

УДК 594.124:577.1

А. Д. Куликова<sup>1</sup>, Т. И. Андреевко<sup>2</sup>, А. А. Солдатов<sup>1</sup>

### АКТИВНОСТЬ АЛЬДОЛАЗЫ В ТКАНЯХ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* С РАЗЛИЧНОЙ ОКРАСКОЙ СТВОРОК

Изучена активность альдолазы (ФДФ-А, КФ 4.1.2.13) в тканях (жабры, гепатопанкреас, нога) двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* с различной пигментацией створок раковины. Идентифицированы четыре цветовые группы мидий: черная (значение красного компонента цвета в диапазоне 37,2—61,8 у. е.), переходная (71,6—89,6 у. е.), темно-коричневая (91,2—126,0 у. е.) и светло-коричневая (130,8—146,0 у. е.). Установлено, что в жабрах мидий переходной и темно-коричневой окраски активность альдолазы в 1,5—2,0 раза ниже, чем у черных и светло-коричневых моллюсков. Зависимость описывается параболической функцией. В ноге и гепатопанкреасе разноокрашенных мидий значения активности альдолазы близкие. Обсуждаются причины обнаруженных различий.

**Ключевые слова:** *Mytilus galloprovincialis*, цветовые морфы, активность альдолазы.

Мидия *Mytilus galloprovincialis* Lam. является массовым видом Черного моря. Поселения этого моллюска могут формироваться как на скальных, так и на донных иловых субстратах. Известно, что *M. galloprovincialis* представлена двумя цветовыми морфами: черные количественно преобладают в прибрежных поселениях, коричневые — в донных сообществах [2]. Допускается, что окраска раковины мидий — признак, детерминированный генетически. Коричневый цвет доминирует над черным [9], а промежуточный фенотип, предположительно, представлен гибридными особями [10].

Считается, что цвет раковины моллюска может являться маркером комплекса генов. Показано, что разноокрашенные мидии различаются по прочности и скорости образования биссусных нитей, а также по темпам соматического роста тканей [1]. Между двумя цветовыми морфами *M. galloprovincialis* отмечены вариации в составе изоферментных спектров неспецифических эстераз и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы [8]. Определенные различия обнаружены в активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы [7, 20], а также в составе каротиноидов [19]. Сравнительная оценка условий скального и илового биотопов позволяет предположить, что места обитания,

© А. Д. Куликова, Т. И. Андреевко, А. А. Солдатов, 2015

специфичные для цветковых морф мидии, имеют неодинаковую концентрацию кислорода в воде. Эти особенности могут выступать в роли фактора, определяющего направление естественного отбора. Отсюда следует, что принципиальные различия между разноокрашенными *M. galloprovincialis* необходимо искать на уровне молекулярных систем, ответственных за адаптацию моллюска к условиям гипоксии. Ранее нами были обнаружены различия в активности аминотрансфераз [6].

Альдолаза, или фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза (ФДФ-А, КФ 4.1.2.13) — фермент класса лиаз, участвующий в процессе гликолитического расщепления глюкозы. У двустворчатых моллюсков самый высокий уровень экспрессии соответствующего гена отмечен в мышечной ткани, что позволяет классифицировать их альдолазу как изофермент А (мышечная альдолаза). Самые низкие значения экспрессии характерны для ткани жабр и гепатопанкреаса [22]. Если допустить, что цветковые морфы *M. galloprovincialis* обладают разной толерантностью к условиям гипоксии, то различия между ними могут проявляться и в активности альдолазы как одного из ключевых ферментов гликолиза. Проверке данного положения и посвящена настоящая работа.

**Материал и методика исследований.** В качестве объекта исследований использовали половозрелых особей *M. galloprovincialis* (длина раковины 42—75 мм) с различным характером пигментации створок. Животных отбирали одновременно с коллекторных установок мидийного хозяйства ООО «Яхонт ЛТД», расположенных в бух. Кацивели, в 2012 г. Транспортировку осуществляли без воды в термоизолированном контейнере (объемом 10 л) в течение одного часа от момента сбора. После доставки мидии выдерживали в 30-литровом аквариуме с проточной морской водой (температура  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , соленость 13—14‰) в течение трех суток. Такая экспозиция считается достаточной для устранения последствий манипуляционного стресса [21].

Характер окраски раковин моллюсков оценивали при помощи метода фотографирования и компьютерной обработки снимков в графическом редакторе Adobe Photoshop CS-3. Для идентификации цветковых групп использовали значение красного компонента ( $R$ ) и значение оттенка цвета ( $H$ ) [4].

