигает 100%.

Из приведенных данных ясно, что такие черты экологии животных, как подвижность и ареал обитания, откладывают свой отпечаток на формы аккумуляции энергии и на особенности энергетического обмена. Очевидно, углеводный обмен играет доминирующую роль у бентосных прикрепленных беспозвоночных, адаптированных к существованию в условиях дефицита кислорода. Этот факт является примером биохимической адаптации, связанной с преобладанием гликолитического пути энергетического обмена.

В ряде работ показано, что содержание углеводов у мидий подвержено значительным колебаниям в зависимости от сезона и степени половозрелости моллюсков (Виноградова, 1950). Значительно меньше данных относительно наличия и изменчивости углеводов в отдельных тканях мидий, причем преобладают гисто-

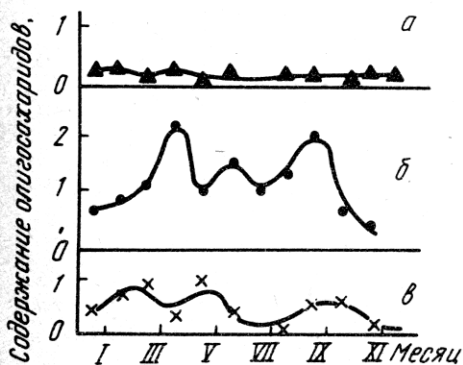


Рис. 34. Сезонная изменчивость олигосахаридов в тканях мидий:
а — мышцы; б — гепатопанкреас; в — гонады

химические работы, проведенные на средиземноморской *M. edulis* (Fraga y Lopes-Caront, 1958; Renzoni, 1961; Bourcart, Lubet, 1965). Изучение содержания углеводов в тканях черноморских мидий показало, что наиболее высокий их уровень наблюдается в гонадах, составляя 5–6% на сырую массу ткани в среднем за год. В гепатопанкреасе содержится от 2,9 до 4,4%, в ресничном крае — 3,6, в мышцах — 2,5 и в жабрах — 1,3%. Колебания содержания гликогена и олигосахаридов были изучены на протяжении годового цикла.

Максимальное содержание гликогена во всех тканях мидий наблюдается в весен-

не-летний период (апрель—июль), когда в море имеется богатая кормовая база и процессы питания и биосинтеза мидий активны (рис. 33). В гонадах количество гликогена в июле — августе достигает 10—13% на сырую массу, превышая зимние величины в 5—6 раз. Во всех тканях, кроме гонад, наблюдается два пика содержания гликогена, резкий спад в апреле — мае и октябре — ноябре связан с размножением мидий.

Динамика олигосахаридов находится в обратной зависимости от изменений гликогена (рис. 34). Высокое их содержание в тканях мидий наблюдается в те периоды, когда уровень гликогена падает, т.е. в периоды активного гаметогенеза и размножения. Приведенные данные свидетельствуют о высоком уровне метаболических процессов у мидий в указанные периоды, в которых гликоген является основным энергетическим субстратом.

Данных по скорости утилизации гликогена в условиях гипоксии имеется немного и они неоднозначны. В ряде работ подчеркивается, что по некоторым причинам не всегда удается уловить разницу между потреблением гликогена у моллюсков, содержащихся в аэробных и анаэробных условиях (Zwaan, Wijsman, 1976; Ваупе, 1976). Прежде всего, у моллюсков, находящихся в условиях анаэробно-за, уровень метаболизма резко снижается, составляя около 10% аэробного (Kluutman, Zwaan, 1976) и поэтому, вероятно, энергетические источники утилизируются менее интенсивно. Кроме того, у моллюсков обычно наблюдаются чрезвычайно широкие индивидуальные колебания содержания гликогена и других субстратов, что связано, очевидно, с различиями в их физиологическом состоянии и степени накормленности. Для одного и того же вида получаемые результаты зависят от температуры, стадии половой зрелости, условий содержания контрольной группы. При длительных экспериментах с анаэробнозом на результаты накладывается фактор голодания.

Особенно много гликогена в условиях дефицита кислорода расходуется у моллюсков при высокой температуре, когда метаболизм достигает максимального уровня. При низкой температуре моллюски могут переносить анаэробноз более длительное время. Однако и при летней спячке моллюсками потребляется относительно мало гликогена. У улиток *Pila globosa* Lam. за 6 мес спячки использовался в основном гликоген пищеварительных желез, в гонадах он оставался почти неизменным (Meenakshi, 1956). Судя по данным автора, за это время использовалось менее 50% имеющегося запаса гликогена, что свидетельствует о чрезвычайно низком уровне обмена, имеющем, несомненно, экологическое значение и связанным прежде всего с малоподвижным образом жизни.

По предположению К.Годдарда и А.В.Мартина, переход моллюсков на анаэробное дыхание во время летней спячки является приспособлением к более экономному использованию энергетических резервов (Goddard, Martin, 1966). При измерении интенсивности обмена у *Helix pomatia* Linne во время летней спячки оказалось, что значительное понижение его наблюдается только в гонадах, в мышцах и гепатопанкреасе сохраняется относительно высокий уровень обмена.

Судя по немногочисленным литературным данным, гликоген является основным субстратом анаэробного дыхания у червей и ракообразных (Брандт, 1951).

В опытах с разными пресноводными моллюсками установлены видовые различия в скорости утилизации гликогена в анаэробных условиях, причем у более устойчивых к анаэробнозу видов утилизация проходит менее интенсивно и не наблюдается накопления молочной кислоты (Brand et al., 1950). В опытах на *M. edulis* показано потребление гликогена в мышцах и гепатопанкреасе при 48-часовом анаэробнозе (Zwaan et al., 1972). Интенсивность потребления зависит от температуры. При 20°С она была вдвое больше, чем при 6°С. По подсчетам автора, за 48 ч мидии утилизировали от 2,8 до 24% гликогена. В длительном эксперименте с *M. californianus* Conrad, содержащихся при пониженном напряжении O_2 (135 и 58 мм Hg), была отмечена лишь тенденция к понижению содержания гликогена в гепатопанкреасе и мышцах, в мантии же уровень его остается постоянным (Ваупе et al., 1976). При 48-часовом анаэробнозе *M. edulis* не обнаружено значительного снижения содержания гликогена в тканях моллюска (de Vooy, 1979).

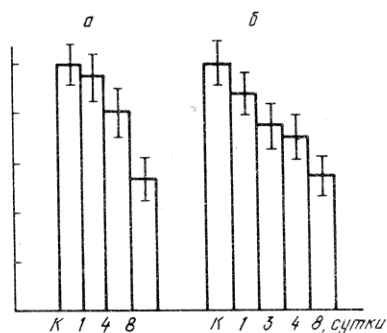


Рис. 35. Утилизация гликогена в тканях мидий в анаэробных условиях:

а — гепатопанкреас; б — мышцы;
К — контроль

По нашим данным, утилизация гликогена в мышцах и гепатопанкреасе мидий, находившихся в анаэробных условиях от 1 до 8 сут, зависит от длительности экспозиции и сезона (рис. 35). Так, на вторые сутки содержание гликогена в тканях у *M. galloprovincialis* снижалось на 5–6% по отношению к контролю, на восьмые сутки уже на 50%. Наиболее интенсивный расход гликогена наблюдался в марте и мае, когда происходило массовое созревание гонад и вымет половых продуктов, в январе он был значительно слабее.

При действии на мидий различными токсинами мы получили данные о снижении содержания гликогена в гепатопанкреасе мидий на 20–40% по сравнению с контролем. Степень утилизации гликогена находилась в прямой зависимости от токсичности и концентрации ядов. Наиболее сильное снижение содержания глико-

гена наблюдалось в растворе ТБТО (трибутилтриоловооксид), где оно достигало 20% при разведении яда 1:10 и 40% при разведении 1:50. В гипоксическом контроле уровень содержания гликогена снижался на 15%. В мышцах гликоген снижался практически одинаково. Уровень содержания олигосахаридов изменялся в обратной зависимости по отношению к изменениям гликогена.

Поскольку у мидий в анаэробиие наряду с гликолилизом функционирует частично и цикл Кребса, можно ожидать участия в энергетическом обмене соединений других классов. В ряде работ показано, что жиры никогда не являются субстратом при анаэробиие морских моллюсков, наземных улиток, гельминтов и аннелид (Hochachka et al., 1973). Однако на *M. edulis* было получено, что липиды утилизируются в анаэробных условиях через β -окисление с образованием ацетила-СоА, при этом осуществляется фосфорилирование на субстратном уровне (Zwaan, Wijman, 1976). Авторы отмечают, что высокая оборачиваемость углеводов и липидов по меченому CO_2 наблюдалась в тканях мантии *Mya*.

Наиболее сложным является вопрос о включении в анаэробный обмен аминокислот. Некоторые специалисты (Hochachka et al., 1973) считают, что отдельные аминокислоты могут быть как субстратами, так и продуктами анаэробного обмена. Эти авторы отмечают факты утилизации аспартата и глутамата и подчеркивают большую роль аминокислот в анаэробном обмене. Другие авторы эту роль аминокислот отрицают, при этом отмечается, что в связи с постоянством содержания аминокислот в тканях мидий при анаэробиие роль их в качестве субстрата анаэробного обмена сомнительна (Zwaan et al., 1976). Однако в последнее время этими авторами получены данные о снижении в тканях мидий аспартата при 2-суточном анаэробиие (Zurborg, Kluytmans, 1980). Авторы приходят к выводу, что аспартат является субстратом в анаэробных условиях.

Таким образом, очевидно, что основным субстратом анаэробного обмена у моллюсков являются углеводы, сопутствующими же субстратами служат аминокислоты и липиды. Следует подчеркнуть, что углеводы являются тем единственным энергетическим источником, который способен расщепляться с образованием макроэргических связей без изменения уровня окислительно-восстановительного потенциала в клетке.

Глюкоза. Содержание глюкозы в мышцах мидий составляет 0,66, а в жабрах — 1,1 мкмоль/г сырой массы. Динамика глюкозы в мышечной ткани мидий в условиях гипоксии противоположна динамике гликогена. В мышечной ткани отмечено возрастание концентрации глюкозы уже в первые часы гипоксии. Установленный при кратковременной гипоксии уровень глюкозы сохраняется и при длительной гипок-

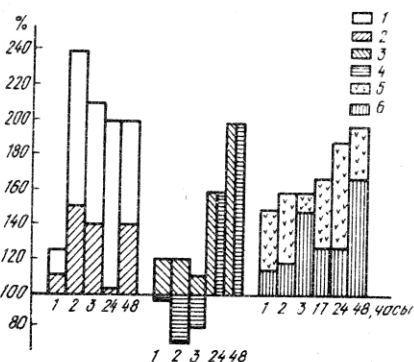


Рис. 36. Содержание интермедиатов гликолиза и дикарбоновой части ЦТК в мышцах мидий в условиях гипоксии, % к контролю:

1 — глюкоза; 2 — Г-6-Ф; 3 — ФДФ; 4 — ДОАФ; 5 — ФЭП; 6 — пируват

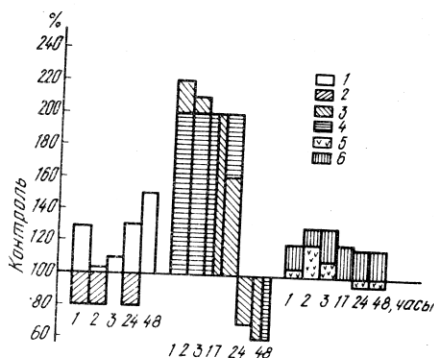


Рис. 37. Содержание интермедиатов гликолиза и дикарбоновой части ЦТК в жабрах мидий в условиях гипоксии, % к контролю. Обозначения те же, что на рис. 36

сии (рис. 36). Повышение уровня глюкозы в мышцах мидий может происходить за счет расщепления гликогена или ресинтеза ее из конечных продуктов углеводного обмена. При длительной гипоксии источником глюкозы, вероятно, может быть только расщепление гликогена, так как ее ресинтез в этих условиях подавлен. Аналогичное повышение уровня свободной глюкозы было отмечено в эмбриональной ткани рыб в анаэробных условиях (Мильман, Юровицкий, 1973). Возможность ресинтеза глюкозы отличает мышечную ткань мидий от мышечной ткани позвоночных, у которых ресинтез углеводов происходит в основном в печени. Уровень глюкозы в жабровой ткани мидий в условиях гипоксии несколько повышается по сравнению с нормой, однако это повышение ниже, чем в мышечной ткани (рис. 37).

Промежуточные продукты

Из метаболитов гликолитического процесса нами был исследован уровень продуктов реакций, которые могут быть лимитирующими звеньями интенсивности всего процесса гликолиза. К ним относятся продукты ГК (гексокиназа) и ФФК-реакций — Г-6-Ф и ФДФ. Концентрация Г-6-Ф и ФДФ в мышечной ткани мидий составляет соответственно 0,152 и 0,098 мкмоль/г сырой массы (табл. 27). Эти величины несколько отличны от известных для королевского краба *C. samtshatica* (Freed, 1971). У краба концентрация ФДФ почти в 10 раз ниже, чем Г-6-Ф, в то время как у мидий эти различия незначительны.

Изменение концентрации гексоз в тканях мидий зависит от длительности условий гипоксии. При кратковременной гипоксии (1, 2 и 3 ч) концентрация Г-6-Ф увеличивается на 60–70%. Увеличение концентрации ФДФ менее значительно и составляет 20% нормы (см. рис. 36, 37). Аналогичное изменение содержания фосфорилированных гексоз отмечено для низших позвоночных. В анаэробных условиях, усиливающих скорость гликолиза, наблюдалось повышение отношения Г-6-Ф к ФДФ.

При длительной гипоксии концентрация ФДФ продолжает увеличиваться, достигая 200% нормы. В этот же период наблюдается снижение концентрации Г-6-Ф. Эти данные хорошо согласуются с исследованиями, в которых на мышце мидий было показано, что в первые часы гипоксии лимитирующим звеном процесса гликолиза является ФФК (Eberink, Zwaan, 1980). Лимитирование общей скорости процесса этим ферментом, очевидно, обуславливает незначительное нарастание при кратковременной гипоксии содержания ФДФ по сравнению с Г-6-Ф. При длительной гипок-

Т а б л и ц а 27. Содержание интермедиатов в тканях разных животных, мкмоль/г сырой массы

Интерме- диаты	Карась* (мышцы)	Краб* (мышцы)	Аскарида**	Мидия			
				мышцы		жабры	
Глюкоза	0,50	0,53	—	0,66		1,10	
Г-6-Ф	0,20	0,83	0,32	0,16		0,06	
Ф-6-Ф	0,03	0,09	0,05	—		—	
ФДФ	0,45	0,016	0,02	0,098		0,032	
ДОАФ	0,07	0,02	0,19	0,106		0,047	
ФЭП	0,04	0,02	0,28	Зима	Весна	Зима	Весна
Пируват	0,045	0,03	0,14	0,01	0,03	0,03	0,08
ЩУК	—	—	—	0,01	0,02	0,02	0,06
Малат	—	—	—	0,035	0,062	0,06	0,10
				0,037	0,396	0,08	0,20

*Freed, 1971.

** Barret, Beis, 1975.

сии лимитирующее звено гликолиза перемещается на стадию превращения фосфо-энолпирувата, что обуславливает снижение концентрации Г-6-Ф и увеличение Ф-1,6-ДФ. Несколько иная картина изменения концентрации Г-6-Ф и Ф-1,6-ДФ наблюдается в жаберной ткани мидий. Концентрация Г-6-Ф в этой ткани в первые часы гипоксии незначительно падает (на 20% нормы) и сохраняется на этом уровне при длительной гипоксии. Концентрация Ф-1,6-ДФ в первые часы гипоксии значительно превышает нормальный уровень, однако при длительной гипоксии (24–48 ч) отмечается уменьшение содержания этого вещества. Различное изменение промежуточных продуктов гликолиза в мышечной и жаберной ткани, очевидно, связано с тем, что эти ткани в условиях гипоксии ведут себя по-разному. Для мышечной ткани в основном характерно протекание процесса гликолиза, в то время как для жаберной ткани даже в условиях гипоксии продолжает функционировать ЦТК (Chaplin, Loxton, 1976).

Увеличение содержания ФДФ в период гипоксии отмечено для мышц (Деркачев и др., 1976) и эмбриональной ткани рыб (Мильман, Юровицкий, 1973). Основываясь на литературных и полученных нами данных, можно предположить, активность каких ферментов определяет концентрацию дифосфорилированных гексоз в условиях гипоксии. Как известно, концентрация в тканях Ф-1,6-ДФ определяется активностью трех ферментов – ФФК, альдолазы и ФДФазы. При 24–48-часовой гипоксии активность ФДФазы снижается (Горомосова, Таможняя, 1980). Это уменьшает поток Ф-1,6-ДФ в направлении глюконеогенеза. В этих условиях внутриклеточную концентрацию Ф-1,6-ДФ определяют в основном такие ферменты гликолиза, как ФФК и альдолаза. Подтверждением этому является синхронное изменение в тканях мидий Ф-1,6-ДФ и триозофосфатов. Так, в мышечной ткани мидий в условиях гипоксии увеличение концентрации Ф-1,6-ДФ сопровождается увеличением концентрации триозофосфатов и, наоборот, в жаберной ткани уменьшение концентрации Ф-1,6-ДФ вызывает уменьшение концентрации триозофосфатов (см. рис. 36, 37).

Важными регулирующими реакциями являются ПК и ФЭПКК, активность которых определяет интенсивность преобразования триозофосфатов. Субстратом для обеих реакций служит ФЭП, а продуктом реакции ПК является пируват. Последний является одновременно субстратом ЛДГ и АЛАТ-реакций. Динамика содержания этих субстратов, таким образом, может являться характеристикой конечного участка гликолиза.

Содержание ФЭП в мышцах и жабрах колеблется от 0,02 до 0,08 мкмоль/г сырой массы, пирувата – 0,01–0,07, что отражает сезонную варибельность этих величин.

В условиях кратковременного анаэробноза наблюдается повышение содержания пирувата и ФЭП в мышцах на 20–60%, в жабрах – на 10–30, что отражает лимитирующую роль данного звена гликолиза. Еще сильнее это выражено в мышцах при 24- и 48-часовой экспозиции, когда уровень ФЭП и пирувата на 100% превышает контрольный. В жабрах, напротив, при длительном анаэробнозе содержание пирувата уменьшается, а ФЭП становится ниже уровня контроля. Это согласуется с литературными данными о возможности функционирования в этой ткани ЦТК в анаэробных условиях (Chaplin, Loxton, 1976).

Как будет показано ниже, динамика содержания пирувата в мышцах и жабрах мидий хорошо согласуется с активностью АлАТ в этих тканях при 48-часовом анаэробнозе.

Повышение содержания ФЭП, пирувата и других метаболитов гликолиза в анаэробнозе наблюдается в тканях зародыша вьюна (Мильман, Юровицкий, 1973; Прохорова и др., 1975).

