

УДК 594.124:577.1

Т. И. Андреевко¹, А. Д. Куликова², А. А. Солдатов²

**АКТИВНОСТЬ АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ
В ТКАНЯХ MYTILUS GALLOPROVINCIALIS,
РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ОКРАСКОЙ СТВОРОК
РАКОВИНЫ**

Применение метода фотографирования и цифровой обработки снимков раковин позволило идентифицировать четыре цветовые группы *Mytilus galloprovincialis* Lam.: чёрные, переходные, тёмно-коричневые и светло-коричневые. Установлено, что активность аспаратаминотрансферазы в тканях моллюска возрастает по мере осветления его раковины. Допускается, что различия в активности фермента генетически определены и связаны с толерантностью цветовых групп моллюска к условиям внешней гипоксии.

Ключевые слова: *Mytilus galloprovincialis* Lam., цвет раковины, активность аспаратаминотрансферазы.

За разнообразием популяционной структуры вида обычно стоит неоднородность населяемых им биотопов. Двустворчатый моллюск *Mytilus galloprovincialis* Lam. является массовым в черноморском регионе, его поселения отмечаются на иловых и скальных субстратах, принципиально различающихся абиотическими условиями [3]. Для иловых поселений характерно преобладание моллюсков со светло-коричневой окраской раковины, для скальных — с окраской чёрно-фиолетового цвета [3, 4].

Считается, что цвет раковины *M. galloprovincialis* генетически заложен и определяет особенности метаболических процессов в его тканях: скорость соматического роста, прочность и темпы регенерации биссуса, содержание и состав каротиноидов [2, 11]. Гибридологические исследования позволяют принять в качестве предварительной модели простую однокусную двухаллельную схему наследования цвета раковины [9]. Однако этот подход оспаривается в ряде работ [10, 18, 19].

На основе сравнительной оценки абиотических условий скальных и иловых биотопов можно предположить, что основным фактором, определяющим направление естественного отбора, является содержание кислорода в морской среде. Отсюда следует, что поиск различий на популяционном уровне должен быть сосредоточен на молекулярных системах, ответственных за толерантность моллюска к гипоксии и аноксии.

© Т. И. Андреевко, А. Д. Куликова, А. А. Солдатов, 2014

Аспаратаминотрансфераза (АСТ, КФ 2.6.1.1) — эндогенный фермент класса трансфераз, катализирующий при участии кофермента пиридоксаль-5'-фосфата обратимый перенос аминокетильной группы от L-аспартата на 2-оксоглутарат с образованием оксалоацетата и L-глутамата [7]. Она представлена цитоплазматической и митохондриальной фракциями [21] и определяет устойчивость моллюсков к экстремальным формам гипоксии и аноксии, так как сопрягает процессы белкового и углеводного обменов (аспартат-сукцинатное направление метаболизма) [13]. У моллюсков, толерантных к анаэробно-анаэробному, отмечаются значительные ресурсы D-аспартата в раковине [17].

В настоящее время для АСТ принята шестиаллельная схема наследования [14]. Она допускает существование 21 возможного варианта генотипа, из которых 13 обнаружено экспериментально [14]. Таким образом, система АСТ является удобной моделью для изучения популяционной структуры *M. galloprovincialis*.

В настоящей работе дана сравнительная оценка активности АСТ в тканях четырёх цветовых групп *M. galloprovincialis*, установленных на основании цифровой обработки фотографий створок [6].