Мягкие ткани моллюсков (жабры, нога, гепатопанкреас) препарировали при температуре  $0—4^\circ\text{C}$ . Полученные образцы хранили при  $-27...-28^\circ\text{C}$  в морозильной камере (Liebherr-Comfort, Германия). Гомогенаты готовили непосредственно в день эксперимента. В качестве трансформирующей среды использовали 1,15%-ный раствор KCl. Для получения супернатанта гомогенаты центрифугировали при 6000 об/мин в течение 15 минут. В работе использовали рефрижераторную центрифугу K-23D (Германия).

Активность альдолазы определяли методом Товарницкого — Валуиской. В его основе лежит реакция продуктов расщепления фруктозо-1,6-фосфата с 2,4-динитрофенилгидразином, приводящая к образованию гидразонов (ацетоновые экстракты), имеющих окраску в щелочной среде [3]. В работе использовали специализированный набор реактивов («Химреактивкомплект», РФ). Интенсивность окраски измеряли при длине волны 540 нм. Ак-

тивность выражали в мкмоль фруктозо-1,6-дифосфата (ФДФ)·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> белка. Содержание белка в пробах контролировали по методу Лоури [18]. Все измерения выполняли на однолучевом спектрофотометре СФ-26.

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

### ***Результаты исследований и их обсуждение***

Фотографии створок раковин были обработаны в программе Adobe Photoshop CS-3 и представлены в системе координат Red-Hue. В результате удалось идентифицировать четыре цветовые группы: черную (значение *R* в диапазоне 37,2—61,8 у. е.), переходную (71,6—89,6 у. е.), темно- (91,2—126,0 у. е.) и светло-коричневую (130,8—146,0 у. е.) (рис. 1). Различия были статистически значимы ( $p < 0,001$ ). Стоит отметить, что такие же группы были выделены нами ранее, при разработке метода компьютерной обработки фотографий [4].

В ноге и гепатопанкреасе активность альдолазы не зависела от окраски створок раковин (таблица, рис. 2). Отмечен большой разброс значений. Достоверных различий выявлено не было. У моллюсков с переходной окраской створок по сравнению с черной и светло-коричневой группами наблюдалась тенденция уменьшения активности фермента.

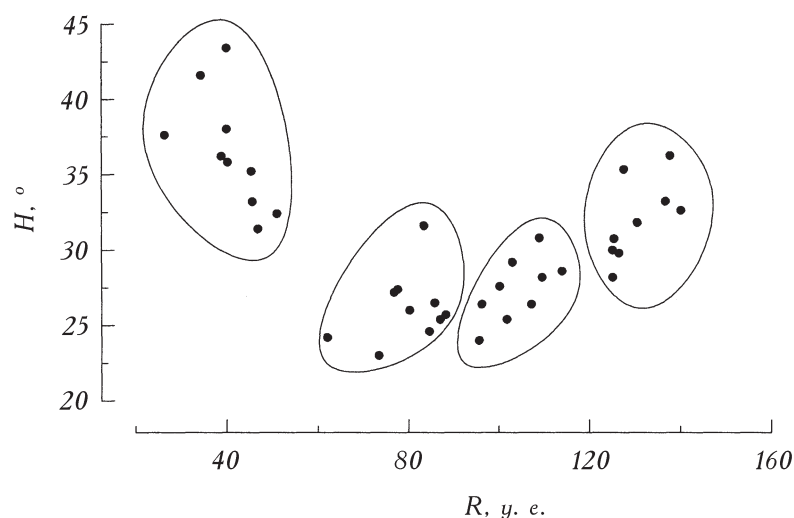
В жабрах моллюска, напротив, активность альдолазы проявляла выраженную зависимость от характера окраски раковины (рис. 3), которая хорошо описывалась параболической функцией ( $R^2 = 0,987$ ). Значения активности фермента в жабрах моллюсков переходной группы были достоверно ниже, чем у черных (в 1,65 раза,  $p < 0,005$ ) и светло-коричневых (в 2 раза,  $p < 0,005$ ).

Различия в активности ферментов, и альдолазы в частности, могут определяться следующими причинами [16]:

- различиями условий среды в момент сбора моллюсков;
- уровнем экспрессии соответствующих локусов генома;
- различиями в алло- или изоэнзимном спектре.

Следует отметить, что материал для проведения настоящей работы был получен одномоментно, с одних и тех же коллекторных установок. То есть условия среды были сходными для всех исследуемых моллюсков и эту причину можно исключить из рассмотрения.