Уровень ЩУК в тканях является результатом динамического равновесия многих реакций. Конечным результатом одних является образование ЩУК, других – ее расход. Одной из активно функционирующих в тканях мидий реакций, приводящих к образованию ЩУК, является реакция карбоксилирования ФЭП с дальнейшим превращением образовавшейся ЩУК в малат. Реакция ЩУК → малат направлена в сторону образования малата и окисления НАДН. Это приводит к поддержанию в тканях мидий концентрации ЩУК на низком уровне и к регенерации НАД для гликолитического процесса (Хочачка, Сомеро, 1977). Концентрация малата и ЩУК в мышечной и жаберной тканях мидий зависит от сезона. Содержание ЩУК и малата в зимний период выражается близкими единицами (0,035 и 0,037 мкмоль/г сырой массы), а весной содержание этих метаболитов различно (0,062 и 0,396 мкмоль/г сырой массы). Наиболее низкое содержание малата в мышечной ткани мидий отмечено зимой. Весной наблюдалось повышение концентрации малата и соответствующее уменьшение концентрации ЩУК. Таким образом, в различные месяцы между содержанием ЩУК и малата наблюдается обратная зависимость. В жаберной ткани эта зависимость проявляется в меньшей степени (рис. 38). Обратная зависимость между концентрациями этих веществ была получена для *M. edulis*

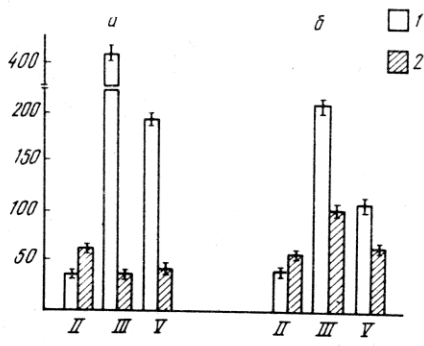


Рис. 38. Содержание в тканях мидий ЩУК и малата в разные месяцы: а – мышцы; б – жабры; 1 – ЩУК; 2 – малат

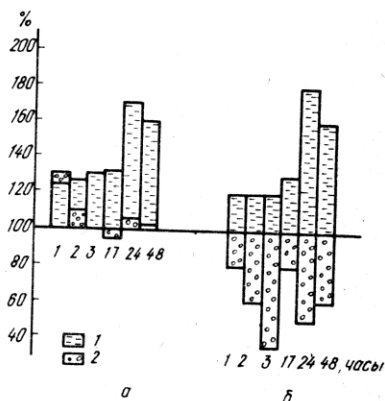


Рис. 39. Содержание ЩУК и малата в тканях мидий в условиях гипоксии, % от контроля: а – мышцы; б – жабры; 1 – малат; 2 – ЩУК

Таблица 28. Отношение малат/ЩУК в тканях мидий в условиях гипоксии

Ткань	Время гипоксии, ч				
	1	2	3	17	24
Мышцы	1,1	1,1	1,2	1,4	1,6
Жабры	1,5	1,9	2,6	3,2	2,6

(Bayne et al., 1976). Однако максимальное содержание малата отмечено В.Л. Бейном в зимний период. Можно предположить, что противоречивость результатов не является случайной и объясняется экологией исследуемых видов. Как было отмечено, *M. galloprovincialis* является бореальной формой, температурный оптимум которого находится в пределах 14–16° С. Более высокие температуры воды в мае 1979 г., когда проводились эти исследования, по сравнению с обычными для этого периода могли вызвать некоторое подавление интенсивности аэробного обмена и усиление анаэробного, что вызвало увеличение концентрации малата.

В условиях гипоксии изменение концентрации ЩУК и малата также протекает в противоположных направлениях. Уже после 1 ч содержания моллюсков в морской воде, лишенной кислорода, в мышечной и жаберной тканях происходит накопление малата до 120–130% нормы. После 48 ч гипоксии содержание малата в тканях увеличивается до 160% нормы. В этих же условиях в тканях мидий наблюдалось уменьшение содержания ЩУК. Исключением является некоторое увеличение концентрации ЩУК в мышечной ткани при кратковременной гипоксии (рис. 39). При сопоставлении концентраций малата и ЩУК в мышечной и жаберной тканях получено, что отношение концентраций малат/ЩУК в период гипоксии увеличивается (табл. 28).

Увеличение этого отношения в условиях гипоксии было отмечено для тканей *M. californianus* (Bayne et al., 1976) и *M. edulis* (Vooys, 1976).

В.Л. Бейн установил, что накопление малата в тканях моллюсков происходит в гипоксических условиях любой продолжительности (от 1 ч до 16 сут). Характер гипоксии (выдерживание моллюсков в морской воде без кислорода или на воздухе) не отражается на динамике накопления этого вещества. Образовавшийся малат не является конечным продуктом катаболизма углеводов. Дальнейшее его превращение может идти двумя путями (Хочачка, Сомеро, 1977). Под действием фумаратредуктазы малат может превращаться в фумарат или под действием "малик-энзим" (малат + НАДФ → НАДФН + CO₂ + пируват) — в пируват. Считают, что превращение малата происходит не в цитоплазме, а в митохондриях, так как малат легко проникает через митохондриальные мембраны (Zwaan et al., 1976). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что гипоксия очень быстро индуцирует изменения метаболического фонда клетки. Через 1 ч после нахождения мидий в условиях гипоксии наблюдалось увеличение концентрации Г-6-Ф, ФДФ, триозофосфатов, малата, пирувата и ФЭП. По соотношению прироста концентрации Г-6-Ф и ФДФ в условиях кратковременной гипоксии можно предположить некоторое лимитирование процесса гликолиза ФФК. В условиях длительной гипоксии изменение указанных метаболитов неоднозначно. К 17–24 ч гипоксии концентрация Г-6-Ф, малата, пирувата и ФЭП по сравнению с первыми часами гипоксии снижается, а Ф-1,6-ДФ продолжает увеличиваться, что свидетельствует о снятии лимитирующего звена в точке действия ФФК. Изменение концентрации ЩУК противоположно перечисленным выше веществам. В условиях гипоксии любой продолжительности наблюдалось уменьшение концентрации ЩУК. Это может происходить за счет интенсивного перехода его в малат или ингибирования образования этого метаболита в цикле Кребса.

Наблюдаемые изменения концентрации промежуточных продуктов свидетельствуют об интенсификации процесса катаболизма углеводов, происходящего на фоне снижения общей интенсивности обмена мидий в условиях гипоксии.

Конечные продукты

Конечные этапы гликолитического процесса у моллюсков весьма сложны. В результате разветвления конечных реакций в клетках аккумулируются различные продукты катаболизма углеводов. Впервые биохимические аспекты этого вопроса были освещены в работе Т. Брандта (1951). Автором обобщены имеющиеся к тому времени данные о природе брожения у различных групп беспозвоночных, потреблении субстратов и накоплении конечных продуктов. Т. Брандт предложил классификацию беспозвоночных на облигатных и факультативных анаэробов. Он показал, что в анаэробных условиях совершаются смешанные ферментативные процессы, в результате которых среди продуктов конечных реакций наряду с молочной кислотой появляются пировиноградная, высшие и низшие жирные кислоты, а также спирт.

Дальнейшее изучение биохимии анаэробного обмена у моллюсков было проведено в 60-е годы (Chain, Awaraga, 1964; Simpson, Awaraga, 1976).

Методом хроматографии впервые идентифицированы у двусторчатых моллюсков *Rangia cuneata* в качестве конечных продуктов анаэробного обмена аланин и сукцинат, образование которых происходило в отношении 1:1. Авторы высказали предположение, что основное количество ФЭП карбоксилируется в ШУК, с дальнейшим превращением ее в цепи малат – фумарат – сукцинат (рис. 40). При этом происходит образование АТФ и восстановление НАД⁺. Для поддержания окислительно-восстановительного баланса служит АлАТ-реакция, при которой происходит окисление НАДН и переход пирувата в аланин. Последующие исследования, проведенные на *M. edulis*, подтвердили основные результаты, полученные на *Rangia cuneata*, однако соотношение между аланином и сукцинатом было иным и менялось в зависимости от времени анаэробной инкубации (Zwaan, Landee, 1972; Zwaan, Marrewijk, 1973; Gåde et al., 1975; Kluytmans et al., 1977). Это послужило толчком к более подробному изучению путей образования конечных продуктов у моллюсков – факультативных анаэробов.

При изучении образования конечных продуктов после 48-часового анаэробно-за у *M. edulis* было показано накопление аланина, сукцината и Д-лактата, которые составили количественно около 50% потребленного гликогена (Zwaan, Landee, 1972; Zwaan, Marrewijk, 1973). С помощью меченых атомов было установлено, что углеродный атом сукцината и аланина является в основном дериватом глюкозы. Авторы определяли, что около половины меченной по ^{14}C глюкозы включается в аминокислоты, в основном аланин и глутаминовую кислоту, около трети — в органические дикарбоновые кислоты, в основном сукцинат и малат. Соотношение

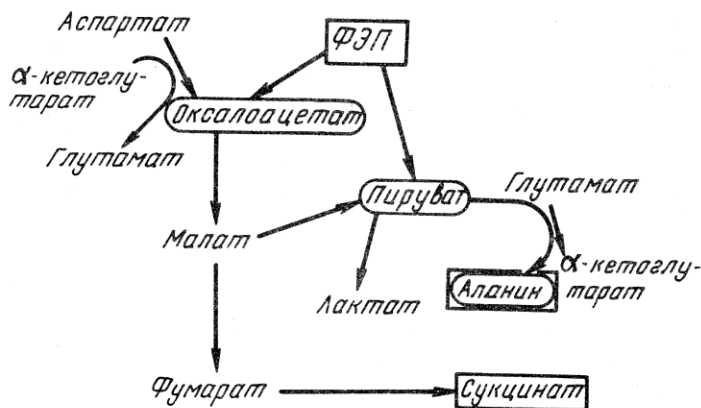


Рис. 40. Конечные этапы гликолиза и сопряженного с ним дикарбонового участка ЦТК

сукцината и аланина составляло после 24-часового анаэробного 2:1, при дальнейшем увеличении времени экспозиции аланин больше не накапливался. Это соотношение отличается от полученного на *Rangia* (Simpson, Awaraga, 1976). Сукцинат, полагают, формируется в митохондриях из перешедшего туда малата, последний частично может преобразовываться через α -кетоглутарат в глутамат (Zwaan, Matgewijk, 1973). Отношение сукцината к глутамату с точки зрения окислительно-восстановительного баланса должно составлять 3:1, что подтверждается экспериментально. Нами получены данные, доказывающие митохондриальную локализацию реакции фумарат $\rightarrow$ сукцинат. Так, в цитоплазматической фракции мышечной ткани мидий после удаления митохондрий образования сукцината не происходило. Предполагают, что образование конечных продуктов идет с учетом трансаминазных реакций (Hochachka, Somero, 1976; Хочачка, Сомеро, 1977). Он основан на одновременном превращении углеводов и аминокислот с помощью АЛАТ-реакции, в которой субстратом является пируват — продукт углеводного распада, а косубстратом — глутамат (аминокислота). В результате этой реакции образуются аланин и α -кетоглутарат. Последний, по мнению авторов, в митохондриях под действием α -кетоглутаратДГ переходит в сукцинил-СоА с последующим образованием сукцината. При этом на уровне сукцинилтиокиназной реакции происходит субстратное фосфорилирование. Сопряжение катаболизма углеводов и аминокислот обеспечивается образованием окислительно-восстановительной пары между фумаратредуктазой и α -кетоглутаратДГ. При образовании аланина, сукцината и пропионата на 1 моль глюкозы необходима мобилизация 2 моль аспартата и 2 моль глутамата. Выход энергии при превращениях этих субстратов составляет 8 моль АТФ.

Специалисты отмечают, что имеющиеся экспериментальные данные не подтверждают большой роли аминокислот в анаэробии (Zwaan et al., 1976). Поступивший в ЦТК через α -кетоглутарат глутамат преобразуется, по их мнению, преимущественно в ЦУК. По последним данным (Zurberg, Kluytmans, 1980), содержание глутамата в тканях мидий в анаэробных условиях увеличивается, тогда как количество аспартата понижается. Эти данные свидетельствуют о том, что аспарат является субстратом, а глутамат — продуктом анаэробного обмена.

Долгое время было неясно, в какие продукты включается 40% меток, которые не обнаружены в образующихся в качестве конечных продуктов аминокислот и органических кислотах. Недавно было установлено, что в тканях *M. edulis* накапливается и экскретируется значительное количество жирных кислот [пропионат, ацетат, бутират и изовалерьяновая кислота (Kluytmans, Zwaan, 1976)]. Эти кислоты начинают накапливаться после 24 ч анаэробии. Через 5 сут содержание ацетата составляло приблизительно 10%, пропионата — 32%, что и составляет в сумме 42% ранее неидентифицированных конечных продуктов анаэробного обмена. Полагают, что образование пропионата происходит в цитоплазме через пропионил-СоА из сукцинил-СоА, при этом генерируется два дополнительных моля АТФ (Хочачка, Сомеро, 1977).

При длительном анаэробии (3 сут) жирные кислоты в большом количестве найдены в межстворчатой жидкости, куда они экскретируются. Высокая концентрация жирных кислот обнаружена также в гемолимфе мидий (Zurberg, Kluytmans, 1980).

Таким образом, основными конечными продуктами у двустворчатых моллюсков в условиях анаэробии являются аланин, сукцинат и пропионат, в меньших количествах накапливаются лактат, глутамат и ацетат. Как в качественном составе, так и в количестве конечных продуктов наблюдаются различия, которые связаны с экологическими и поведенческими реакциями вида. Доказано, что при экспозиции на воздухе таких видов, как *Modiolus demissus*, *Cardium edulis*, *M. californianus*, в межстворчатой жидкости наблюдается относительно высокое содержание кислорода, поскольку эти моллюски открывают периодически створки и кислород воздуха попадает в межстворчатую жидкость (Widdows et al., 1979). Уровень потребления кислорода на воздухе у этих видов составляет 30–80% потребления его в воде. У *M. edulis* и *M. galloprovincialis* створки раковины в этих условиях плотно закрыты и уровень потребления кислорода составляет 4–17% аэробного (Widdows et al., 1979).

Очевидно, различия в экологии этих видов обусловили разную степень интенсивности анаэробного обмена. Так, *Cardium edulis* не накапливает в этих условиях конечных продуктов анаэробного обмена, тогда как *M. edulis* и *M. gallorprovincialis* накапливают те же кислоты, что и в воде без кислорода — аланин, сукцинат, пропионат, глутамат. Таким образом, у мидий и кардиума различные способы удовлетворения энергетических потребностей: у первого — за счет перехода на анаэробное дыхание, у второго — за счет высокого уровня аэробного дыхания.

В заключение следует отметить, что вышеперечисленные продукты анаэробного обмена свойственны также пресноводным моллюскам и другим беспозвоночным, способным к существованию в анаэробных условиях (Брандт, 1951; Хочачка, Сомеро, 1977).

Тканевая специфичность. Имеется небольшое количество работ, посвященных тканевой специфичности энергетического метаболизма у *M. edulis* (Chaplin, Loxton, 1976; Zwaan, Wijsman, 1976; Kluytmans et al., 1977; Zurburg, Kluytmans, 1980). Изучение тканевой специфичности в ходе анаэробных реакций и в накоплении конечных продуктов затруднено вследствие гибкости реакций фумарат-редуктазного комплекса, связанного с состоянием эндогенного метаболического фона. Это может давать флуктуации в качественном и количественном распределении продуктов анаэробного обмена. На *M. edulis* было показано, что такие факторы, как питание, сезонность, репродуктивная активность, возраст и время анкисии значительно влияют на начальный уровень метаболитов в тканях и на ход их накопления (Kluytmans et al., 1977). Например, средние значения начального уровня аланина в двух разных опытах составляли 63,6 и 38,7 мкмоль/г сухой массы. Это, естественно, отразилось на уровне его накопления, так как между содержанием аланина и интенсивностью его накопления существует обратная зависимость (Kluytmans et al., 1980).

На основании имеющихся данных мы попытаемся охарактеризовать тканевую специфику энергетического обмена у мидий в анаэробных условиях. Методом меченых атомов было показано, что при анаэробнозе обмен в тканях резко понижается, однако в гепатопанкреасе и мышцах в меньшей степени, чем в жабрах. При полном анаэробнозе включение метки из глутаминовой кислоты падает до нуля во всех тканях, кроме жабр. Это может свидетельствовать о прекращении работы ЦТК (Chaplin, Loxton, 1976). В жабрах из меченой глюкозы 90% меток переходит в аланин, что подтверждает образование аланина из пирувата. Метка глутамата включается в жабрах во все интермедиаты ЦТК, что может свидетельствовать о работе цикла в этих условиях.

Помимо жабр ЦТК активно функционирует в анаэробных условиях в мантии, которая фиксирует меченый CO_2 , показывая высокую оборачиваемость гликогена и липидов (Zwaan, Wijsman, 1976).

Мышца — ткань, которая содержит небольшое количество митохондрий и обладает высокой активностью гликолиза (Mattisson, Burch-Anderson, 1962). Авторы отмечают высокую активность гликолитических ферментов в этой ткани и считают, что основной путь выхода энергии в этой ткани — гликолитический (Zwaan et al., 1975). Окисление же конечных продуктов, как полагают авторы, происходит в гепатопанкреасе, куда они транспортируются через гемолимфу. Та же картина наблюдается, вероятно, и при анаэробнозе. Так, повышение аланина и глутамата и снижение аспартата ярче всего выражено в мускуле-аддукторе и значительно слабее — в мантии и жабрах (Zurburg, Kluytmans, 1980). Наиболее существенные различия обнаружены авторами между тканями и гемолимфой. Так, в гемолимфе наблюдается накопление таких жирных кислот, как ацетат и пропионат, которые, вероятно, транспортируются через гемолимфу в межворчатую жидкость и далее выводятся наружу. Что касается аминокислот — аланина, аспартата и серина, то концентрация их в гемолимфе ниже, чем в тканях. Совсем не обнаружен в гемолимфе сукцинат, даже при условии значительного накопления его в тканях (Zurburg, Kluytmans, 1980). Этот факт представляется нам важным, так как он свидетельствует о том, что метаболически ценные интермедиаты (сукцинат) на-

капливаются в тканях и используются в дальнейшем метаболизме, тогда как менее ценные выводятся наружу.

В заключение следует сказать, что в связи с лабильностью и неоднозначностью уровня и направленностью анаэробных реакций в отдельных тканях сложно интерпретировать их физиолого-биохимическую значимость. Все эти вопросы требуют дальнейшего изучения.

Временной аспект. Вопрос о временной зависимости уровня аккумуляции конечных продуктов возник сразу же после идентификации их в тканях моллюсков (Kluytmans et al., 1977) и получил свое развитие в связи с открытием пропионата как деривата сукцината и с изучением свойств ПК и ФЭПККазы при переходе с аэробного пути обмена на анаэробный (Ebberink et al., 1976). Специалистами получены данные о соотношении аланина и сукцината при анаэробии, которое после 24 ч экспозиции равнялось 2:1, а через 72 ч — 2:3 (Zwaan et al., 1975). При более длительном анаэробии это соотношение менялось в сторону накопления сукцината — 1:1 и 1:2.

В ряде работ временные характеристики накопления конечных продуктов анаэробного обмена хорошо изучены на отдельных тканях мидий (Zwaan, Wijsman, 1976; Kluytmans et al., 1977). Показано, что аланин является первоначальным продуктом во всех тканях, накапливаясь в первые 4 ч при переходе на анаэробный обмен, после чего содержание его несколько понижается или остается на том же уровне на протяжении всего последующего периода анаэробии. При этом уровень накопления аланина зависит от его первоначального содержания в тканях, которое носит сезонный характер. Накопление сукцината имеет совершенно иной характер — количество его постепенно увеличивается, достигая максимума через 48 ч анаэробии. Эти различия являются результатом работы соответствующих ферментных систем.

Накопление конечных продуктов позволяет представить время смены активности ПК на ФЭПКК, которое приходится на 3–4 ч анаэробии, когда содержание аланина после первоначального подъема снижается, а сукцинат продолжает расти. При долговременном анаэробии (8 сут) количество сукцината и пропионата продолжает увеличиваться. Уровень ацетата и аланина остается практически постоянным с флуктуациями в ту или иную сторону, что, вероятно, является отражением колебаний уровня ПК-активности.