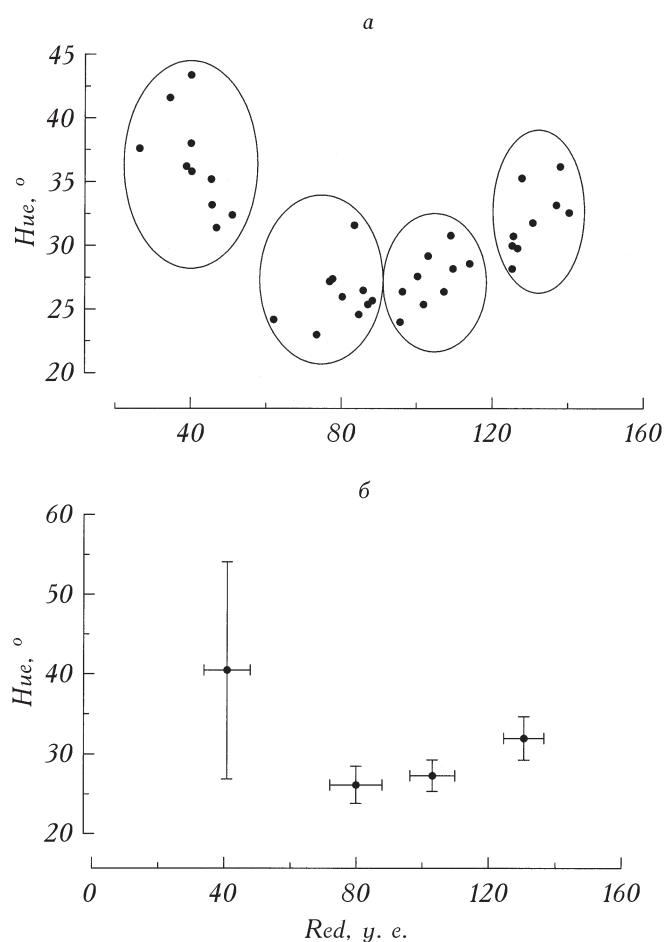
Материал и методика исследований. Объектом исследований служили половозрелые особи *M. galloprovincialis* (семейство Mytilidae) обоего пола с различным характером пигментации створок. Длина раковины составляла 42—75 мм. Животных собирали одновременно с коллекторных установок мидийного хозяйства ООО «Яхонт ЛТД», расположенных в бух. Качивели, в 2012 г.

Транспортировку осуществляли в термоизолированном контейнере (объёмом 10 л) без воды в течение 1 ч от момента сбора. После доставки мидий выдерживали в аквариуме (объём 30 л) с проточной морской водой в течение 3 суток. Этот период является достаточным для восстановления функциональной нормы [22]. Температура и солёность воды в аквариумах составляли $20 \pm 1^\circ\text{C}$ и 13—14‰.

Характер окраски раковин оценивали при помощи фотографирования и цифровой обработки снимков в системе координат Red-Hue (Adobe Photoshop CS-3) [6].

Мягкие ткани моллюсков (жабры и ногу) препарировали при температуре 0—4°C. Полученные образцы хранили при $-27^\circ - 28^\circ\text{C}$ в морозильной камере (Liebherr-Comfort, Германия). Гомогенаты готовили непосредственно в день исследования. В качестве трансформирующей среды использовали 1,15%-ный раствор KCl. Для получения супернатанта гомогенаты центрифугировали 15 мин при $6000 \text{ об}\cdot\text{мин}^{-1}$. В работе использовали рефрижераторную центрифугу К-23D (Германия). Все операции осуществляли при 0—4°C.

Активность АСТ определяли унифицированным динитрофенилгидразинным методом Райтмана—Френкеля [5]. В состав инкубационной среды входили 0,25 мл субстратного раствора АСТ: в 100 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4) растворяли 29,2 мг α -кетоглутаровой и 2,66 г L-аспарагиновой кислот. Реакцию запускали внесением 0,05 мл KCl-супернатанта ткани. Смесь инкубировали при 25°C в течение 60 мин. Процесс останавливали



1. Распределение цветовых характеристик створок *M. galloprovincialis* в системе координат Red-Hue (Adobe Photoshop CS-3): а — полигон распределения; б — результаты статистической обработки, \pm — .