Сезонность. Характеристика сезонной динамики конечных продуктов аэробного и анаэробного обмена подробно изучена и обобщена на *M. edulis* (Kluytmans et al., 1980). По данным автора, сукцинат и ацетат не имеют четко выраженных сезонных изменений как при аэробном, так и при анаэробном обмене. Пропионат у контрольной группы практически отсутствует во все сезоны, тогда как у особей, помещенных в анаэробные условия, аккумулируется в значительных количествах весной и в начале лета, значительно меньше — осенью, а зимой вовсе не накапливается.

Наблюдаемая сезонная динамика образования пропионата не связывается непосредственно только с превращением сукцината в пропионат в этот период (Kluytmans et al., 1980). Считается, что наибольшее влияние на образование пропионата оказывает температура окружающей среды. Этот вывод был сделан на основании совпадения хода кривых образования пропионата в анаэробных условиях и колебания температуры в течение годового цикла* (рис. 41). Это подтверждают непосредственные опыты по влиянию температуры на интенсивность образования сукцината и пропионата. Интенсивность образования пропионата в зависимости от температуры описывается прямой $Y = 2,342x + 10,04$ с коэффициентом регрессии 0,87 (рис. 42). Аналогичная зависимость для сукцината равна $Y = 0,142x + 17,16$ с коэффициентом регрессии 0,09 (рис. 43). Однако следует отметить, что, если сукцинат не является источником пропионата, предшественник последнего остается неизвестен.

На содержание аланина в аэробных условиях и на его накопление при анаэробии влияет сезон года (Ahmad, Chaplin, 1980). Максимальное содержание аланина наблюдается в период с июня по октябрь, минимальное — с января по май. При этом интенсивность накопления аланина в аэробных условиях находится в обратной зависимости от его содержания, т.е. летом и осенью при максимальном

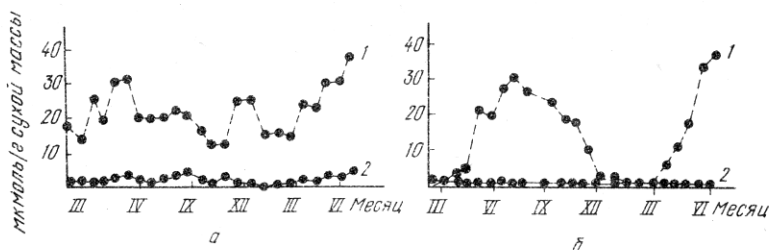


Рис. 41. Сезонная динамика содержания сукцината (1) и пропионата (2) в аэробных (а) и анаэробных (б) условиях (Kluytmans et al., 1980)

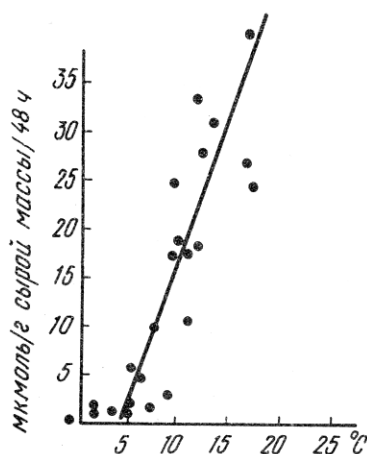


Рис. 42. Зависимость интенсивности накопления пропионата от температуры (Kluytmans et al., 1980)

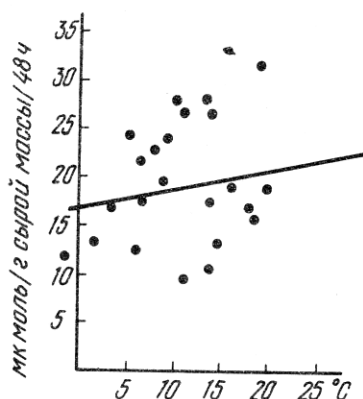


Рис. 43. Зависимость интенсивности накопления сукцината от температуры (Kluytmans et al., 1980)

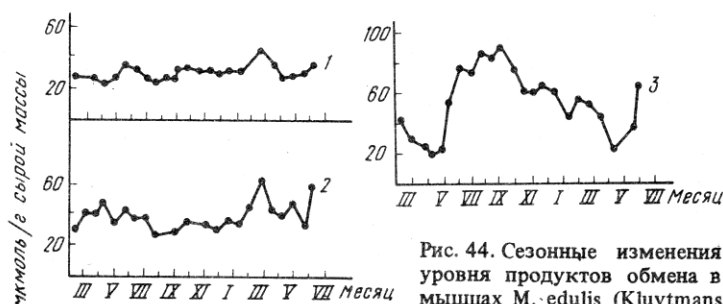


Рис. 44. Сезонные изменения уровня продуктов обмена в мышцах *M. edulis* (Kluytmans et al., 1980):
1 — глутамат; 2 — аспарат; 3 — аланин

его уровне накопление практически отсутствует (рис. 44). Наличие глутамата и аспартата также имеет сезонную динамику с максимумами в марте-мае. В это же время происходят и наиболее заметные изменения в их содержании в анаэробных условиях (накопление глутамата и потребление аспартата). Понижение количества аспартата указывает на его роль как субстрата в течение анаэробноза, когда ФЭПКК еще недостаточно активна и ААТ-реакция является основной в образовании ШУК из аспартата. Это предположение подтверждается нашими данными по динамике ААТ в анаэробных условиях, где показана ее активация в первые 3 ч анаэробноза.

Активность ферментов гликолиза при некоторых экстремальных воздействиях

В Черном море, в зоне прибой, около 45% обрастаний составляют сообщества мидий (Долгопольская, 1957). Проблема обрастаний включает комплекс вопросов, касающихся биологии, физиологии и биохимии организмов обрастаний и их адаптации к экстремальным условиям. В решении этой проблемы особое место занимают токсикологические исследования. Таким образом, круг вопросов, касающихся исследований различных аспектов обрастания, весьма широк и представляет интерес для многих специалистов.

В настоящем разделе представлены данные по влиянию условий гипоксии и ядов, входящих в состав противообрастающих красок, на некоторые ферменты энергетического обмена мидий.

Амилазная и фосфорилазная активность. Как отмечалось выше, утилизация гликогена у мидий осуществляется двумя путями — фосфорилазным и амилолизным. В условиях гипоксии интенсивность утилизации гликогена возрастает, однако в литературе данные по активности фосфорилазы и α -амилазы в этих условиях у мидий отсутствуют. Нами определена активность этих двух ферментов в тканях мидий в условиях гипоксии, а также в растворах токсинов — меди и ТБТО (Горомосова, Шапиро, Бобкова, 1975). Полученные данные показали, что уровень активности α -амилазы в гепатопанкреасе возрастает в условиях 1- и 2-суточной гипоксии на 10%. В растворах меди с концентрацией 0,6–1,2 мг/л активность фермента в гепатопанкреасе на 1–2 сут также возрастала на 5–10% и лишь с концентрацией 6,4–10,0 мг/л она незначительно снижалась (табл. 29).

Аналогичные данные были получены и в отношении фосфорилазы. В первые 3 сут опыта активность фермента была на уровне контроля, а в отдельных случаях превышала контрольный уровень. Такая же картина наблюдалась в растворах меди (концентрация 0,6 и 5,6 мг/л). На четвертые-шестые сутки опыта активность фосфорилазы понижалась

Т а б л и ц а 29. Активность α -амилазы гепатопанкреаса мидий при воздействии меди и 5-суточной гипоксии, мг глюкозы/г сырой массы за 20 мин

Вариант опыта	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	t (P)
Контроль	80,9 $\pm$ 17,0	—
Cu ²⁺ 0,6–1,2 мг/л	83,9 $\pm$ 14,0	2,64 (0,02)
Cu ²⁺ 6,4–10,0 мг/л	76,2 $\pm$ 16,0	2,23 (0,05)
Гипоксия, 5 сут	88,5 $\pm$ 17,0	3,46 (0,01)

Т а б л и ц а 30. Влияние гипоксии и ионов меди на фосфорилазную активность гепатопанкреаса, мкг Р/мг белка в минуту

Активность фермента	Контроль		Гипоксия	
	мкг Р	%	мкг Р	%
Фосфорилаза <i>a</i>	0,49 ± 0,03	100	0,46 ± 0,03	95
Фосфорилаза <i>a</i> + <i>b</i>	0,73 ± 0,09	100	0,63 ± 0,02	90

Продолжение

Активность фермента	0,6 мг Cu ²⁺		5 мг Cu ²⁺	
	мкг Р	%	мкг Р	%
Фосфорилаза <i>a</i>	0,41 ± 0,03	79	0,35 ± 0,03	74
Фосфорилаза <i>a</i> + <i>b</i>	0,58 ± 0,05	83	0,51 ± 0,05	73

на 18–25% контроля, при этом гипоксия и концентрация меди 0,6 мг/л оказывали одинаковое воздействие (табл. 30). В мышцах оба фермента также сохраняли высокий уровень активности, не отличаясь от контроля. А.О. Войнар (1953) отмечает, что для угнетения активности амилазы у высших животных достаточно концентрации меди порядка 10^{-5} моль или 640 мкг/л. Эта же концентрация оказывает на амилазу мидий активирующий эффект.

Таким образом, показана высокая устойчивость α -амилазы и фосфорилазы к экстремальным воздействиям. Очевидно, что утилизация гликогена в этих условиях может осуществляться как амилазным, так и фосфорилазным путем, не являясь лимитирующим этапом в процессе гликогенолиза.

Гексокиназа и глюкозо-6-фосфатДГ. Снижение содержания кислорода в среде не только не оказывало угнетающего действия на ГК, но и увеличивало ее активность на 30% (рис. 45). Эндогенная активность этого фермента, т.е. активность, измеренная в инкубационной среде без внесения экзогенной глюкозы, возрастала в 2 раза. Аналогичные результаты были получены и при воздействии ионов меди. Этот факт

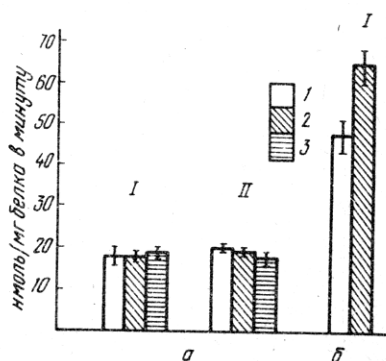


Рис. 45. Изменение активности Г-6-ФДГ и ГК в тканях мидий в условиях гипоксии и при действии ионов меди; *a* — Г-6-ФДГ; *b* — ГК; *I* — мышцы; *II* — гепатопанкреас; *1* — контроль; *2* — гипоксия; *3* — ионы меди

можно объяснить повышением концентрации глюкозы в тканях мидий, которое происходит за счет усиленного расщепления гликогена в этих условиях.

Условия гипоксии не вызывали изменения активности первого фермента шунта — глюкозо-6-фосфатДГ (см. рис. 45). Стабильность работы этого фермента отмечалась и при действии ионов меди в концентрации 0,6–1 мг/л. Отсутствие ингибирующего эффекта было получено при суммарном воздействии гипоксии и ионов меди.

Полученные данные свидетельствуют о высокой устойчивости начальных ферментов катаболизма углеводов, что обеспечивает функционирование гликолитического процесса в условиях дефицита кислорода и воздействия токсинов.

ЛактатДГ и малатДГ. Наиболее существенные изменения отмечены для конечных реакций цепи катаболизма углеводов: ФЭП-карбоксилазы, ПК, малатДГ и лактатДГ. Как было отмечено, при рассмотрении активности конечных реакций гликолиза в норме, малатДГ в цитоплазматической фракции мидий поддерживает уровень НАД в тканях, необходимый для протекания процесса гликолиза. Высокая активность малатДГ компенсирует низкую активность лактатДГ. В условиях гипоксии эта функция малатДГ усиливается. Так, нами было отмечено увеличение активности малатДГ в условиях кратковременной гипоксии. В течение длительного анаэробноза характер изменения фермента зависит от его длительности. В первые сутки наблюдалось возрастание активности фермента, затем отмечался возврат к норме с последующим вторичным повышением активности на четвертые–пятые сутки. На восьмые сутки

Т а б л и ц а 31. Влияние гипоксии на активность малатДГ и лактатДГ в мышечной ткани двусторчатых моллюсков, нмоль/мг белка в минуту

Объект исследования	Время воз- дей- ствия, сут	Контроль		Гипоксия*	
		$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	n	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	n
Активность малатДГ					
M. galloprovincialis	1	1386 ± 63	5	3168 ± 260	5
	3	1767 ± 71	8	1796 ± 472	7
	5	2183 ± 105	6	3633 ± 233	4
	7	1450 ± 102	7	2805 ± 256	8
	8	1673 ± 73	6	1120 ± 43	5
Mercenaria mercenaria	3	2630 ± 168	8	11000 ± 498	10
Glycymeris albolineatus	3	3900 ± 140	5	10760 ± 100	5
Активность лактатДГ					
M. galloprovincialis	1	67,5 ± 4,76	5	16,8 ± 2,8	6
	3	59,8 ± 6,45	8	27,6 ± 3,3	5
	4	54,2 ± 7,56	6	18,2 ± 2,4	5
	5	58,7 ± 5,04	7	20,5 ± 3,0	4
	7	38,4 ± 3,15	6	19,2 ± 3,1	4

* $P < 0,01$.

Т а б л и ц а 32. Изменение активности малаТДГ в усоножках баянусов при содержании в течение 4 сут в проточном аквариуме, нмоль/мг белка в минуту

Фракция	Контроль		Опыт *	
	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	n	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	n
Митохондрии	640 $\pm$ 124	5	1257 $\pm$ 165	4
Цитоплазма	1480 $\pm$ 34	7	2200 $\pm$ 85	9

*Р=0,02.

Т а б л и ц а 33. Влияние солености морской воды на активность малаТДГ и лактатДГ (нмоль/мг белка в минуту), а также на содержание сукцината $[E/(100 \text{ мг ткани} \cdot 10^2)]$ в тканях *M. edulis*

Ткань	Время воздействия, сут	Соленость, ‰					
		24		12		6	
		$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	n	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	n	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	n

Активность малаТДГ

Жабры	1	1750 $\pm$ 156	5	2260 $\pm$ 95	5	8300 $\pm$ 208	5
	3	6375 $\pm$ 111	4	4700 $\pm$ 268	6	4000 $\pm$ 121	4
Мышцы	1	1748 $\pm$ 172	5	3025 $\pm$ 228	4	3950 $\pm$ 465	4
	3	4200 $\pm$ 115	4	2325 $\pm$ 139	4	2400 $\pm$ 260	4
Гепатопанкреас	1	1607 $\pm$ 476	4	—	—	1938 $\pm$ 303	4
	3	2370 $\pm$ 311	4	2195 $\pm$ 167	4	1965 $\pm$ 255	4

Активность лактатДГ

Мышцы	1	10,00 $\pm$ 1,65	4	6,7	2	Не опр.	
	3	12,85 $\pm$ 1,54	4	Не опр.		"	
Жабры	1	14,25 $\pm$ 1,2	4	7,37 $\pm$ 0,67	3	Не опр.	
	3	13,60 $\pm$ 0,81	4	Не опр.		"	

Содержание сукцината

Жабры	1	5 $\pm$ 0,2	6	6 $\pm$ 0,2	6	8 $\pm$ 1,2	4
	2	5 $\pm$ 0,3	4	—	—	8 $\pm$ 0,9	3

Примечание. Р $\leq$ 0,05.

активность фермента снижалась (табл. 31). Мы не можем утверждать, что при длительном эксперименте именно условия гипоксии вызывают подавление активности фермента. Это снижение может быть обусловлено и другими факторами, в частности голоданием, которое уменьшает интенсивность обмена моллюсков и активность ферментов (Gabbott, Head, 1981).

Повышение активности малаТДГ было отмечено нами и у других пластинчатожаберных моллюсков. Например, в мышечной ткани *Mercenaria mercenaria* и *Glycymeris abdo-lineatus* было зафиксировано увеличение активности фермента в 15 раз. Аналогичная реакция фермента была обнаружена не только в условиях недостаточного снабжения моллюсков кислородом. Суточное выдерживание *M. edulis* в разбавленной в 2–4 раза морской воде также вызывало возрастание активности малаТДГ в жабрах и мышцах. Содержание баянусов в аквариуме сопровождалось увеличением в усоножках активности митохондриальной и цитоплазматической малаТДГ (табл. 32).

Реакция лактатДГ мышечной ткани мидий на действие гипоксии была однозначной. Во всех опытах как при длительной, так и кратковременной гипоксии наблюдалось значительное снижение активности фермента (см. табл. 31). Практически полное ингибирование активности лактатДГ в тканях *M. galloprovincialis* отмечалось также при снижении в экспериментальных условиях солености с 24 до 6‰ (табл. 33).

Следовательно, в условиях гипоксии усиление активности малатДГ наряду с ингибированием лактатДГ, так же как и ингибирование пируваткиназы с одновременным активированием ФЭП-карбоксикиназы, изменяет отношение активностей конечных реакций цепи: ФЭП → пируват → лактат; пируват → аланин и ФЭП → ЦУК → малат → фумарат → → сукцинат.

Изменение активности этих реакций происходит таким образом, что образование лактата как конечного продукта катаболизма углеводов ингибируется. Основным конечным продуктом становятся сукцинат и аланин.

При содержании мидий в морской воде с примесью меди (концентрация 100 и 200 мкг · л⁻¹) после 24-часовой экспозиции в жаберной ткани активность малатДГ в цитоплазме клеток снизилась на 30%. ТБТО в

Т а б л и ц а 34. Влияние меди и бис-трибутиловогооксида (δ-ТБТО на метаболиты и ферменты углеводного обмена и цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) тканей

Метаболит, фермент	Единица измерения	Медь	δ-ТБТО	Контроль
Глюкоза	% к сырой массе	0,92 ± 0,10	0,66 ± 0,08	0,58 ± 0,7
Гликоген	То же	1,92 ± 0,15	2,03 ± 0,20	4,14 ± 0,07
Суммарные углеводы	"	2,84 ± 0,30	2,69 ± 0,25	4,72 ± 0,30
Интенсивность эндогенного гликолиза	мкг лактата/мг белка · ч	290,00 ± 10,0	—	280,00 ± 8,5
АТФ	мг · % Р	3,10—0,63	—	11,20 ± 0,49
Амилаза	мг глюкозы/г сырой массы · х 20 мин	83,00 ± 0,25	—	89,00 ± 0,90
Фосфорилаза	мкг Р/г ткани · х мин	42,00 ± 0,40	—	54,50 ± 0,50
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа гепатопанкреас	нмоль/мг белка · мин	16,00 ± 1,30	—	20,00 ± 2,50*
Мышцы	То же	20,00 ± 1,60	—	21,00 ± 1,60*
Гонады	"	31,00 ± 0,20	—	45,00 ± 1,40
Малатдегидрогеназа (цитоплазматическая)	"	—	346,00 ± 14,0	417,00 ± 3,30
Малатдегидрогеназа (митохондриальная)	"	—	40,00 ± 1,60	159,00 ± 9,70
Сукцинатдегидрогеназа	Е/мг белка · х мин · 1000 мин	—	40,00 ± 1,60	159,00 ± 9,70

*P > 0,05, в остальных случаях P ≤ 0,05.

мышечной и жаберной тканях вызывал такое же ингибирование активности малатДГ. Более резкое ингибирование малатДГ наблюдается в митохондриальной фракции, где отмечено 70%-ное уменьшение активности фермента (табл. 34).

Аналогичное изменение активности малатДГ под влиянием различных органических ядов отмечено в мышечной и жаберной тканях мидий и усовонок баянусов (Бобкова, 1980). Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что воздействия, наблюдаемые в природе (гипоксия, опреснение), активировали активность малатДГ, тогда как растворы токсинов подавляли ее. Очевидно, цепь пируват → малат → фумарат → сукцинат при действии ядов блокируется, что значительно уменьшает энергетические резервы организма и их адаптационную способность.

Сукцинатдегидрогеназа. СукцинатДГ в тканях пластинчатожаберных моллюсков является одной из более активных дегидрогеназ ЦТК. Функционирование этого фермента в тканях моллюсков происходит как в прямом (сукцинат → фумарат), так и в обратном (фумарат → сукцинат) направлениях (Hammen, 1975). Как было установлено нами ранее, интенсивность окисления сукцината равна активности сукцинатДГ. На основании этого было высказано предположение, что интенсивность окисления сукцината в основном определяется активностью соответствующей дегидрогеназы (Вержбинская, Шапиро, 1968). Был сделан вывод, что сукцинат является одним из наиболее потребляемых субстратов ЦТК и включение углеводов в цикл трикарбоновых кислот происходит через это вещество. Аналогичные результаты были получены на мышечных митохондриях низших позвоночных: миногах, скатах, костистых рыбах (Савина, 1965) (табл. 35).

У теплокровных животных при относительно высокой активности сукцинатДГ окисление сукцината в мышечных митохондриях ниже, чем интенсивность окисления других субстратов (Савина, 1965).

Т а б л и ц а 35. Интенсивность поглощения кислорода митохондриями разных животных при окислении промежуточных метаболитов цикла Кребса, мкл O_2 /мг белка · ч (цит. по Вержбинской, Шапиро, 1968)

Субстрат окисления	Животное и ткань, из которой выделены митохондрии								
	Гепато-пан-креас мидий	Гепато-пан-креас вино-град-ной улитки	Жабры краба	Гепато-пан-креас краба	Печень карпа	Мыш-цы сма-риды	Мыш-цы ерша	Печень крысы	Скелет-ная мышца крысы
Пируват	5,7	—	—	Следы	8,0	4	7	27	124
Цитрат	3,6—13,1	Следы	—	20	14,5	12	8	14	13
Сукцинат	18,6	18	24	60	15,9	14	18	35	33
Малат	12,0	7	—	33	19,8	—	—	17	—
Глутамат	10,2	—	—	—	22,2	35	19	35	135
α - Кетоглутарат + + малонат	9,7	4	—	—	23,0	—	25	17	107

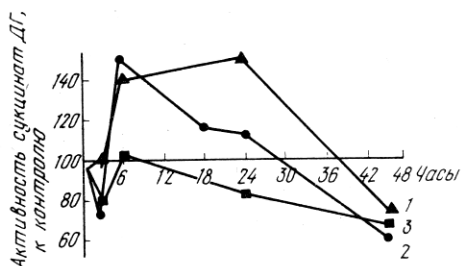


Рис. 46. Активность сукцинатДГ в тканях мидий в условиях гипоксии:

1 — гонады; 2 — жабры; 3 — мышцы

Таким образом, интенсивность окисления сукцината не всегда определяется активностью соответствующей дегидрогеназы. В тканях высших позвоночных основным фактором, определяющим интенсивность окисления этого интермедиата, является концентрация в тканях ЦУК. Высокое содержание этого вещества тормозит активность сукцинатДГ (Савина, 1965). СукцинатДГ митохондрий низших позвоночных, рако-

образных и пластинчатожаберных моллюсков, как и другие дегидрогеназы этих организмов, слабо чувствительны к изменению метаболического фона тканей. Этим, очевидно, определяется высокая интенсивность окисления сукцината, равная по величине активности его дегидрогеназы.

Высокая чувствительность сукцинатДГ к уменьшению содержания кислорода в среде наблюдается у млекопитающих (Olson von Roff, 1967). Авторы на изолированных митохондриях сердечной мышцы крысы показали, что сукцинатДГ является более чувствительным к аноксии ферментом, чем другие дегидрогеназы. Аналогичная реакция сукцинатДГ обнаружена в тканях брюхоногого моллюска *Pila globosa*.

Нами показано, что изменение активности сукцинатДГ в условиях длительной гипоксии происходит неоднозначно как в разных тканях, так и во времени. Кратковременная гипоксия (3 — 4 ч) вызывает снижение активности фермента во всех тканях. При длительной гипоксии (до 24 ч) в жабрах и гонадах отмечается повышение активности сукцинатДГ с последующим ее снижением к 48 ч гипоксии. В мышцах мидий подавление активности фермента наблюдалось в течение всего эксперимента (рис. 46). Снижение активности сукцинатДГ в период гипоксии может быть вызвано многими причинами, например, снижением концентрации митохондрий в тканях, изменением структуры их мембран, нарушением сродства фермента с субстратом.

Различная чувствительность сукцинатДГ тканей мидий к условиям гипоксии свидетельствует о наличии тканевой специфичности фермента. Таким образом, изменение активности сукцинатДГ, как и других биохимических показателей, подтверждает предположение о том, что в жабрах пластинчатожаберных моллюсков в условиях гипоксии возможно функционирование ЦТК, в то время как в мышцах в аналогичных условиях преобладает процесс гликолиза (Chaplin, Loxton, 1976).

В наших исследованиях по влиянию ионов меди на активность сукцинатДГ показана высокая чувствительность фермента по отношению к ионам меди. Наиболее чувствительной оказалась сукцинатДГ жаберной ткани. Опыты *in vivo* и *in vitro* показали, что между концентрацией

ионов меди в растворе и степени ингибирования активности сукцинатДГ существует прямая зависимость. Простота определения сукцинатДГ и ее высокая чувствительность к действию ионов меди позволяет использовать этот фермент как биохимический тест для оценки эффективности ядов, содержащих медь.

В заключение следует подчеркнуть, что отношение фумаратредуктазы к сукцинатДГ, т.е. отношение прямой реакции окисления сукцината к обратной, увеличивается в ряду: полные аэробы → факультативные анаэробы — полные анаэробы (Hammen, 1975). Отношение этих ферментов можно использовать в качестве биохимического показателя, характеризующего способности организма переносить временный анаэриоз.

Трансаминазы. Роль трансаминаз в энергетическом обмене беспозвоночных в условиях низкого содержания кислорода велика и проявляется в трех направлениях: 1) в поддержании окислительно-восстановительного потенциала; 2) в пополнении пула метаболитов цикла Кребса; 3) в сопряжении превращений углеводов и аминокислот в периоды аноксии (Hochachka et al., 1973; Hochachka, Somero, 1976; Хочачка, Сомеро, 1977).

При переходе моллюсков на анаэробный обмен осуществляется перестройка определенных участков метаболических реакций, в частности активируется участок: ФЭП → малат → фумарат → сукцинат, и в первый период реакция, катализируемая АлАТ: пируват → аланин. Последняя реакция играет важнейшую роль в период смены метаболических путей, в частности для ингибирования ПК-реакции. Наряду с накоплением аланина при АлАТ-реакции образуется α -кетоглутарат, который может служить субстратом для образования сукцината при действии α -кетоглутаратДГ. Сукцинил-СоА, образующийся в результате этой реакции, служит источником фосфорилирования ГДФ в ГТФ на субстратном уровне.

Велика также роль ААТ в анаэробном обмене. Она является вторым источником ЩУК в реакции: аспартат + α -кетоглутарат → ЩУК + глутамат. Этот важнейший метаболит превращается у мидий в малат с помощью высокоактивной малатДГ и, таким образом, ААТ-реакция является вторым источником образования сукцината. Пополняя запасы кетокис-

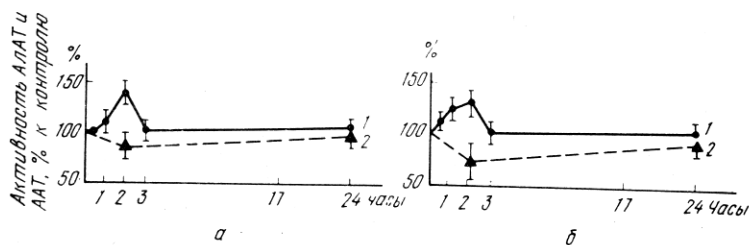


Рис. 47. Активность АлАТ и ААТ в тканях мидий в условиях гипоксии: а — АлАТ; б — ААТ; 1 — жабры; 2 — печень

лот, трансаминазы способствуют сохранению концентрации НАДН, необходимой для поддержания окислительно-восстановительного потенциала.

Зная, как велика роль трансфераз при переходе моллюсков с аэробного на анаэробный обмен, нами измерен уровень активности этих ферментов тканей мидий, находившихся в условиях гипоксии (Горомосова, Таможняя, 1979). Полученные данные показали, что гипоксия вызывает разнонаправленные изменения активности цитоплазматических аминотрансфераз в отдельных тканях (жабрах и гепатопанкреасе). В жаберной ткани активность обоих ферментов повышалась, тогда как в гепатопанкреасе она понижалась (рис. 47). В обоих случаях реакция ферментов менялась в зависимости от времени гипоксии: начинаясь через 30 мин после создания гипоксических условий, она достигала максимума через 2 ч, несколько снижалась через 3 ч и нормализовалась через 24 ч после начала опыта. Максимальная активность АЛАТ в жаберной ткани достигает 137%, ААТ — 128%.

Изменения активности ферментов переаминирования в жабрах согласуются с литературными данными о временной характеристике накопления пирувата и аланина, максимальное содержание которых наблюдается через 2 ч анаэробноз (Kluytmans et al., 1977; Lurburg, Kluytmans, 1980). Активирование трансаминаз у беспозвоночных наблюдается не только при недостатке кислорода, но и при других неблагоприятных воздействиях. Так, например, при инвазии улитки *Lymnaea* *luteda* повышается активность ААТ с изменением отношения ААТ/АЛАТ от 0,8 до 3,5 (Manohar et al., 1972). У высших животных в условиях гипоксии повышается активность обеих трансаминаз в печени и мозговой ткани (Прохорова и др., 1975). Причина повышения активности трансаминаз заключается в их связи с реакциями глюконеогенеза, которые имеют место при гипоксии с участием аминокислот (Катунума и др., 1968) и с увеличением пула метаболитов цикла Кребса.

Отмечается еще ряд факторов, при которых наблюдается повышение активности трансаминаз у моллюсков: голодание (Goddard, Martin, 1966), формирование раковины и изменение осмотического давления (Hammen, 1968). Некоторые токсиканты, например синезеленые водоросли, вызывают у пресноводных моллюсков повышение активности обеих трансаминаз на 25–90% (Биргер, 1979). Авторы указывают, что повышение активности связано в этих случаях с важными функциями ферментов переаминирования — выведением во внешнюю среду аминокислот в случае изменения осмотического давления или активирования работы ЦТК за счет пополнения его метаболитами: ЩУК и α -кетоглутаратом.

Однако если действующим началом служат тяжелые металлы, то может наблюдаться ингибирование трансаминаз, что связано с их сродством с сульфгидрильными группами (Филенко, Хоботьев, 1976). Так, по данным этих авторов, ионы Fe^{+2} , As^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+} тормозят ААТ в мышцах. Мы исследовали влияние ионов меди и ряда органических ядов на активность цитоплазматических АЛАТ и ААТ в жабрах мидий. Наи-

Т а б л и ц а 36. Активность трансаминаз жаберной ткани мидий при содержании их в ядах (мг/л), % к контролю

Время экспозиции	Cu ²⁺	Cu ²⁺	ХФА	ТБТО	Закись меди		П-оксид	
	0,5	5	0,4	0,8	0,65	2,6	1,1	4,5
Аланинтрансаминаза								
2 ч	60	55	70	—	90	70	90	80
1 сут	80	60	80	82	98	90	80	110
Аспартаттрансаминаза								
2 ч	80	72	100	—	80	95	80	120
1 сут	110	90	90	115	125	135	125	130

большой ингибирующий эффект на ферменты оказывают ионы меди при 2-часовой экспозиции. В меньшей степени ингибируют закись меди и органические яды с мышьяком (ХФА) и оловом (ТБТО), причем с увеличением экспозиции до 24 ч этот эффект ослабевает, а ААТ даже активируется (табл. 36).

Таким образом, трансаминазы у моллюсков — это ферменты, активно реагирующие на неблагоприятные изменения внешней среды и осуществляющие защитную функцию организма от этих воздействий, являясь своеобразным биохимическим буфером. Они участвуют в процессах перехода моллюсков на анаэробный обмен, регуляции осмотического давления, синтеза и мобилизации ряда аминокислот, связывающих пластический и энергетический обмены, а также в восстановительных реакциях синтеза в период нормализации обменных процессов.

Ферменты глюконеогенеза. Из приведенных выше данных ясно, что в анаэробных условиях у мидий ускоряются процессы катаболизма углеводов — гликогена и глюкозы, при этом повышается уровень активности соответствующих ферментов — амилазы и фосфорилазы. Намного хуже исследован процесс ресинтеза углеводов в условиях гипоксии и аноксии. Косвенным доказательством наличия ресинтеза углеводов в постгипоксический период является повышение содержания олигосахаридов в печени мидий на 50—100%. В литературе имеются сведения о том, что в условиях кислородной недостаточности запасы глюкозы пополняются как за счет расщепления гликогена, так и за счет ускорения реакций глюконеогенеза (Прохорова и др., 1975). Данные по определению уровня активности ферментов глюконеогенеза при гипоксии у моллюсков нам неизвестны. Мы определяли активность ФДФазы и гликогенсинтетазы в тканях мидий, находившихся в условиях гипоксии и в растворах ядов. Кратковременная гипоксия (до 1 сут) вызывает повышение активности ФДФазы во всех тканях мидий на 30—50%, активность гликогенсинтетазы остается на уровне контроля. На третьи—четвертые сутки наблюдается частичное ингибирование ФДФазы, однако сохраняется 70% активности (рис. 48).



Рис. 48. Активность ФДФазы в тканях мидий в условиях гипоксии:
1 — жабры; 2 — гепатопанкреас;
3 — мышцы

При содержании мидий в растворе с ядами наблюдалось ингибирование обеих ферментов, причем степень его была различной в разных тканях и с разными композициями ядов (рис. 49, 50). Максимальное ингибирование наблюдалось при действии роданистой меди и феноксарсина в жабрах и мышцах, где активность ферментов понижалась на 70–80%. Сильным ядом для гликогенсинтазы оказался также ТБТО (трибутилтриоловооксид) и ХФА (хлорфеноксарсин). Степень ингибирования ферментов зависела от времени воздействия: на третьи — пятые сутки она была значительно ниже, чем через сутки.

Из приведенных данных следует, что активность гликогенсинтезирующих ферментов тканей мидий проявляет устойчивость к недостатку кислорода и к ядовитым соединениям. Содержание АТФ в тканях мидий, находящихся в условиях гипоксии, снижается на 50%, а содержание АМФ возрастает на 60–70%. При таком соотношении адениловых нуклеотидов ФДФаза высших позвоночных полностью ингибирована (Юровицкий, Ермолаева, Мильман, 1976). Очевидно, широкая пластичность кинетических свойств ФДФазы мидий, ее низкая чувствительность к АМФ и избытку субстрата позволяют этому ферменту функционировать в условиях гипоксии на фоне низкого уровня энергетической вооруженности. Это свойство является чрезвычайно важным для двуствор-

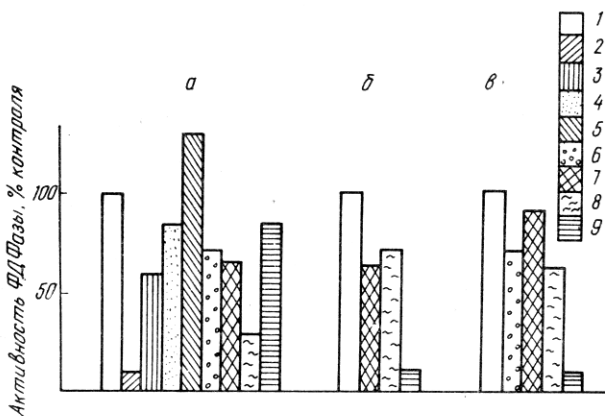
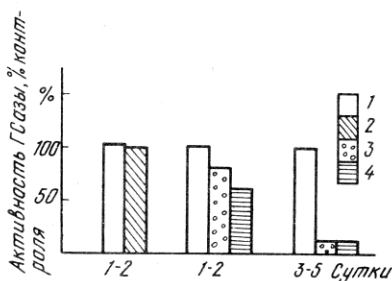


Рис. 49. Изменение активности ФДФазы мидий при действии ядов:
а — гепатопанкреас; б — жабры; в — мышцы; 1 — контроль; 2 — бис-10-феноксарсин;
3 — цианамид; 4 — ХФА; 5 — анилид салициловой кислоты; 6 — ТБТО; 7 — 9-хлор-
бифенилен; 8 — закись меди; 9 — роданистая медь

Рис. 50. Изменение активности гликогенсинтетазы в тканях мидий в условиях гипоксии и при действии ядов:

1 — контроль; 2 — гипоксия; 3 — ХФА; 4 — ТБТО



чатых моллюсков и, вероятно, наряду с другими факторами, определяет их устойчивость к длительному существованию в условиях гипоксии.

Содержание адениннуклеотидов. Важным показателем состояния моллюсков в изменяющихся условиях внешней среды является содержание в тканях макроэргов и степень их энергизации. Литературные данные по содержанию АТФ, АДФ, АМФ в условиях гипоксии разной продолжительности весьма противоречивы. Об этом свидетельствуют (Zwaan, Wijsman, 1976) данные по анаэробному обмену пластинчатожаберных моллюсков. Так, при гипоксии у *Anodonta cygnea* наблюдается увеличение содержания АТФ до 170% нормы. Увеличение содержания АТФ обнаружено у пресноводных беспозвоночных (олигохет и хиромид) (Биргер, 1979).

Однако увеличение содержания АТФ в условиях гипоксии не является характерным для гидробионтов. У морских моллюсков отмечено снижение концентрации АТФ в этих условиях. Так, у *M. edulis* в условиях гипоксии содержание АТФ уменьшается на 30–40%. У *M. galloprovincialis* изменение АТФ происходит более резко и на вторые–третьи сутки снижается по сравнению с нормой на 60% (Zwaan, Wijsman, 1976). По другим данным, у *M. galloprovincialis* в условиях пятидневного анаэробиза минимальное содержание АТФ в мышечной ткани наблюдалось в течение первых 24 ч гипоксии (de Vooys, 1979).

По нашим данным, в мышечной ткани мидий максимальное снижение АТФ, составляющее 40–50% контроля, происходило после 3-часовой гипоксии. В последующие 17, 24 и 48 ч дальнейшего изменения концентрации АТФ не наблюдалось. Отмеченное уменьшение концентрации АТФ сопровождалось увеличением АМФ (рис. 51). При длительной гипоксии адениннуклеотидная система в мышечной ткани мидий к норме не возвращалась, а оставалась на уровне, характерном для кратковременной гипоксии.

Для жаберной ткани наблюдался несколько иной характер динамики АТФ. Кратковременная гипоксия (1–3 ч) приводила к уменьшению АТФ на 20% и увеличению АМФ на 50% ($P = 0,01$). Величина энергетического заряда при этом падала на 30%. Однако через 17 ч гипоксии система возвращалась к контрольному уровню.

Высокое содержание АТФ в этой ткани в условиях гипоксии, очевидно, не может поддерживаться только анаэробным гликолизом, даже

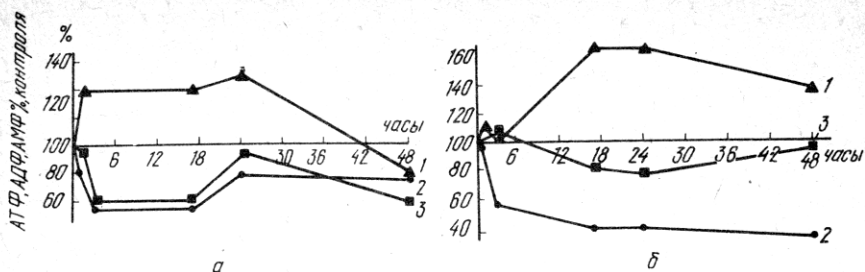


Рис. 51. Содержание адениннуклеотидов в тканях мидий в условиях гипоксии: а — жабры; б — мышцы; 1 — АМФ; 2 — АТФ; 3 — АДФ

если учитывать дополнительное образование АТФ за счет особенностей его конечных этапов (Хочачка, Сомеро, 1977). Основываясь на данных В.Н. Карнаухова (1978), можно предположить, что сохранение в условиях гипоксии довольно высокого уровня АТФ в жабрах мидий происходит за счет каратиноксисом, являющихся дополнительными источниками кислорода.