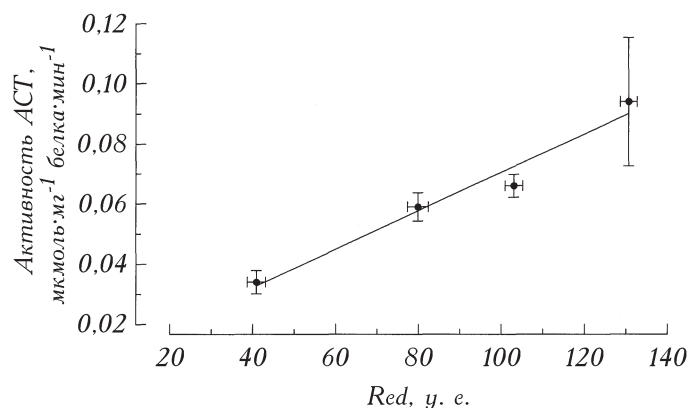
внесением 0,25 мл 2,4-динитрофенилгидразина. Через 20 мин добавляли 2,5 мл 0,4 М раствора NaOH. Экстинкцию гидразина измеряли при длине волны 540 нм на однолучевом спектрофотометре СФ-26. Активность выражали в $\text{мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка. В работе использовали стандартный набор реактивов «Simco. Ltd» (Украина). Содержание белка в пробах устанавливали по методу Лоури [15].

Цифровой материал обработан статистически при помощи *t*-критерия Стьюдента и методов корреляционного анализа. Нормальность распределения выборочных совокупностей проверяли при помощи критерия Пирсона. Объем выборочной совокупности — 40 особей.

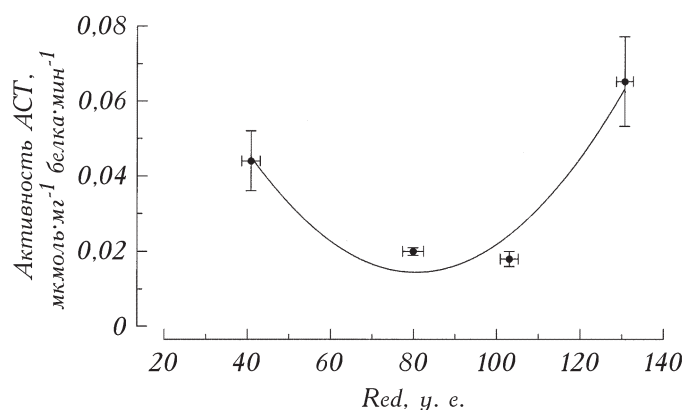
Результаты исследований и их обсуждение

Применение метода фотографирования и цифровой обработки снимков раковин в системе координат Red-Hue (Adobe Photoshop CS-3) позволило идентифицировать четыре цветовые группы (рис. 1): чёрные, переходные, тёмно-коричневые и светло-коричневые. Различия по параметру Red были статистически значимы ($p < 0,001$). Следует отметить, что по мере осветления раковины значения Red увеличивались.

Активность АСТ выражено зависела от цвета раковины моллюска (рис. 2). В ноге её можно было описать уравнением линейной регрессии с высокими значениями R^2 (0,967). Максимальная активность ($0,094 \pm$



2. Зависимость активности АСТ в ноге *M. galloprovincialis* от цветовой характеристики раковины ($\bar{x} \pm s$).



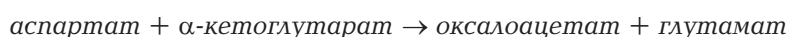
3. Зависимость активности АСТ в жабрах *M. galloprovincialis* от цветовой характеристики раковины ($\bar{x} \pm s$).

0,021 мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) отмечена у особей со светло-коричневой окраской раковины, а минимальная — с раковиной чёрной окраски. Различия составили 2,8 раза ($p < 0,001$).

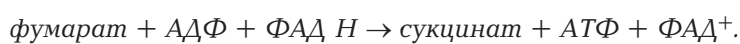
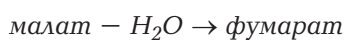
Близкие результаты были получены и в жабрах (рис. 3). У моллюсков со светло-коричневой окраской активность АСТ составила $0,065 \pm 0,012$ мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка, это почти на 50% выше, чем у особей с чёрной ($p < 0,05$), и более чем втрое выше, чем у особей с переходной и тёмно-коричневой окраской ($p < 0,001$). При этом зависимость лучше описывалась уравнением параболической функции.