Таким образом, гипоксия любой продолжительности не вызывает полного расхода запасов АТФ в тканях мидий. Вероятно, одной из отличительных особенностей обмена мидий при низком содержании кислорода в окружающей среде является достаточно высокая стабильность их адениннуклеотидной системы. Высокой стабильностью адениннуклеотидной системы ткани мидий отличаются от высших позвоночных. У последних при снижении напряжения кислорода в окружающей среде могут почти полностью исчезнуть АТФ и АДФ и накопиться эквивалентное количество АМФ (Селиванова и др., 1973). В тканях мидий 50%-ное снижение концентрации АТФ сопровождается незначительным увеличением содержания АМФ, что, очевидно, связано с дезаминированием АМФ до ИМФ и NH_4^+ (Дынник, Сельков, 1978).

Можно также отметить, что в условиях гипоксии у высших организмов резкое снижение содержания АТФ приводит адениловую систему в низкоэнергетическое состояние и вызывает изменение активности некоторых ферментов углеводного обмена: ФФК, ФДФ и гликогенсинтазы (Юровицкий и др., 1976, 1967). В тканях мидий отмеченные изменения аденилатов лишь незначительно влияют на активность этих ферментов (Горомосова и др., 1975). Очевидно, сохранение активности указанных ферментов определяется рядом причин. Во-первых, наличием компенсаторных механизмов, поддерживающих степень энергизации аденилатной системы на определенном уровне, при котором возможна работа ферментов. Во-вторых, свойствами самих ферментов, для которых характерна низкая чувствительность к изменению концентрации указанных соединений. Стабильность аденилатной системы и слабую чувствительность ферментов углеводного обмена к изменению можно рассматривать как биохимические адаптации энергетического обмена этого вида к условиям внешней среды.

Содержание пиридиннуклеотидов. В условиях гипоксии наряду с изменением количества макроэргов происходят изменения содержания никотинамидных коферментов. Детальный анализ изменения суммарного количества окисленных и восстановленных коферментов при действии гипоксии был проведен Т.И. Биргером (1979) на нескольких видах беспозвоночных, характеризующихся в нормальных условиях различным уровнем содержания коферментов, и В.Н. Карнауховым (1978) на моллюсках. В этих исследованиях было отмечено, что изменение содержания пиридиннуклеотидных соединений у разных видов отличается. Эти изменения зависят от исходного уровня их содержания в тканях. У олигохет и водяных осликов, характеризующихся высоким содержанием коферментов в тканях в норме, в условиях гипоксии любой продолжительности отмечено падение концентрации этих веществ на 40–76%. У видов с более низким содержанием никотинамидных нуклеотидов (хириномиды, дрейссены, прудовик малый и др.) ответная реакция организма на действие гипоксии состоит из двух фаз: в первой фазе происходит увеличение содержания; во второй — снижение. При этом чем большей устойчивостью к дефициту кислорода обладает гидробионт, тем более значительное увеличение концентрации никотинамидных нуклеотидов отмечается в тканях. Аналогичные изменения нуклеотидных коферментов наблюдаются не только при гипоксии, но и при отравлении организмов различными токсикантами (Биргер, 1979). Характер и интенсивность этих изменений определяется стадией отравления. Общим для всех стадий является снижение окисленной формы НАД и возрастание восстановленной.

В опытах, проведенных на моллюсках из районов разной степени загрязнения, также отмечается достоверное увеличение общего количества никотинамидных коферментов (Карнаухов, 1979). У различных видов рыб условия гипоксии и интоксикации синезелеными водорослями вызывают изменения, аналогичные вышеописанным (Маляревская, 1979). В стадии аноксии (первая стадия воздействия) у двух видов рыб (судак и карась) во всех органах зафиксировано значительное (с большим разбросом от 4 до 140%) увеличение никотинамидных коферментов. Во второй фазе воздействия (момент гибели рыб) концентрация никотинамидных коферментов резко снижалась. Как подчеркивает А.Я. Маляревская (1979), процесс изменения содержания никотинамидных коферментов у пойкилотермных и гомотермных животных под влиянием гипоксии и токсинов подчиняется общим закономерностям.

Таким образом, исследование влияния гипоксии и ядов на активность ферментов анаэробного и аэробного дыхания показало, что их ответная реакция на эти воздействия различна. Ферменты анаэробного дыхания или гликолиза, оказались чрезвычайно устойчивыми к гипоксии и ядам, их активность лишь незначительно понижается в высоких концентрациях меди. Гипоксия и низкие концентрации меди их активировали. К этим ферментам относятся фосфоорилаза, гексокиназа, Г-6-ФДГ. В то же время активность ферментов ЦТК и терминальной цепи окисления — сукцинатДГ и цитохромоксидазы — подавляется в этих условиях

на 40–60%. Относительно стабильной оказалась также система аденин-пиримидиннуклеотидов.

Устойчивость гликолиза к экстремальным условиям внешней среды, в том числе и к токсическим воздействиям, связана с ранним его филогенетическим становлением. Способность мидий резко снижать уровень обмена и существовать за счет гликолитического ферментирования является основным фактором, определяющим их устойчивость к экстремальным воздействиям. Этому же способствует накопление в качестве конечных продуктов анаэробного обмена сукцината и аланина вместо молочной кислоты, свойственное всем факультативным анаэробам.

Высокая устойчивость мидий и других организмов обрастания, в частности баянусов, к ядам является частным проявлением их резистентности к различным экстремальным факторам среды, выработавшейся в них в процессе эволюции в связи с сидячим образом жизни.

Приведенные показатели по характеру влияния гипоксии и ядов на активность отдельных ферментов и соотношению могут служить индикаторами при разведении мидий в условиях мариккультуры, в области санитарной гидробиологии и морской токсикологии.

ГЛАВА 7. ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ ГЛИКОЛИЗА И ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА У МОЛЛЮСКОВ

Биохимические адаптации организмов к условиям обитания являются важнейшим фактором, с помощью которого организм достигает "векторного гомеостаза" метаболических функций (Хочачка, Сомеро, 1977). Особенно большое значение биохимические адаптации приобретают в тех случаях, когда организм неспособен избежать стрессовых ситуаций, т.е. когда поведенческих и физиологических адаптаций оказывается недостаточно. Это относится к неподвижным или малоподвижным литоральным беспозвоночным, подвергающимся резким перепадам различных факторов внешней среды (солености, температуры, кислородного режима), двусторчатым моллюскам, червям и другим животным, закапывающимся в грунт. Не случайно эти организмы, столь разные по своему систематическому положению, объединяются по функциональным особенностям метаболизма в группу факультативных анаэробов.

Работами специалистов школы П. Хочачка и де Звана показаны особенности биохимических реакций при осуществлении перехода с аэробного обмена на анаэробный и путей образования высокоэнергетических связей. П. Хочачка и Дж. Сомеро (1977) подчеркивают три особенности энергетического обмена факультативных анаэробов: 1) редукция ЛДГ, устраняющая метаболический "тупик" — образование лактата; 2) видоизменение кинетических свойств ключевых ферментов ПК и ФЭПКК, находящихся в точке разветвления метаболических путей; 3) сопряжение гликолитических реакций с другими реакциями фосфорилирования на уровне субстрата, повышающее выход макроэргов в анаэробных условиях.

Недостаточная изученность свойств ферментов начальных этапов катаболизма и синтеза углеводов у моллюсков привела к представлению о полном сходстве этих процессов с таковыми у позвоночных (Хочачка и Сомеро, 1977).

Из данных о свойствах ферментов начальных этапов гликолиза и глюконеогенеза в тканях мидий, приведенных в настоящей работе, следует, что эти участки углеводного метаболизма имеют свою специфику. На основании наших и литературных данных можно более полно осветить процесс углеводного обмена в мышцах мидий в аэробных и анаэробных условиях.

Гликолиз и сопряженная часть ЦТК. Прежде чем перейти к рассмотрению биохимической организации углеводного обмена у мидий, целесообразно отметить некоторые характерные черты его организации у высших животных. В мышечной ткани позвоночных, несмотря на вариации абсолютных значений активностей ферментов гликолиза, существует общая, аналогичная для всех тканей закономерность. Эта закономерность отчетливо проявляется при рассмотрении относительных активностей ферментов, которая устанавливается по отношению к какому-либо одному из них. Чаще всего это делается по отношению к ГК как ферменту с низкой активностью. При таком сопоставлении проявляются ферментные реакции, которые менее активны по сравнению с остальными. Активность этих реакций лимитирует общий поток веществ через гликолитический процесс. К таким лимитирующим звеньям относятся: ФР, ГК, ФФК, ПК. Их регулирующая роль обусловлена необратимостью действия, низкой активностью и спецификой регуляции (Ньюс-Холм, Старт, 1977).

При изучении системы гликолиза у моллюсков было показано, что ее биохимическая структура несколько отлична от классической схемы Эмбдена-Мейергофа. В тканях моллюсков четко выраженного лимитирования гликолиза перечисленными выше ферментами не обнаружено. Такие выводы были сделаны на основании непосредственного определения активности ферментов (Engel, Neat, 1970; Zwaan, Zandee, 1972; Шапиро, Бобкова, 1973; Holwerda et al., 1973; Zwaan et al., 1975, 1976), включения метки в метаболиты процесса (Bryant, 1964; Marrewijk, 1973) и установления общей активности процесса в инкубационных средах *in vitro* (Вержбинская, Савина, 1971).

Равномерное распределение активности ферментов в мышцах мидий обусловлено высоким уровнем активности начальных ферментов гликолиза (ГК и ФГМ) и снижением интенсивности его конечных этапов (ПК и ЛДГ). Отсутствие резких скачков в скоростях реакций приводит к тому, что размах колебаний их отношений находится в пределах 0,3—0,7. Эти отношения для позвоночных колеблются в значительно более широких пределах — от единиц до 2000 (табл. 37). Однако некоторое лимитирование процесса гликолиза в тканях мидий проявляется в условиях дополнительных нагрузок. Так, динамика концентрации субстратов гликолиза в условиях анаэробно-анаэробно-аэробно свидетельствует о лимитирующей роли ФФК в мышцах мидий при 1—3-часовой экспозиции и перемещении

Т а б л и ц а 37. Относительная активность ферментов гликолиза по отношению к ГК (активность ГК принята за 1)

Объект исследования	Фермент				
	ФГМ	ФФК	ПК	Лак-татДГ	Г-6-ФДГ
<i>Actinia equina</i>	—	0,3	3	4	1,0
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	4	1,0	9	3	1,0
<i>Nassa reticulata</i>	4	—	3	3	2,0
<i>Balanus improvisus</i>	1	0,4	4	5	2,0
<i>Crangon crangon</i>	7	1,0	8	25	0,1
<i>Carcinus mediterraneus</i>	12	1,0	10	40	0,2
<i>Ascidia intestinalis</i>	2	—	3	—	3,0
<i>Rattus</i>	120	2,3	700	2000	—

ее на ПК при длительных экспозициях (см. рис. 36). Имеются данные о лимитирующей роли ГК в гепатопанкреасе мидий при глюкозной нагрузке (Cameselle et al., 1980). Н.А. Вержбинская (1972) указывает на лимитирование гликолиза у моллюсков со стороны ферментов центральной оксидоредукции.

Высокая ГК и амилазная активность, несмотря на низкую ФР, обеспечивает включение в гликолиз значительных количеств олигосахаров. Это наблюдается как в условиях нормального содержания кислорода в среде, так и при гипоксии. В последнем случае отмечена некоторая активация ГК и α -амилазы, которая приводит к усилению процесса гликолиза. Возможность работы гексокиназы в условиях повышенного содержания глюкозы в тканях определяется ее низким сродством к глюкозе. Высокая активность ГК сочетается в тканях мидий с такой же активностью Г-6-ФДГ — начального фермента пентозофосфатного шунта.

Как считает Н.А. Вержбинская (1972), высокая активность гексокиназы свидетельствует не только об участии этого фермента в гликолитическом процессе, но и в снабжении пентозофосфатного шунта его субстратом Г-6-Ф. Автор предполагает, что высокая активность гексокиназы, сопряженная с такой же активностью Г-6-ФДГ, не только обеспечивает катаболизм углеводов в тканях, но и играет значительную роль в пластическом обмене, поставляя восстановленные коферменты и пентозофосфаты для синтетических процессов.

Сопоставление относительной роли процессов гликолиза и шунта в утилизации Г-6-Ф по пропускной способности ферментов показало их различную значимость у активных и слабоподвижных гидробионтов. Для сопоставления этих двух процессов были взяты Г-6-ФДГ и ФФК. Первый из них запускает процесс прямого окисления Г-6-Ф, второй — лимитирует поток углеводов через гликолиз. Ниже приведено соотношение активности этих ферментов для некоторых гидробионтов.

<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1,4
<i>Ascidia intestinalis</i>	2,0
<i>Balanus improvisus</i>	5,0
<i>Carcinus mediterraneus</i>	0,1
<i>Crangon crangon</i>	0,1

У прикрепленных гидробионтов значительная часть Г-6-Ф может включаться в шунт. У подвижных форм роль шунта в обмене снижается. Среди факторов, вызывающих интенсифицирование шунта, основным является созревание в гонадах большого количества половых продуктов, максимум синтеза которых приходится на весенний и осенний периоды размножения. Подтверждением этому может быть увеличение активности Г-6-ФДГ в период подготовки к размножению. Таким образом, мощный репродуктивный аппарат пластинчатожаберных моллюсков обеспечивается соответствующей биохимической организацией их углеводного катаболизма.

Еще более специфичной по сравнению с начальными стадиями гликолиза является биохимическая организация конечных этапов. Активность ферментов ПК и лактатДГ одного порядка с активностью начальных реакций гликолиза.

Особенно низка в цепи гликолиза активность лактатДГ. Низкая активность этого фермента не может восполнить пул окисленной формы НАД, необходимой для функционирования гликолитического процесса как ауторегулируемой системы. Регуляторную роль восполнения содержания этого кофермента берет на себя цитоплазматическая изоформа малатДГ и АлАТ. В условиях резкого снижения содержания кислорода в среде эта функция малатДГ усиливается. Кинетические особенности фермента обеспечивают его функционирование в условиях повышения концентрации НАДН в клетке, которое наблюдается в условиях гипоксии.

Механизм переключения преобразования ФЭП в анаэробных условиях определяется постепенным накоплением аланина и подкислением внутриклеточной среды, которые при достижении определенного уровня ингибируют ПК, в результате чего основной поток ФЭП переходит в ЩУК под действием ФЭПКК. Как было отмечено выше, у моллюсков активность лактатДГ очень низка и не уравновешена с активностью ПК (Вержбинская, Шапиро, 1968). Вследствие этого значительная часть пирувата даже в аэробных условиях преобразуется в аланин с помощью высокоактивной АлАТ. В начальный период анаэробноза этот процесс активируется, о чем свидетельствует как повышение активности АлАТ, так и повышение содержания аланина, достигающее максимума в первые 4 ч анаэробноза (Kluytmans et al., 1977). В то же время аккумуляция органических кислот и CO_2 приводит к ацидизации тканей и лимфы, что усиливает ингибирующий эффект аланина на ПК. Вследствие этого активность ПК постепенно падает, а активность ФЭПКК растет. В начальных стадиях анаэробноза она еще недостаточно высока, чтобы катализировать весь пул ФЭП, о чем свидетельствует накопление этого метаболита в тканях мидий (см. табл. 34). При pH 7,0 ФЭПКК проявляет лишь 5% своей активности (Zwaan, 1973). Однако дальнейшее понижение pH в тканях и возрастание уровня активности ФЭПКК приводят к линейному росту содержания сукцината, продолжающемуся непрерывно в течение 3-суточной аноксии (Kluytmans et al., 1977). В этот период pH

тканей и межстворчатой жидкости мидий составляет уже 6,6, что является оптимальным для действия ФЭПКК.

Однако ингибирование ПК происходит не полностью, поскольку высокий уровень ФДФ вызывает частичную реверсию энзима (Zwaan et al., 1976). Это находит свое подтверждение в ряде данных, полученных в последнее время при варьировании условий анаэробноза. Так, накопление продуктов анаэробного обмена в мускуле-аддукторе *M. edulis* наблюдалось при pH 7,3, когда ФЭПКК малоактивна (Both, Magnum, 1978). Было установлено, что активность ПК в анаэробных условиях модулирует в зависимости от уровня содержания различных метаболитов (Livingstone, Bayne, 1974). Тот же факт отмечен и в отношении АлАТ (Горомосова, Таможняя, 1979). Вероятно, этим можно объяснить модуляции в содержании аланина при 23-часовом анаэробнозе, чего не наблюдается в отношении других конечных продуктов анаэробного обмена (Zurburg, Kluytmans, 1980). Аналогичные данные получены об активности ПК и ФЭПКК в условиях частичного анаэробноза. При понижении напряжения кислорода до 120 и 80 ммг у мидий не наблюдалось изменений в уровне активности ПК и ФЭПКК (Livingstone, Bayne, 1977). В то же время на вторые сутки повышалось содержание аланина, сукцината и глутамата. На пятые — седьмые сутки содержание этих продуктов снижалось до контрольного уровня. Авторы приходят к выводу, что в условиях частичного анаэробноза оба фермента работают одновременно, после чего устанавливается новый постоянный уровень обмена. Промежуточный период (1—5 сут), характеризующийся частичным переходом на анаэробный обмен носит термин "физиологическая реакция", или "период адаптации". Активность ПК и ФЭПКК меняется также и во временном аспекте. Дж. Клитман (Kluytmans et al., 1977) предлагает судить о соотношении активности ПК и ФЭПКК по сумме субстратов двух реакций: аланина и ацетата для ПК; сукцината, пропионата и бутирата для ФЭПКК. Эти суммы значительно меняются на протяжении от 1 до 3 ч анаэробноза, возрастая для продуктов ПК-реакции от 30 до 77 мкмоль/г сухой массы и для ФЭПКК-реакции — от 27 до 70 мкмоль/г сухой массы. Эти данные также позволяют говорить об одновременном действии обоих ферментов в первые часы анаэробноза. Кроме того, следует учесть, что имеется еще один путь формирования сукцината, при котором источником служит α -кетоглутарат, образующийся из глутамата при АлАТ-реакции (Хочачка, Сомеро, 1977). Авторы придают важное значение этому пути, поскольку в результате переаминирования в него могут включиться разные аминокислоты. В результате действия α -кетоглутаратДГ, и сукцинилтиокиназы из кетокислоты образуется сукцинил-SКоА с дальнейшим преобразованием в сукцинат, причем последняя реакция является экзэргонической.

Таким образом, специфичность свойств ПК и ФЭПКК определяет направленность конечных реакций гликолиза и сопряженной с ними обращенной части цикла Кребса и приводит к качественно отличному пути формирования конечных продуктов при анаэробном обмене у факультативных анаэробов. Вместо лактата у этих организмов накапли-

ваются аланин и сукцинат, а также свободные жирные кислоты. В образовании этих конечных продуктов участвует целый ряд ферментов, основными из которых являются малатДГ, сукцинатДГ, АлАТ, АсАТ, α -кетоглутаратДГ, и различные СоА-тиокиназы. Соответствующие реакции определяют формирование макроэргических связей — дополнительных по сравнению с классическим ходом гликолиза, что играет важную роль при существовании факультативных анаэробов в бескислородной среде.