Как уже отмечалось, АСТ сопрягает процессы белкового и углеводного обмена (аспартат-сукцинатное направление метаболизма), определяя устой-

чивость гидробионтов (прежде всего моллюсков) к экстремальным формам гипоксии и аноксии [13]. Показано, что моллюски, устойчивые к условиям анаэробнобиоза (*Anadara inaequalis*), содержат значительный ресурс *D*-аспартата в раковине и активно его используют в условиях внешнего дефицита кислорода [17]. Известно, что АСТ контролирует реакцию трансформации аспартата в оксалоацетат с последующим восстановлением его до малата [23]. При этом высвобождается глутамат, который может быть использован в сукцинаттиокиназной реакции, также актуальной в условиях анаэробнобиоза [20]:



Превращение оксалоацетата в малат катализируется цитоплазматической фракцией малатдегидрогеназы (МДГ). Активность АСТ и МДГ в условиях гипоксии показывает высокий уровень сопряжения [1, 8]. Малат посредством малат-сукцинатного переносчика попадает в митохондрии, где вначале превращается в фумарат, а затем восстанавливается до сукцината [12, 16]. Клетка при этом получает дополнительный ресурс макроэргов:



Рассмотренная выше последовательность событий может развиваться у моллюсков лишь в условиях экстремальной внешней гипоксии и аноксии. Высокая активность АСТ у особей со светло-коричневой окраской раковины, отмеченная в настоящей работе, связана, вероятно, с особенностями условий обитания этой цветовой группы *M. galloprovincialis*. Как уже отмечалось, моллюски такой окраски чаще встречаются в донных сообществах, где отсутствует активная циркуляция воды и обычно наблюдается внешний дефицит кислорода. Моллюски с чёрной окраской раковины, напротив, преобладают в скальных биотопах, часто приуроченных к прибойной зоне, где возникновение гипоксии в принципе невозможно. В этом, по-видимому, лежит основная причина обнаруженных различий в активности АСТ.

Следует отметить, что материал для проведения настоящей работы был получен с одних и тех же коллекторных установок мидийной фермы, то есть моллюски находились в сходных условиях. Вместе с тем различия в активности АСТ между цветовыми группами были значительными, что позволяет говорить об их генетической природе. Принимая во внимание шестиаллельную схему наследования АСТ, которая допускает существование 21 варианта генотипа [10], можно предположить, что распределение частот аллелей между цветовыми группами, особенно черной и светло-коричневой, может иметь ряд принципиальных различий. Это означает, что изучение изоферментного спектра АСТ в перспективе может дать более надёжные критерии в идентификации цветовых морф *M. galloprovincialis*.

Заклучение

Применение метода фотографирования и цифровой обработки снимков раковин позволило идентифицировать четыре цветовые группы *M. galloprovincialis*: чёрные, переходные, тёмно-коричневые и светло-коричневые. Установлено, что активность АСТ в тканях моллюска возрастает по мере осветления раковины. Допускается, что различия в активности АСТ определены генетически и связаны с толерантностью цветовых групп моллюска к условиям внешней гипоксии.

**

*Застосування методу фотографування та цифрової обробки знімків дозволило виділити чотири колірні групи *Mytilus galloprovincialis* Lam.: чорні, перехідні, темно- та світло-коричневі. Встановлено, що активність аспаратамінотрансферази в тканинах зростає з освітленням мушлі. Припущено, що відмінності в активності фермента зумовлені генетично та пов'язані з толерантністю колірних груп до умов зовнішньої гіпоксії.*

**

*Four color groups of *Mytilus galloprovincialis* Lam. were identified using computer processing of the shell pictures: black, intermediate, dark- and light-brown. Activity of aspartate aminotransferase in the tissues of the mussels grew from the darker to lighter coloured specimens. Possibly this difference in AST activities is determined genetically and connected with tolerance to hypoxia of the colour groups.*

**

1. Андреевко Т.И., Солгатов А.А., Головина И.В. Адаптивная реорганизация метаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* Bruguiere в условиях экспериментальной аноксии // Доп. НАН України. — 2009. — № 7. — С. 155—160.
2. Борогина А.А., Солгатов А.А. Сравнительная оценка содержания и состава каротиноидов в тканях различных цветовых морф *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія. — 2010. — № 44 (3). — С. 25—28.
3. Иванов В.Н., Холодов В.И., Сеничева М.И. и др. Биология культивируемых мидий. — Киев: Наук. думка, 1989. — 99 с.
4. Казанкова И.И. Частота цветовых морф в поселениях *Mytilus galloprovincialis* в прибрежных водах южного и юго-западного Крыма // Экология моря. — 2008. — Вып 75. — С. 38—41.
5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. — М.: МЕДпресс-Информ, 2004. — 501 с.
6. Куликова А.Д. Выявление цветовых морф моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. с использованием компьютерной обработки фотографий // Мор. экол. журн. — 2012. — Т. 11, № 3. — С. 63—67.
7. Кучеренко Н.Е., Виноградова Р.П., Литвиненко А.Р. и др. Биохимический справочник. — Киев: Вища шк., 1979. — 304 с.

8. Солгатов А.А., Ангренко Т.И., Сысоева И.В., Сысоев А.А. Тканевая специфика метаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* Br. в условиях экспериментальной аноксии // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. — 2009. — Т. 45, № 3. — С. 284—289.
9. Столбова Н.Г., Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Наследование цвета раковины у мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Цитология и генетика. — 1996. — Т. 30, № 6. — С. 62—65.
10. Шурова Н.М., Золотарев В.Н. Анализ фенотипической структуры поселений мидий *Mytilus galloprovincialis* Черного моря по окраске наружного призматического слоя их раковин // Мор. экол. журн. — 2008. — Т. 7, № 4. — С. 88—97.
11. Щербань С.А. Особенности соматического и генеративного роста у некоторых цветовых морф мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Экология моря. — 2000. — Вып. 53. — С. 77—81.
12. Almeida-Val V.M., Val A.L., Duncan W.P. *et al.* Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels // Comp. Biochem. Physiol. B. — 2000. — Vol. 125, N 2. — P. 219—226.
13. Hochachka P.W., Fields J., Mustafa T. Animal life without oxygen: basic biochemical mechanisms // Amer. Zool. — 1973. — Vol. 13. — P. 543—555.
14. Johnson A.G., Utter F.M. Electrophoretic variants of aspartate aminotransferase of the bay mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) // Comp. Biochem. Physiol. B. — 1973. — Vol. 44. — P. 317—323.
15. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
16. Martinez M.L., Landry C., Boehm R. *et al.* Effects of long-term hypoxia on enzymes of carbohydrate metabolism in the Gulf killifish, *Fundulus grandis* // J. Exp. Biol. — 2006. — Vol. 209, Pt. 19. — P. 3851—3861.
17. Mistri M., Rossi R., Ceccherelli V.U. Growth and production of the ark shell *Scapharca inaequalis* (Bruguère) in a lagoon of the Po River Delta // Mar. Ecol. — 1988. — Vol. 9, N 1. — P. 35—49.
18. Newkirk G.F. Genetics of shell color in *Mytilus edulis* L. and the association of growth rate with shell color // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. — 1980. — Vol. 47, N 1. — P. 89—94.
19. Novac A., Fusu L. The phenotypic structure of a *Mytilus galloprovincialis* Lam. population from the Romanian Black Sea shore // Analete Științifice ale Universității «Alexandru Ioan Cuza», Secț. Genetic și Biologie Molecular . — 2006. — Vol. 7, Fasc. 1. — P. 235—240.
20. Owen T.G., Hochachka P.W. Purification and properties of dolphin muscle aspartate and alanine transaminases and their possible roles in the energy metabolism of diving mammals // Biochem. J. — 1974. — Vol. 143. — P. 541—553.

21. *Paynter K.T., Karam G.A., Ellis L.L., Bishop S.H.* Subcellular distribution of aminotransferases, and pyruvate branch point enzymes in gill tissue from four bivalves // *Comp. Biochem. Physiol. B.* — 1985. — Vol. 82, N 1. — P. 129—132.
22. *Viarengo A., Canesi L., Martinez P.G. et al.* Pro-oxidant processes and antioxidant defence system in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*) // *Ibid.* — 1995. — Vol. 111, N 1. — P. 119—126.
23. *Waarde A.* Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production // *Ibid.* — 1988. — Vol. 91, N 2. — P. 207—228.

¹ Севастопольский Национальный
технический университет

² Институт биологии южных морей
НАН Украины, Севастополь

Поступила 13.12.13