Поскольку переход мидий на анаэробный обмен является неспецифической реакцией на многие воздействия внешней среды (гипоксии, солености, загрязнения), по направленности изменения некоторых признаков этой системы можно оценивать состояние гидробионтов и самой среды. К этим показателям можно отнести отношения активности некоторых ферментов: фумаратредуктазы и сукцинатДГ, малатДГ и лактатДГ; отношение концентраций метаболитов дикарбонового участка цикла Кребса (ЩУК к малату), а также изменения рН межстворчатой жидкости.

Глюконеогенез. Глюконеогенез — упорядоченный процесс, объединенный регуляторными системами с ЦТК, гликолизом и системой окисления жирных кислот. К химическим факторам регуляции относятся метаболиты и ряд кофакторов, основными из которых являются отношение пиридиновых нуклеотидов НАД и НАДН, НАДФ и НАДФН, концентрация одно- и двухвалентных катионов в тканях (Юровицкий и др., 1976). Образование глюкозы из неуглеводных предшественников протекает обычно в условиях высокой скорости ресинтеза АТФ и высокой величины энергетического потенциала, при этом активность некоторых ферментов и общая скорость гликолиза понижаются.

У высших животных процесс глюконеогенеза локализован в печени и корковом слое почек, где сосредоточены в высоких концентрациях соответствующие ферменты: ФЭПКК, ФДФаза, гликогенсинтетаза. Обнаружение ФДФазы в мышцах высших животных (Krebs, 1965) было неожиданным, и роль этого фермента до сих пор не совсем ясна, поскольку процесс ГНГ в мышцах теплокровных животных отсутствует. В настоящее время считают, что субстратный цикл $\text{ФДФ} \rightleftharpoons \text{Ф-6-Ф}$, ферментируемый ФФК и ФДФазой, служит средством повышения эффективности контроля гликолиза (Мильман, Юровицкий, 1973; Ньюс-Холм, Старт, 1977). Особенно важен этот контроль у животных с высокой естественной подвижностью, у которых резкое ускорение гликолиза служит источником выработки энергии — головоногих моллюсков, насекомых (Storey et al., 1975).

Что касается беспозвоночных, то процесс ГНГ исследован у них довольно слабо. Например, о глюконеогенезе в мышечной ткани моллюсков имеются немногочисленные литературные данные. В ноге моллюска *Mercenaria mercenaria* при месячном голодании наблюдалось повышение активности ФДФазы (Engel, Neat, 1970). В мышце пектена *Placopecten magellanicum* авторы отмечают необычно высокий уровень содержания гликогена и активности ФДФазы и ФЭПКК (O'Doherty,

Feltham, 1971) и приходят к заключению о глюконеогенезе в этой ткани. На устрице *Ostrea edulis* показано включение меченых предшественников глюконеогенеза — глицерина, аминокислот и глюкозы в гликоген во всех тканях, причем наиболее высокий уровень синтеза гликогена был в мантии и жабрах (L-Fando et al., 1972). Авторы отмечают, что синтез гликогена мало меняется при изменении напряжения кислорода от 5 до 100%, что в корне отличается от условий его синтеза у высших позвоночных.

Имеющиеся данные о локализации ферментов ФЭПКК, ФДФазы, гликогенсинтетазы свидетельствуют о равномерном распределении и относительно высокой активности их во всех основных тканях мидий — мышцах, мантии, гепатопанкреасе, жабрах. Ограниченность роли гемолимфы мидий в переносе интермедиатов из одной ткани в другую (по аналогии с ролью кровеносной системы) и в то же время активное функционирование ферментной системы глюконеогенеза как в обычных, так и в гипоксических условиях позволяет предполагать наличие процесса глюконеогенеза во всех тканях мидий. Об этом свидетельствуют данные об увеличении количества сахаров в тканях мидий в постгипоксический период, а также высокий уровень активности ферментов ГНГ в условиях гипоксии (Zwaan et al., 1975, a).

Следует сказать, что влияние гипоксии и аноксии на глюконеогенез у высших животных является малоизученным вопросом (Ньюс-Холм, Старт, 1977). Имеются лишь косвенные данные об активации гликолиза и ингибировании глюконеогенеза в условиях аноксии, что не исключает возможность одновременной активности ФФК и ФДФазы в это время. Авторы отмечают, что увеличение содержания промежуточных продуктов гликолиза в период гипоксии стимулирует образование глюкозы и циклическое превращение субстратов. Это сопровождается избыточным потреблением кислорода для обеспечения энергетических затрат. Последнее имеет место у мидий в постгипоксический период и также говорит в пользу активного глюконеогенеза в их тканях. Наконец, особенности кинетических свойств ФДФазы тканей мидий, описанные выше, — низкая чувствительность к субстрату и ингибитору, отсутствие полного ингибирования при высоких концентрациях АМФ и ФДФ, — также позволяют сделать вывод о наличии активного глюконеогенеза в их тканях в условиях гипоксии. Вероятно, гипоксию и постгипоксический период можно приравнять к непродолжительной физической нагрузке у высших животных, которая, по данным Э. Ньюс-Холма и Т. Старта (1977), стимулирует у них глюконеогенез на уровне субстратной и гормональной регуляции. Таким образом, механизм адаптации к анаэробному обмену не является уникальным свойством факультативных анаэробов. Явление анаэробноза широко распространено в мире животных. Различия существуют лишь в длительности существования животных в аноксических условиях, которые исчисляются сутками у факультативных анаэробов, часами — у земноводных и водных млекопитающих и минутами — у наземных млекопитающих.

Группой исследователей показано на митохондриях различных тканей

высших позвоночных животных, что адаптация к гипоксии у них также осуществляется путем переключения метаболизма на превращения янтарной кислоты, энергетически более выгодной, чем молочная (Кондрашова и др., 1973). При этом происходит накопление сукцината в митохондриях печени, мозга и на изолированном сердце крысы и рН снижается с 7,5 до 6,7. Образование сукцината энергетически выгодно. Одним из основных преимуществ образования этого вещества является его способность окисляться на фоне высокого уровня НАДН. Это объясняется тем, что сукцинатДГ является флавопротеидом и ее функционирование не зависит от наличия пиридиннуклеотидных коферментов.

Пути образования сукцината различны. Одним из основных является дикарбоновый участок цикла Кребса, функционирующий в обратном направлении. Второй путь — распад жирных кислот, который также не требует НАД⁺, и третий — цикл Роберта. Все эти пути обходят "узкое место" — дефицит НАД⁺. Важно, что использование накопившегося при гипоксии сукцината осуществляется очень быстро, что резко усиливает его преимущества перед НАД⁺-зависимыми субстратами. Преимущество сукцината в конкуренции за дыхательную цепь особенно ярко выражено при дефиците кислорода и окисленной формы НАД.

Аналогия между анаэробными адаптациями мидий и позвоночных проявляется и в отношении накопления аланина. Аланин является у высших позвоночных ключевой аминокислотой в процессе глюконеогенеза (Felig, 1973). Он легко превращается в глюкозу. Так, например, скорость глюконеогенеза в печени крыс представляет собой линейную функцию концентрации аланина. Кроме того, аланин, и только он, ингибирует ПК, способствуя переключению обмена на ФЭППК-путь, т.е. на путь глюконеогенеза (Кендыш, 1978). Превращение глутамата и глутамина в глюкозу в почках также происходит через продукцию аланина.

Таким образом, мы видим принципиальное сходство в функционировании биохимических реакций в условиях гипоксии или аноксии у представителей животного мира на всех уровнях организации. Наиболее классическим примером существования животных на основе описанного механизма энергетического обмена являются облигатные анаэробы — гельминты, у которых полностью редуцированы конечные ферменты гликолиза ПК и лактатДГ и весь путь расщепления углеводов идет по типу анаэробного обмена.

Из сказанного следует, что биохимические механизмы существования животных организмов в гипоксической и аноксической среде общие на всех уровнях организации, начиная с червей и моллюсков и кончая млекопитающими. Степень развития и эксплуатации этих механизмов находится в прямой зависимости от экологии данного вида и его эволюции.

В ходе биохимических адаптаций у анаэробов возникли определенные черты энергетического обмена, позволяющие им более или менее длительное время существовать в аноксических условиях. Только биохимические адаптации позволяют этим животным переносить резкие изменения температуры, солености и других факторов среды, т.е. быть

эврибионтными видами. Организмы, относящиеся к факультативным анаэробам, выживают в таких условиях, при которых другие животные быстро гибнут, например при заморных явлениях, загрязнении среды и т.д. (Биргер, 1979).

Высокая устойчивость мидий к действию токсических веществ, входящих в состав необрастаемых покрытий, также обусловлена их способностью изолироваться от внешней среды и переходить на анаэробный обмен. Это подтверждается данными о состоянии метаболитов и ферментов углеводного обмена. Например, резкое снижение потребления кислорода, усиленная утилизация гликогена и повышение концентрации олигосахаров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании изучения химического состава черноморских мидий в сезонном и экологическом аспектах, а также сезонной динамики ряда ферментов энергетического обмена дана физиолого-биохимическая характеристика их годового жизненного цикла. Изменения содержания основных компонентов химического состава мидий: протеина, углеводов и жира, — тесно связаны с половыми циклами и ростом моллюсков. Наиболее высокое содержание органических веществ приурочено к весеннему и осеннему репродуктивным циклам, когда содержание протеина, жира и калорийность мидий максимальны. Исходя из этих данных, оптимальные сроки добычи мидий рекомендуются в периоды их полового созревания: апрель—июнь и сентябрь—ноябрь.

Проблема физиолого-биохимических адаптаций беспозвоночных к существованию в аноксической среде чрезвычайно важна в теоретическом плане и имеет целый ряд прикладных аспектов. Основные особенности физиолого-биохимических адаптаций мидий к анаэробному образу жизни связаны со спецификой организации и функционирования гликолиза и сопряженных с ним реакций цикла Кребса. Энергетический обмен мидий характеризуется следующими особенностями: 1) высокое содержание в тканях гликогена — основного источника энергии в анаэробных условиях; 2) преобладание амилазного пути расщепления гликогена над фосфорилазным и относительно высокая активность начальных ферментов гликолиза — гексокиназы и фосфофруктокиназы, являющихся обычно лимитирующими звеньями гликолиза; 3) сопряжение конечных этапов гликолиза в условиях гипоксии с дикарбоновым участком цикла Кребса через высокоактивную ФЭПК по пути ФЭП → ЦУК → малат → фумарат → сукцинат с генерированием дополнительных макроэргических связей; 4) сбалансированность отношения активности малатДГ/лактатДГ, обеспечивающая поддержание гомеостаза коферментов, необходимого для функционирования гликолиза в условиях гипоксии; 5) высокая активность АлАТ и ААТ в анаэробных условиях, несущих функции объединения углеводного и аминокислотного метаболизма и сохранения равновесия окислительно-восстановительных потенциалов; 6) низкая чувствительность ФДФазы к избытку субстра-

та и ингибитора, позволяющая функционировать в условиях аноксии, обеспечивая процесс ресинтеза углеводов в этих условиях.

К основным биохимическим особенностям ферментов гликолиза мидий следует отнести такие черты их кинетики, как низкое сродство к кофакторам, обуславливающее слабую степень регуляции, что определяет возможность их работы при сдвиге внутриклеточного гомеостаза, наблюдающегося в анаэробных условиях и при других экстремальных воздействиях.

Особенности организации гликолиза в тканях мидий наряду с осуществлением эксплуативного характера адаптации (Хочачка, Сомеро, 1977) способствовали их широкому распространению в сублиторальной зоне Мирового океана и проявлению высокой устойчивости к неблагоприятным условиям обитания и антропогенным воздействиям.

На основании детального изучения влияния меди на уровень активности ферментов было выявлено наиболее чувствительное звено в цепи реакций энергетического обмена, катализируемое сукцинатом. Этот фермент жаберной ткани мидий ингибируется на 20–70% в диапазоне концентрации меди от 10 до 50 мкг/л. Легкость определения сукцинатДГ позволяет рекомендовать его в качестве тест-фермента для определения степени токсичности красок, содержащих медь.

Соотношение активности малатДГ/лактатДГ, а также сравнительные данные по биохимическому составу мидий в отдельные периоды годового цикла могут быть использованы в качестве репрезентативных показателей состояния мидий как в естественных условиях, так и при их разведении в марикультуре.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ И РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексахина Н.В., Ситни-
на Н.Ю. Изoenзимный состав гексоки-
назы гиалоплазмы скелетных мышц
крысы. — Науч. докл. высш. школы:
Биол. науки, 1972, № 10, с. 28–32.
- Алякринская И.О. Гемогло-
бин и гемоглобины беспозвоночных.
Биохимические адаптации к условиям
среды. — М.: Наука, 1979. — 155 с.
- Ананьев А.В. Пищеварительные
ферменты рыб и сезонная изменчивость
их активности. — Биохимия, 1959, 24,
№ 6, с. 870–875.
- Андреев А.К. Мышечная амилаза
рыб. — Биохимия, 1958, 23, № 6, с. 899–
903.
- Беклемишев В.Н. Основа срав-
нительной анатомии беспозвоночных. —
М.: Наука, 1964, т. 11. — 443 с.
- Беляев Н.Ф., Певзнер И.Д.,
Телепнева В.И. Содержание никоти-
намидных нуклеотидов и скорость
синтеза НАДФ в мышцах кролика в
процессе эмбрионального и постнаталь-
ного развития. — Журн. эволюц. биохим.
и физиол., 1972, 8, № 4, с. 375–380.
- Биргер Т.И. Метаболизм водных
беспозвоночных в токсической среде. —
Киев: Наукова думка, 1979. — 189 с.
- Бобкова А.Н. Адаптации организ-
мов ценноз обростаний к экстремаль-
ным воздействиям: Автореф. дис. канд.
биол. наук. — Севастополь, 1980. — 23 с.
- Брандт Т. Анаэробиз у позвоноч-
ных. — М.: Изд-во ИЛ, 1951. — 332 с.
- Браунштейн А.Е. Молекуляр-
ные основы каталитического действия
и специфического торможения при-
доксальных ферментов. — В кн.: Хими-
ческие факторы регуляции активности и
биосинтеза ферментов. М.: Медицина,
1969, с. 12–39.
- Вараксин А.А. О нейросекреции
у двусторчатых моллюсков мидии Грай-
ана и приморского гребешка. — Биоло-
гия моря, Владивосток, 1977, вып. 4,
с. 57–64.
- Васильева В.С. Сезонные изме-
нения теплоустойчивости клеток мерца-
тельного эпителия жабр мидии Грайана. —
В кн.: Экспериментальная экология
морских беспозвоночных. Владивосток,
Изд-во АН СССР ДВНЦ, 1976, с. 46–47.
- Вержбинская Н.А. Функцио-
нальная организация ферментной систе-
мы гликолиза в мышечной и нервной
тканях у головоногих моллюсков и
низших рыб. — Журн. эволюц. биохим.
и физиол., 1972, 8, № 3, с. 260–268.
- Вержбинская Н.А., Шапи-
ро А.З. Тканевой окислительный об-
мен мидий и его сезонные изменения. —
В кн.: Физиология и биохимия беспоз-
воночных. Л.: Наука, 1968, с. 233–242.
- Вержбинская Н.А., Сави-
на М.В. Эволюция гликолитической сис-
темы в типе моллюсков. — Журн. эволюц.
биохим. и физиол., 1971, 7, № 4, с. 337–
345.
- Виноградова З.А. Материалы
по биологии моллюсков Черного мо-
ря. — Труды Карадагской биологичес-
кой станции, 1950, 9, с. 39–45.
- Воробьев В.П. Мидии Черного
моря. — Труды АзчерНИРО, 1938, 11,
с. 13–30.
- Войнар А.О. Биологическая роль
микроэлементов в организме животных
и человека. — М.: Советская наука,
1953. — 329 с.
- Горомосова С.А., Тамож-
ная В.А. Уровень трансминазной ак-
тивности в тканях мидий в норме и в
условиях гипоксии. — Биология моря.
Киев, 1979, вып. 48, с. 118–122.
- Горомосова С.А., Тамож-
ная В.А. Сезонная динамика фермен-
тов переаминирования в тканях черно-
морских мидий. — Биология моря.
Владивосток, 1980, вып. 2, с. 62–68.
- Горомосова С.А., Шапи-
ро А.З., Бобкова А.Н. Биохими-
ческие адаптации организмов зообрас-
тания — причина их устойчивости к

действие ядов. — Биология моря. Киев, 1975, вып. 35, с. 4–52.

Гош Р.І., Жукинський В.М. Зміна інтенсивності дихання і анаеробного гліколізу у зрілий і перезрілий ікрі ляща. — В кн.: Гідробіологічні дослідження водойм України. Київ: Наукова думка, 1976, с. 100–101.

Давиташвили Л.М., Мерклин О.І. Справочник по экологии морских двустворок. — М.: Наука, 1966. — 351 с.

Долгопольская М.А. Биология морских обитателей. — Вопросы экологии. Киев, 1957, 1, с. 203–212.

Дынник В.В., Сельков Е.Е. Поведение гликолитической системы и обмена пуриновых нуклеотидов в условиях стрессовой АТФ-азной нагрузки. — В кн.: Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма. М.: Наука, 1978, с. 51–66.

Ермолаева Л.П., Мильман Л.С. Соотношение окисленных и восстановленных форм НАД и НАДФ в ооцитах и зародышах выюна. — Биохимия, 1974, 39, с. 314–319.

Зайцев Ю.П., Головенко В.К. Накопление, метаболизм и выведение ДДТ черноморской мидией. — ДАН УССР. Сер. Б, 1979, № 5, с. 372 — 375. ✓ Иванов А.И. Изучение роста черноморских мидий (*Mytilus galloprovincialis* L) при помощи подводных наблюдений. — Зоологический журн., 1965, 19, вып. 2, с. 178–181.

Интенсивность обмена глюкозы в животном организме с участием цикла трикарбоновых кислот/[Ф.Е. Путилина, Н.Д. Ещенко, Л.М. Крестникова, М.И. Прохорова]. — В кн.: Химия и обмен углеводов. М.: Наука, 1965, с. 307–314.

Карнаухов В.Н. Роль моллюсков с высоким содержанием каратиноидов в охране водной среды от загрязнения. — Пушино, 1978. (препринт). — 78 с.

Катунума Н., Окада М., Фудзино А., Матсудзава Т. Роль изоэнзимов трансминазы в обмене веществ. — В кн.: Химия и биология пиридоксалевого катализа. М.: Наука, 1968, с. 155–163.

Кендыш И.Н. Субстратная регу-

ляция глюконеогенеза. — Успехи совр. биол., 1978, 86, вып. 2, с. 192–206.

Кондрашова М.Н., Маевский Е.И., Бабаян Г.В., Саакян И.Р., Ахмеров Р.Н. Адаптация к гипоксии посредством переключения метаболизма на превращения янтарной кислоты. — В кн.: Митохондрии. Биохимия и ультраструктура. М.: Наука, 1973, с. 112–141.

Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1979. — 280 с.

Кудрявцева Г.В. Некоторые молекулярно-кинетические характеристики ферментов пентозофосфатного пути метаболизма углеводов. — Успехи совр. биол., 1980, 89, вып. 1, с. 74–90.

Лениджер А. Митохондрия. — М.: Мир, 1966. — 315 с.

Лисовская Н.П., Ливанова А.Б. Аллостерическая регуляция действия ферментов. — В кн.: Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1975, с. 99–120.

Лызлова Е.М. Аминотрансферазы скелетных мышц низших позвоночных. — Журн. эволюц. биохим. физиол., 1970, 6, № 2, с. 179–186.

Лызлова Е.М. Изоферменты аспартаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы соматических мышц низших позвоночных: Автореф. дис. канд. биол. наук. Л., 1974. — 24 с.

Маляревская А.А. Обмен веществ у рыб в условиях антропогенного евтрофирования водоемов. — Киев: Наукова думка, 1979. — 253 с.

Маляревская А.А. Специфические и неспецифические изменения в организме рыб при действии на них различных токсикантов. — Гидробиологический журн., 1978, № 1, с. 60–69.

Метаболизм α -кетоглутаровой кислоты в головном мозгу и печени в норме и после воздействия гипоксии/[М.И. Прохорова, Н.Д. Ещенко, Л.М. Осадчая, Ф.Е. Путилина]. — Вестник ЛГУ, 1975, № 3, вып. 1, с. 85–90.

Мильман Л.С., Юровицкий Ю.Г. Механизмы энзиматической регуляции углеводного обмена в раннем эмбриогенезе. — М.: Наука, 1973. — 234 с.

Нейфах С.А. Динамические структурные и генетические факторы интеграции обмена. — В кн.: Механизмы

интеграции клеточного обмена. Л.: Наука, 1967, с. 9–66.

Ньюс-Холм Э., Старт К. Регуляция клеточного метаболизма. — М.: Мир, 1977. — 407 с.

Озернюк Н.Д. Рост и воспроизведение митохондрий. — М.: Наука, 1978. — 216 с.

Перцева М.Н., Желудкова З.П. Начальные этапы углеводного обмена скелетных мышц в филогенезе (обзор). — В кн.: Ферменты в эволюции животных. Л.: Наука, 1969, с. 93–95.

Плисецкая Э.М., Солтицкая Л.П., Лейбсон Л.Г. Участие инсулина в регуляции метаболизма у морских двусторчатых моллюсков. — Журн. эволюц. биохим. физиол., 1979, 15, № 3, с. 288–293.

Поляновский О.Л. Аспаргатамин. Исследование структуры и каталитических свойств. — Успехи биол. химии, 1977, 18, вып. 1, с. 92–100.

Просер Л., Браун Ф. Сравнительная физиология животных. — М.: Мир, 1967. — 766 с.

Регуляторные изменения метаболических путей митохондрий и цитозола [Э.Ф. Деркачев, В.А. Алексеев, М.В. Константинов и др.]. — В кн.: Митохондрии. Транспорт электронов и преобразование энергии. М.: Наука, 1976, с. 136–156.

Репин В.С. Координация дыхания и гликолиза. — В кн.: Механизмы интеграции клеточного обмена. Л.: Наука, 1967, с. 205–260.

Розенфельд Е.Л. Механизмы регуляции действия ферментов, участвующих в обмене гликогена (обзор). — В кн.: Химия и биохимия углеводов. М.: Наука, 1969, с. 195–230.

Розенфельд Е.Л., Лукомская И.С. Некоторые новые аспекты в исследовании обмена гликогена. — В кн.: Молекулярная биология. М.: Наука, 1969, с. 112–154.

Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы. — М.: Мир, 1967. — 291 с.

Савина М.В. Окисление субстратов цикла Кребса и сопряженное фосфорилирование в митохондриях соматических мышц холоднокровных позвоночных. — Журн. эволюц. биохим. и физиол. 1965, 1, № 3, с. 404–408.

Северин Е.С., Телепнева В.И., Цейтлин Н.А. Пути и локализация

процессов обмена никотинамидаденин-нуклеотида в клетке. — В кн.: Химические факторы регуляции активности и биосинтеза ферментов. М.: Медицина, 1969, с. 16–24.

Селиванова Л.П., Климовицкая Л.М., Сабурова Л.М. Соотношение концентрации адениловых нуклеотидов как показатель степени гипоксии в различных тканях. — В кн.: Клеточное дыхание в норме и в условиях гипоксии. Горький, 1973, с. 60–61.

Серебrenникова Т.П., Лызлова Е.М. Некоторые особенности молекулярной эволюции гликогенфосфоорилазы и аминотрансфераз мышечной ткани позвоночных. — Журн. эволюц. биохим. и физиол., 1977, 13, № 2, с. 125–133.

Сопрунов Ф.Ф., Лачинова Р.И., Бенедиктов И.И. Физические свойства митохондрий беспозвоночных. — В кн.: Митохондрии: биохимия и морфология: Материалы 2-го симпозиума "Структура и функции митохондрий", 19–21 мая 1966 г. М.: Наука, 1967, с. 94–97.

Степанюк А.И. Аминокислотный состав гидробийонтов. — В кн.: Биохимическая характеристика беспозвоночных северо-западного шельфа Черного моря. Киев: Наукова думка, 1979, с. 16–40.

Телепнева В.И., Мештер Р.О. О содержании и методе определения нуклеотидов в мышцах в норме и при денервации. — Биохимия, 1969, 34, с. 160–166.

Трусевич В.В. Фосфорный обмен при плавании рыб. — В кн.: Элементы физиологии и биохимии общего и активного обмена у рыб. Киев, Наукова думка, 1978, с. 145–168.

Филенко О.Ф., Хоботьев В.Г. Загрязнение металлами. — Новости науки и техники, ВИНТИ, 1976, 3, с. 48–80.

Филосова-Лызлова Е.М. Изонзимы аспаргат- и аланинаминотрансфераз соматических мышц некоторых низших позвоночных. — Биохимия, 1972, 37, вып. 3, с. 498–505.

Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Мир, 1977. — 296 с.

Шапиро А.З., Бобкова А.Н. Активность гликолитических ферментов в тканях беспозвоночных. — В кн.:

Биохимическая эволюция. Л.: Наука, 1973, с. 42-47.

Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. — М.: Пищевая промышленность, 1972. — 367 с.

Юровицкий Ю.Г., Мильман Л.С. Фруктозо-1,6-дифосфатаза и ее возможная роль в углеводном обмене развивающегося зародыша вьюна. — Журн. эволюц. биохим. и физиол., 1967, 3, № 2, с. 128-133.

Юровицкий Ю.Г., Мильман Л.С. Гликогенсинтетаза ооцитов и зародышей вьюна. — Биохимия, 1974, 39, № 1, с. 86-94.

Юровицкий Ю.Г., Ермолаева Л.Н., Мильман Л.С. Регуляция глюконеогенеза как метаболической системы. — Успехи биол. химии, 1976, № 17, с. 217-234.

Addink A.D., Veenhof P.R. Regulation of mitochondrial matrix enzymes in *Mytilus edulis*. — 9th Eur. Mar. Biol. Symp., Obau, 1974, Aberdeen, 1975, p. 109-119.

Ahmad T.A., Chaplin A.E. Seasonal variations in the anaerobic metabolism of the mussel *Mytilus edulis* (L.). — Comp. Bioch. Physiol., 1979, 64, N 4, p. 351-356.

Ansell A.D. The adenosine triphosphate content of some marine bivalve molluscs. J. exp. mar. Biol. Ecol., 1977, 28, № 3, p. 269-283.

Augenfeld J.M. Respiratory metabolism and glycogen storage in barnacles occupying different levels of the intertidal zone. — Physiol. Zool., 1967, 40, № 1, p. 92-96.

Barnes H. and Blackstock J. Seasonal changes in the activity of certain enzymes in crude extracts of two common cirripedes *Balanus balanoides* and *B. balanus*. — J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 1975, 19, № 1, p. 81-96.

Bayne B.L. Aspects of physiological condition in *Mytilus edulis* L. with special reference to the effect of oxygen tension and salinity. — In: 9th Europ. Mar. Biol. Symp., Obau, 1974, Aberdeen, 1975, p. 213-238.

Bayne B.L., Bayne C.J., Carefoot T.C., Thompson R.J. The physiological ecology of *Mytilus californianus* Conrad. 2. Adaptation to low oxygen tension and air exposure. — Oecologia, Berl., 1976, 22, № 1, p. 229-250.

Behrlich H.W. On the subunit structure of seasonal isoenzymes of fructose-1,6-diphosphatase from muscle of the Alaskan king crab *Paralithodes camtschatica*. — Comp. Bioch. Physiol., 1975, 51B, № 3, p. 317-321.

Behrlich H.W., Hochachka P.W. Temperature and the regulation of enzyme activity in poikilotherms. Properties of rainbow trout fructosodiphosphatase. — Biochem. J., 1969, 111, № 2, p. 287-295.

Behrlich H.W., Jonson C.E. Regulation of enzyme activity at low temperature: ionic influences of FDFase from muscle of the arctic tanner crab *Ch. bairdi*. — Comp. Bioch. Physiol., 1974, 47B, № 2, p. 417-426.

Bennett R., Nakada H. Comparative carbohydrate metabolism of marine molluscs I. The intermediary metabolism of *Mytilus californianus* and *Haliotis rufescens*. — Comp. Biochem. Physiol., 1968, 24, № 3, 787-797.

Biswas A.K., Chose K.C. Elaboration of enzymes in the digestive gland of *Viviparus bengalensis* (Mollusca: Gastropoda) during the first hours of digestion. — J. Zool., 1968, 156, № 1, p. 3-9.

Black E.C., Robertson R.R., Racker E. Some aspects of carbohydrate metabolism in fish. — In: Comparative Physiology of carbohydrate metabolism in heterothermic animals. — Univ. Wash., Press Seattle, 1961, p. 89-100.

Blandamer A., Beachey R.B. The identification of an amylase in aqueous extracts of the hepatopancreas of *Carcinus maenas*, the common shore crab. — Comp. Biochem. Physiol., 1964, 13, № 1, p. 97-105.

Booth Ch.E., Mangum C.P. Oxygen uptake and transport in the lamellibranch mollusc *Modiolus demissus*. — Physiol. Zool., 1978, 51, № 1, p. 17-32.

Boulton A.P., Huggins A.K. Glycolytic activity in Crustaceans. — Comp. Biochem. Physiol., 1970, 33, № 3, p. 491-498.

Bourcart C.P., Lubet P. Cycle sexuel et evolution des reserves chez *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (mollusque bivalve). — Rapp. P. — V Réun. Comm. Int. Explor. Sci. Mer Mediterr., 1965, 18, № 2, p. 425-440.

Brand T. von, Berhstein H.D., Mehlman B. Studies of the anaerobic metabolism and the aerobic carbohydrate

consumption of some fresh water snails. — Biol. Bull., Woods Hole, 1950, 98, № 1, p. 266–276.

Bryan G.W. The effect of heavy metals on marine and estuarine organisms. Proc. Royal. Soc. London, 1971, 177, № 10, p. 1048–1051.

Bryant C., Hines W.J., Smith M.J. Intermediary metabolism in some terrestrial molluscs (Pomatias, Helix, Cepaea). — Comp. Biochem. Physiol., 1964, 11, № 1, p. 147–153.

Burt J.R. Glycogenolytic enzymes of cod (Gadus callarias) muscle. — J. Fisch. Res. Board Can., 1966, 23, № 4, p. 527–530.

Cameselle J.C., Sanchez J.Z. and Carrion A. The regulation of glycolysis in the hepatopancreas of the sea mussel Mytilus edulis L. — Comp. Biochem. Physiol., 1980, 65B, № 1, p. 95–102.

Chaplin A.E., Loxton J. Tissue differences in the response of the mussel Mytilus edulis to experimentally induced anaerobiosis. — Biochem. Soc. Trans., 1976, 4, № 2, p. 437–441.

Chen C., Awapara J. Intracellular distribution of enzymes catalysing succinate production from glucose in Rangia mantle. — Comp. Biochem. Physiol., 1969, 30, № 3, p. 727–737.

Cook P.A., Gabbot P.H. Glycogen synthetase in the sea mussel Mytilus edulis L. 1. Purification, interconversion and kinetic properties of the I and D-forms. — Comp. Biochem. Physiol., 1978, 60 B, № 3, p. 419–421.

Cowgill R.W. Phosphorylase system in the lobster. — Biol. Bull., 1965, 111, № 2, p. 300–301.

Cripps R.A., Reish D.J. The effects of environmental stress on the activity of malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in Neanthes arenaeodentata (Annelida, Polychaeta). — Comp. Biochem. Physiol., 1973, 46, № 1B, p. 123–134.

Danforth W.H. Glycogen Synthetase activity in skeletal muscle. Interconversion of two forms and control of Glycogen Synthesis. — J. Biol. Chem., 1965, 240, № 2, p. 588–593.

O'Doherty P.J.A., Feltham L.A.W. Regulation of lactic dehydrogenase in the giant scallop Placopecten magellanicus (Gmelin). — Comp. Biochem. and Physiol., 1971, 39B, № 1, p. 159–163.

O'Doherty P.J.A., Feltham L.A.W. Glycolysis and glyconeogenesis in the giant

scallop, Placopecten magellanicus (Gmelin). — Comp. Biochem. Physiol., 1978, 38B, № 3, p. 543–551.

Ebberink A.H., de Zwaan A. Control of glycolysis in the posterior adductor muscle of the sea mussel Mytilus edulis. — J. Comp. Physiol., 1980, 137B, № 2, p. 165–171.

Ebberink R.A., de Zwaan A. and Wijsman T.C.M. Regulation of the phosphoenolpyruvate Branchpoint by the adenylate energy in Mytilus edulis. — Biochem. Soc. Trans. 1976, 4, № 3, p. 44–46.

Ellington W.R., Lawrence J.M. Malic and lactic dehydrogenase activities and ratios in regular and irregular echinoderms (Echinodermata). — Comp. Biochem. Physiol., 1973, 45 B, № 4, p. 727–730.

Ellington W.R. Aerobic and anaerobic degradation of glucose by the estuarine sea anemone Diadumene leucolea. — Comp. Biochem. Physiol., 1977, 58 B, № 1, p. 173–175.

Engel R.H., Neat M.J. Glycolytic and glyconeogenic enzymes in the guahog Mercenaria mercenaria. — Comp. Biochem. Physiol., 1970, 37 B, № 3, p. 397–403.

L-Fando J.J., Garsis-Fernandes M.C., R-Candella J.L. Glycogen metabolism in Ostrea edulis—factors affecting glycogen synthesis. — Comp. Biochem. Physiol., 1972, 43 B, № 4, p. 807–814.

Fischer E.H., Stein N.C. The resistance of α -amylases towards proteolytic attack. — J. Biol. Chem., 1958, 232, № 3, p. 867–870.

Fraga F.J. Lopez-Capont. Oligosacáridos en el mejillón (M. edulis). Factor de proteínas. — Inv. Pesquera, 1958, 11, N 1, p. 39–52.

Freed J.M. Temperature effects on mussel muscle phosphofructokinase of the Alaskan king crab Paralithodes camtschatica. — Comp. Biochem. Physiol., 1971, 39 B, № 4, p. 765–774.

Gabbot and Head E.J.H. Seasonal changes in the specific activities of the pentose phosphate pathway enzyme g-6-PDH and 6-pGDH and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in the bivalves Mytilus edulis, Ostrea edulis and Crassostrea gigas. — Comp. Biochem. Physiol., 1980, 66 B, № 2, p. 279–285.

Gäde G., Wilps H., Kluytmans J.H., Zwaan A., de Glycogen degradation and end products of anaero-

- bic metabolism in the fresh water bivalve *Anodonta cygnea*. J. Comp. Physiol., 1975, 104, № 1, p. 79-85.
- Giese A.G. Lipids in the economy of marine invertebrates. - Physiol. Rev. 1966, 46, № 2, p. 89-104.
- Goddard C.K., Martin A.W. Physiology of mollusca. Carbohydrate metabolism (ed. by Wilbur K.M., Jonge C.M.). - Ac. Press, New York, 1966, 1, p. 275-308.
- Goto Joshitaka. Hepatic glycogen Synthetase of *Rana catesbeiana* and its larvae. - Seikagaku, J. Jap. Biochem. Soc., 1971, 43, N 12, p. 1042-1051.
- Grimm F.C., Doherty D.G. Properties of the two forms of malate dehydrogenase from beef heart. - J. Biol. Chem., 1961, 236, № 5, p. 1980-1985.
- Hammen C.S. Aminotransferase activities and amino acid excretion of bivalve mollusks and brachiopods. - Comp. Biochem. Physiol., 1968, 26 B, № 4, p. 697-705.
- Hammen C.S. Succinate and lactate oxidoreductase of bivalve molluscs. - Comp. Biochem. Physiol., 1975, 50 B, № 3, p. 407-412.
- Heyde E., Ainsworth S. Kinetic studies on the mechanism of the malate dehydrogenase reaction. - J. Biol. Chem., 1968, 243, № 9, p. 2413-2472.
- Hochachka P.W. The functional significance of variants of Fructose-1, 6-diphosphatase in the Gill and Hypodermis of a marine crustacean. A kinetic study. - Biochem. J., 1972, 127, № 5, p. 781-793.
- Hochachka P.W., Fields J., Mustafa T. Animal life without oxygen: basis biochemical mechanismus. - Am. Zool., 1973, 13, № 2, p. 543-555.
- Hochachka P.W., Owen T.G., Allen J.F., Whittton G.C. Multiple end products of anaerobiosis in diving vertebrate. - Comp. Biochem. Physiol., 1974, 50 B, № 1, p. 17-22.
- Hochachka P.W., Somero G.N. Enzyme and metabolic adaptations to low oxygen. - In: Adaptation to environment, Essays on the Physiology of marine animals (ed R.C. Newell). Butterworths, London-Boston, 1976, p. 279-315.
- Horinchi S. and Lane C.E. Carbohydrates of the crystalline style and hepatopancreas of *Strombus gigas* Line. - Comp. Biochem. Physiol., 1966, 17, № 4, p. 1189-1197.
- Hutchinson W.F. and Oelschlegel F.J. Hexokinase of adult dog heartworm *Dirofilaria immitis*. - Comp. Biochem. Physiol., 1977, 58B, № 1, p. 131-134.
- Ioshida A. Purification and chemical characterization of malate dehydrogenase of *Bacillus subtilis*. - J. Biol. Chem., 1964, 240, № 3, p. 1113-1117.
- Ivanovici A. The adenilate energy chance in the estuarine mollusc *Pyrazus ebeninus*. Laboratory studies of responses to salinity and temperature. - Comp. Biochem. Physiol., 1980, 66 A, № 1, p. 43-55.
- Kaplan N.O., Goodfriend T.L. Role of two types of lactic dehydrogenase. - In: Adv. Enzym. Reg., 1964, 2, p. 203-212.
- Kluytmans J.H., Veenhof P.R., Zwaan A. de. Anaerobic production of volatile fatty acid in the sea mussel *Mytilus edulis* L. - J. Comp. Physiol., 1975, 104 B, № 1, p. 71-78.
- Kluytmans J.H., Zwaan A. de. Production of volatile fatty acids in bivalved Molluscs. - Biochem. Soc. Trans., 1976, 4, № 3, p. 475-477.
- Kluytmans J.H., Bont A.M.T. de, J. Janus and Wijsman T.C.M. Time dependent changes and tissue specificities in the accumulation of anaerobic fermentation products in the sea mussel *Mytilus edulis* L. - Comp. Biochem. Physiol., 1977, 58 B, № 1, p. 81-88.
- Kluytmans J.H., Zandee D.J., Zurburg W. and Picter H. The influence of seasonal changes on energy metabolism in *Mytilus edulis* (L.) - III. Anaerobic energy Metabolism. - Comp. Biochem. Physiol., 1980, 67 B, № 2, p. 307-317.
- Krebs A.A., Woodford M. Fructose-1, 6-diphosphatase in Striated Muscle. - Biochem. J., 1965, 94, № 2, p. 436-444.
- Lesicki A. The regulation of phosphofructokinase activity in hepatopancreas and abdominal muscle of the crayfish *orconectes Limosus* raf. (Crustacea: Decapoda). - Comp. Biochem. Physiol., 1980, 66 B, № 2, p. 291-296.
- Livingstone D.R. Some kinetic and regulatory properties of the cytoplasmic α -malate dehydrogenases from the posterior adductor muscle and mantle

tissue of the Common muscle *Mytilus edulis*. - Biochem. Soc. Trans., 1976, 4, № 3, p. 447-451.

Livingstone D.R., Bayne B.L. Responses of *Mytilus edulis* L. to low oxygen tension: anaerobic metabolism of the posterior adductor muscle and mantle tissues. - J. comp. Physiol., 1977, 114, № 1B, p. 143-155.

Lubet P. Ecophysiologie de la reproduction chez les mollusques Lamellibranches. - Haliotis, 1976, № 7, p. 49-55.

Manohar L., Venkateswara P. Rao. Swamy K.S. Variations in Aminotransferase Activity and Total Free Amino Acid Levels in the Body Fluid of the Snail *Lymnaea luteola* during Different Larval Trematode Infections. - J. Invertebr. Pathology, 1972, 19, № 1, p. 36-41.

Mattisson A.G.M. and Burch-Anderson I.P. On the structure of the mitochondria and relation to the oxidative capacity in muscle in various invertebrates. - J. Ultrastructure Research, 1962, 6, № 2, p. 205-218.

McGeachin R.L., Debnam I.W. Amylase in fresh water fish. - Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 1960, 103, № 3, p. 814-118.

McWhinnie M.A., Kirshen-berg R.J. Crayfish hepatopancreas metabolism and the intermolt cycle. - Comp. Biochem. Physiol., 1962, 6, № 2, p. 159-170.

Meenakshi J.R. Anaerobiosis in the south Indian apple snail *Pila virens* during aestivation. - J. Zool. Soc. India, 1956, 9, № 1, p. 62-80.

Michejda J., Kasprzak L., Obuchowicz L., Zerbe T. Respiratory metabolism in snail *Helix pomatia*. III. Oxidative phosphorylation in heart muscle. - Bull. Soc. Amis. Sci et lettres. Poznan D., 1963, 1964, № 4, p. 115.

Monnier P., Gras J., Huguet R. Etudes biochimiques des mollusques. Les protéides de la moule (*M. galloprovincialis*) au cours de son cycle évolutif. 1. Les protéines totales. - Trav. Soc. pharmac. Mont-Pellier, 1958, 18, № 1, p.

Mustafa T. and Hochacka P.W. Catalic and regulatory properties of pyruvate kinase in tissues of a marine bivalves. - J. Biol. Chem., 1971, 246, № 10, p. 3196-3203.

Mustafa T., Hochacka P.W.

Enzymes in facultative anaerobiosis of molluscs. 2. Basis catalytic properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase in oyster adductor muscle. - Comp. Biochem. Physiol., 1973, 45 B, № 3, p. 639-657.

Narang S. and Narang N. Characterization of malate dehydrogenase: electrophoresis, isoelectric focusing, thermostability, inhibition and activity studies on homogenates of various organs of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Palmonata). - Comp. Biochem. Physiol., 1974, 49 B, № 3, p. 477-490.

Olson von Roff. Changes in endogenous substrates of isolates rabbit heart mitochondria during storage. - J. Biol. Chem., 1967, 242, № 2, p. 325-333.

Orlicky I., Ruscak M. and Uhliarova K. Alanine aminotransferase and lactate dehydrogenase activity in the crayfish and rabbit striated muscles. - Comp. Biochem. Physiol., 1977, 56 B, № 1, p. 71-75.

Read K.P.H. Transamination in certain tissue homogenates of the bivalves molluscs *Mytilus edulis* L. and *Modiolus modiolus*. - Comp. Biochem. Physiol., 1962, 7, № 1, p. 15-22.

Renzone A. Osservazioni sulle gonadi di mitilo (*M. galloprovincialis* Lam.). I. Variazioni stagionali del glicogeno. - Pubbl. Staz. zool. Napoli, 1961, 32, № 1, p. 43-46.

Rosa G., de Swick R.W. Metabolic implications of the alanine aminotransferase isoenzymes. - J. Biol. Chem., 1975, 250, № 20, p. 7961-7967.

Sanwal B.D. Regulatory mechanisms involving nicotinamide adenine nucleotides as allosteric of malate dehydrogenase. - J. Biol. Chem., 1969, 244, № 7, p. 1831-1837.

Sansone S., Biondi A., Novello L. Distribuzione di amminiacoli liberi in *M. galloprovincialis* elro liquidi tissutali compionati in habitat diversi del deldolfo di Napoli. - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1977, 53, № 18 bis, p. 9-13.

Sarkissian I.V., Gomolinski E. Regulation of malate dehydrogenase from an osmoconformer by salt. - Comp. Biochem. Physiol., 1976, 53 B, № 3, p. 191-194.

Sevall J.S., Ki-Han Kim. Regulation of hepatic glycogen synthetase of *R. catesbiana*. Studies of ATP inhibition with reference to insulin activation of gly-

cogen synthetase. - J. Biol. Chem., 1971, 246, № 9, p. 2959-2962.

Simpson J.W., Awapara J. Phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in invertebrates. - Comp. Biochem. Physiol., 1964, 12, № 4, p. 457-464.

Simpson J.W., Awapara J. The pathway of glucose degradation in some invertebrates. - Comp. Biochem. Physiol., 1966, 18, № 4, p. 537-548.

Somero G.N. Pyruvate kinase variations of the Alaskan king crab. - Biochem. J., 1969, 114, № 1, p. 237-241.

Stetten J.R., Stetten M.R. Glycogen metabolism. - Physiol. Rev., 1960, 40, № 3, p. 505-537.

Stokes T., Awarapa J. Alanin and succinat as end products of glucose degradation in the clam *Rangia cuneata*. - Comp. Biochem. Physiol., 1968, 25, № 4, p. 883-892.

Storey K.B. Purification and properties of adductor muscle phosphofructokinase from the Oyster, *Crassostrea virginica*. The aerobic/anaerobic transition: role of arginine phosphate in enzyme control. - European J. of Biochemistry, 1976, 70, № 2, p. 331-339.

Storey K.B., Baldwin J., Hochachka P.W. Squid muscle fructose-diphosphatase and its role in the control of FDF-F-6 F cycling. - Comp. Biochem. Physiol., 1975, 52B, № 1, p. 165-168.

Swani K.S., Reddy A.S. Adaptive changes to survival during aestivation in the gastropod snail, *Pila globosa*. - J. Scient. Ind. Res., 1978, 37, № 3, p. 114-157.

Taketa K., Pogell B.M. Reversible inactivation and inhibition of liver fructose 1,6-diphosphatase by adenosine nucleotides. - Biochem. Biophys. Res. Comm., 1963, 12, № 1, p. 229-235.

Thabrew M.I., Poat P.C., Munday K.A. Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* tissue. - Comp. Biochem. Physiol., 1971, 40, № 2, p. 531-541.

Viera E.C., Ladeira B.A. Amylase of the Snail *Australorbis glabratus* (Mollusca, Planorbidae). - Comp. Biochem. Physiol., 1965, 41, № 2, p. 244-249.

Vooy's C.C., de. The influence of temperature and time of year on the oxygen uptake of the sea mussel *Mytilus edulis*. - Mar. Biol. Ass. U. K., 1976, 36, № 1, p. 25-30.

Vooy's C.G.N., de. Anaerobic meta-

bolism in sublittoral living *Mytilus galloprovincialis* Lam. in the Mediterranean. I. Partial adaptation of anaerobic energy metabolism. - Netherlands. - J. Sea. Res., 1979, 13, № 2, p. 192-202.

Vooy's C.G.N., de. Anaerobic metabolism in sublittoral living *Mytilus galloprovincialis* Lam. in the Mediterranean. II Partial adaptation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase. - Comp. Biochem. Physiol., 1980, 65 B, p. 513-518.

Wang D.H., Scheer B.T. UDPG - glycogen transglucosylase and a natural inhibitor in crustacean Tissues. - Comp. Biochem. Physiol., 1963, 9, № 1, p. 263-273.

Weinbach E.C. The influence of pentachlorophenol on oxidative and glycolytic phosphorylation in snail tissue. - Arch. Biochem. Biophys. 1956, 64, № 1, p. 129.

Widdows J., Bayne D.L., Livingstone D.R., Newell R.J.E. and Donkin P. Physiological and biochemical responses of bivalve molluscs to exposure to air. - Comp. Biochem. Physiol., 1979, 62 A, № 2, p. 301-309.

Wieser W., Wright E. D-lactate formation, D-dH activity and glycolytic potential of *Helix pomatia* L. - J. Comp. Physiol., 1978, 126 B, № 3, p. 249-255.

Wijsman T.C.M. Adenosine phosphates and energy charge in different tissues of *Mytilus edulis* under aerobic and anaerobic conditions. - J. Comp. Physiol., 1976, 107, № 1, p. 129-140.

Zaba B.N., Davies J.T. The contribution of the pentose cycle to the central pathways of metabolism in the marine mussel, *Mytilus edulis* L. - Biochem. Soc. Trans., 1979, 7, № 4, p. 900-902.

Zs-Nagy I. On the validity of enzymatic assay of adenosine phosphates in crude extracts of some marine bivalves. - Comp. Biochem. Physiol., 1977, 56B, № 2, p. 271-274.

Zurburg W. and Kluytmans J.H. Organ specific changes in energy metabolism due anaerobiosis in the sea mussel *Mytilus edulis*. - Comp. Biochem. Physiol., 1980, 67, № 2B, p. 317-323.

Zwaan A., de., Zandee D.I. Body distribution and seasonal changes in the glycogen content of the common sea mussel *Mytilus edulis*. - Comp. Biochem. Physiol., 1972, 43B, № 1, p. 53-58.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Адаптация биохимическая 3, 5, 36, 72, 74, 104, 108
 — к гипоксии (см. гипоксия)
 — механизмы 61, 64, 100, 107
- Адениннуклеотиды
 — концентрация в клетке 67, 68, 69
 — — в условиях гипоксии 96, 97, 98
 — регуляция активности ферментов 23, 31
 — — гликолиза 67
 — — глюконеогенеза 47
 — сезонная динамика 70
 — энергетический заряд клетки 68, 71
- Аденозиндифосфат
 — влияние на активность малатдегидрогеназы 44
 — — фосфофруктокиназы 23
 — содержание в тканях 68
 — — в гипоксии 97, 98
- Аденозинмонофосфат
 — регуляция активности ферментов гликолиза 38
 — — глюконеогенеза 49, 94
- Аденозинтрифосфат
 — — влияние солености 72
 — — температуры 70
 — регуляция ферментов гликолиза 23
- Аланин
 — сезонная динамика 84, 85
 — содержание в тканях 3, 81, 90, 100, 107
- Аланинтрансминаза
 — активность в разных тканях 56, 57
 — — гипоксия и яды 93, 94, 96
 — кинетические свойства 61—65
 — сезонная динамика 58—60
 — субклеточная локализация 57, 58, 60, 94
- α -амилаза
 — активность в тканях 15, 16, 18
 — амилализ в мышцах 18, 19
 — гипоксия и яды 86, 87
 — свойства 15
- γ -амилаза
 — активность 17, 19
 — — в гипоксии 95
- Аминокислоты
 — обмен 56
 — — в гипоксии 82, 84, 85
- Анаэробный обмен 4, 36, 39
 — активность трансминаз 94, 95
 — активность ферментов гликолиза 33, 39
 — активность ферментов глюконеогенеза 95, 96, 103
 — содержание субстратов гликолиза 47, 48, 55, 74, 95
 — — конечных продуктов 83, 84, 85
 — — промежуточных продуктов 77, 78, 79
- Аспартаттрансминаза
 — активность в гипоксии 56, 57, 94
 — — в разных тканях 56
 — гипоксия и яды 94, 95
 — кинетические свойства 61—65
 — сезонная динамика 59, 60
 — субклеточная локализация 57, 51
- Водная токсикология 3
- Гаметогенез 7, 9, 10, 60, 61
- Гексокиназа
 — активность 19, 20, 86, 99, 101
 — кинетические характеристики 21, 22
- Гексомонофосфатный шунт
 — активность 27, 30, 102
 — соотношение с гликолизом 30, 102
- Гипоксия (см. анаэробный обмен) 72, 74, 75, 77, 78—80, 86, 97, 99
- Гликоген
 — анаэробный катаболизм 47, 75, 76
 — расщепление амилалитическое 22, 23
 — — фосфоролитическое 22, 23
 — — сезонность 73, 74
 — синтез 47, 48, 55
 — содержание в тканях 55, 74
 — — в условиях гипоксии 75, 76
- Гликогенсинтетаза (ГС)
 — активность в тканях 47—49
 — гликогенез 47, 102
 — — в гипоксии 97
 — регуляция и свойства 47
 — сезонная динамика 50
- Гликолиз
 — концентрация промежуточных продуктов (см. моно- и дигексозы, ФЭП, пируват)
 — лимитирующие звенья 13, 21
 — начальные этапы 13
 — при аноксии и др. экстремальных воздействиях 73
 — регуляция 101, 102, 103
 — эффективность у пластинчатожаберных моллюсков 67
- Глицеринальдегиддегидрогеназа 32
- Глутамат 81, 82
 — сезонная динамика 85
 — содержание в тканях 84
- Глюкоза
 — содержание в тканях 76, 95
 — — при гипоксии 77, 86
 — фосфорилирование 13, 18
 — энергетический баланс окисления 66
- Глюкозо-6-фосфат
 — содержание 13, 77

- в гипоксии 78, 80
- Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа**
 - активность 28—30
 - влияние гипоксии 86
 - кинетические свойства 30, 31
 - сезонность 30
- Годовой жизненный цикл** 4, 7, 10
- Жир**
 - баланс 9
 - содержание 7, 8, 9, 10
- Загрязнение среды** 3
- Калорийность** 9, 10
- Конечные продукты анаэробного обмена** 81, 83
- Лактат** 3, 104
- Лактатдегидрогеназа**
 - активность 36—39, 90, 102
 - влияние гипоксии 87, 89
 - — солёности 89
 - отношение малатдегидрогеназы/лактатдегидрогеназы 38, 108
- Малат**
 - содержание в тканях 79
 - — в условиях гипоксии 80
- Малатдегидрогеназа**
 - активность 38, 40, 46
 - влияние АДФ и АТФ 44
 - — гипоксии 89, 104
 - — кислот ЦТК 45
 - — солёности 89, 90
 - — ядов 90, 91
 - кинетические свойства 39—41, 43
 - локализация в клетке 40
- Марикультура** 4, 10, 109
- Никотинамидадениндинуклеотид**
 - регуляция малатдегидрогеназы 45
 - содержание в тканях 65
 - — при гипоксии 99
 - — соотношение окисленной и восстановленной форм 66, 67
- Никотинамидадениндинуклеотидфосфат**
 - содержание в тканях 65
 - — при гипоксии 99
 - — соотношение окисленной и восстановленной форм 66, 67
- Олигосахариды**
 - влияние гипоксии 108
 - содержание в тканях 73
 - — сезонная динамика 74
- Пируват**
 - содержание 78
 - — в условиях гипоксии 79

- Пируваткиназа**
 - кинетические свойства 34, 102, 104
 - регулирующая роль в анаэробии 33, 84, 102
- Размножение**
 - репродуктивные периоды 7, 8, 9
- Регуляторные ферменты гликолиза и глюконеогенеза** 4, 13, 21, 25, 101, 102
- Сезонная динамика химического состава** 8, 11
- Сукцинат** 3, 38, 62, 83, 84, 90, 100, 104
- Сукцинатдегидрогеназа**
 - активность 91, 92
 - — гипоксия и яды 92, 99
- Факультативные анаэробы** 3, 106, 107
- Физиолого-биохимическая характеристика мидий** 10
- Филогенез** 18, 24, 37, 100
- Фосфорилаза**
 - активность 15, 17, 18
 - — влияние гипоксии и ядов 86, 87
 - регуляция и свойства 13, 14, 15
 - сезонные колебания 14, 15
- Фосфофруктокиназа**
 - активность 23, 25, 101
 - — влияние АТФ, АДФ и АМФ 23, 24
 - — субстратный цикл 24
- Фосфоэнолпируват**
 - содержание в норме 33
 - — в условиях гипоксии 79
- Фосфоэнолпируваткарбоксикиназа**
 - активность 33, 34
 - — в гипоксии 84, 102
 - кинетические свойства 34—36
- Фруктозодифосфат**
 - содержание в норме и в гипоксии 77
- Фруктозодифосфатаза**
 - активность 54
 - влияние гипоксии и ядов 95, 96, 103
 - ингибиторы 24, 52, 96
 - кинетические свойства 50, 51, 52, 96
 - сезонная динамика 54, 55
- Щавелевоуксусная кислота**
 - отношение ЩУК/малат 80
 - содержание в тканях 78
 - — при гипоксии 33, 79
 - — сезонность 80
- Эврибионт** 3
- Экология** 20, 74
- Энергетический обмен** 5, 72, 73, 107

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Список сокращений	5
Номенклатура ферментов	6
 Г л а в а 1. Физиолого-биохимическая характеристика периодов годового цикла мидий	7
 Г л а в а 2. Ферменты гликолиза и гексозомонофосфатного шунта в тканях мидий	11
Начальные этапы гликолиза	13
Гексозомонофосфатный шунт	27
Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	28
Центральное звено гликолиза	32
Конечные этапы гликолиза и сопряженных с ним реакций ЦТК	33
 Г л а в а 3. Ключевые ферменты гликогенеза и глюконеогенеза	47
Г л а в а 4. Ферменты переаминирования	55
Г л а в а 5. Пиримидин- и адениннуклеотидная системы в тканях мидий	65
Г л а в а 6. Энергетический обмен мидий в анаэробных условиях	72
Субстраты анаэробного обмена	73
Промежуточные продукты	77
Конечные продукты	81
Активность ферментов гликолиза при некоторых экстремальных воздействиях	86
 Г л а в а 7. Особенности процессов гликолиза и глюконеогенеза у моллюсков	100
Закключение	108
Список использованной и рекомендуемой литературы	110
Предметный указатель	118

248

СВЕТЛАНА АРОНОВНА ГОРОМОСОВА,
АННА ЗАХАРОВНА ШАПИРО

ОСНОВНЫЕ ЧЕРТЫ БИОХИМИИ
ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА МИДИЙ

Редактор С. Б. Макарова
Художник С. Н. Орлов
Художественный редактор В. В. Зеркаленкова
Технический редактор Т. С. Пронченкова
Корректоры Н. П. Багма, Р. А. Взорова

ИБ № 688

Сдано в набор и подписано в печать 29.08.83 г. Т – 15479. Формат 60х90/16. Бумага офсетная № 2. Ротапринт. Объем 7,5 п.л. Усл. печ. л. 7,5. Усл. кр.-отт. 7,88. Уч.-изд. л. 9,99. Тираж 1200 экз. Заказ 248 Цена 1 р 50 к.

Издательство "Легкая и пищевая промышленность" 113035, Москва, М-35,
1-й Кадашевский пер., д. 12.

Московская типография № 9 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
Москва, Ж-33, Волочаевская ул., д. 40.

С.А.Горомосова, А.З.Шапиро

**ОСНОВНЫЕ ЧЕРТЫ
БИОХИМИИ
ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО
ОБМЕНА МИДИЙ**

Мидии — ценный объект промысла и марикультуры. Длительные наблюдения за популяциями мидий позволили установить, что биохимические процессы, протекающие в их тканях, могут служить показателями степени загрязнения окружающей среды.

В книге приведены данные о сезонной динамике химического состава и особенностях энергетического обмена мидий в нормальных и экстремальных условиях.

Результаты выполненных авторами исследований позволяют подойти к решению некоторых важных экологических проблем.