Различия в активности альдолазы, обнаруженные для жабр моллюска, могут быть следствием наличия нескольких ее изоформ в данной ткани. Это может быть связано как с существованием ряда локусов, так и с пострасля-



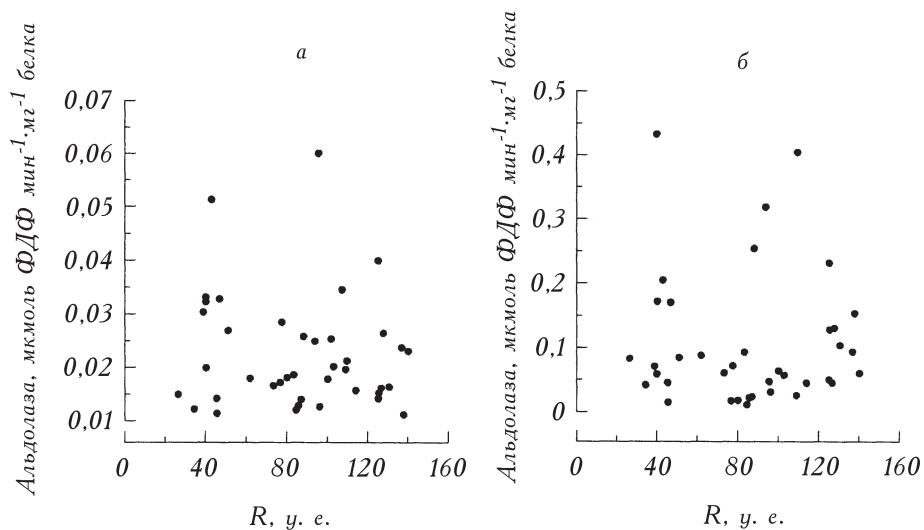
1. Распределение цветовых характеристик, полученных при обработке фотографий створок раковин *M. galloprovincialis* в графическом редакторе Adobe Photoshop CS-3: *R* — значение красного компонента; *H* — оттенок цвета.

**Активность альдолазы (мкмоль ФДФ·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> белка·10<sup>-2</sup>) у *M. galloprovincialis* с разной окраской створок в тканях ноги, жабр и гепатопанкреаса ( $\bar{x} \pm s$ )**

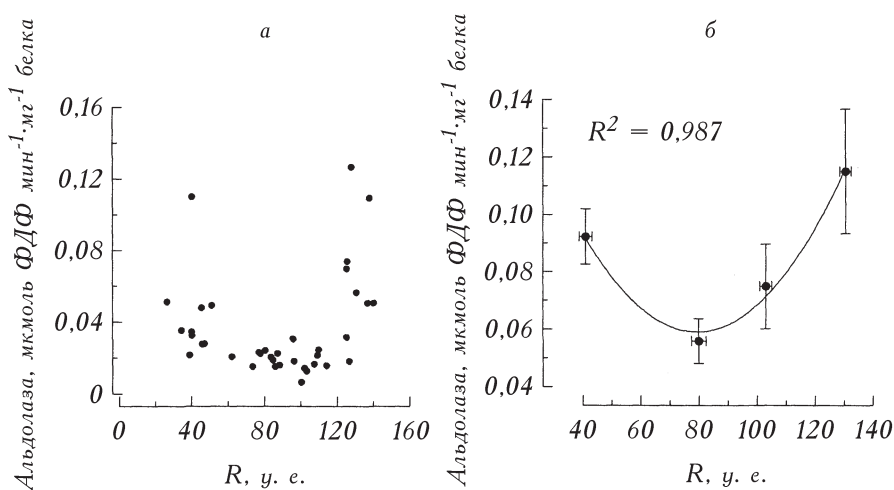
Ткани	Цветовые группы			
	черная	переходная	темно-коричневая	светло-коричневая
Нога	12,55 ± 3,59	6,61 ± 2,31	12,42 ± 4,70	11,09 ± 1,97
Жабры	9,22 ± 0,97	5,58 ± 0,78	7,48 ± 1,48	11,50 ± 2,17
Гепатопанкреас	2,54 ± 0,37	1,82 ± 0,17	2,52 ± 0,43	2,07 ± 0,29

ционной модификацией фермента. Данные об изоферментном составе альдолазы *M. galloprovincialis* неоднозначны. В работе [12], выполненной на *Mullus edulis*, альдолаза описывается как мономорфный локус. Однако в этой же статье авторы аналогичным образом характеризуют аспаратаминотрансферазу — фермент, который в других исследованиях был описан как полиморфный с шестиаллельным характером наследования [17]. Установлено [15], что альдолаза у *M. galloprovincialis* проявляет себя как высокополиморфный фермент, но характер распределения фенотипов не дает возможности адекватно оценить определяющий его генотип.

Факт обнаружения в настоящих исследованиях выраженных различий активности альдолазы только на уровне жабр моллюска позволяет предположить наличие тканевой специфики изоэнзимного спектра этого фермента, что требует проведения дополнительных исследований.



2. Зависимость активности альдолазы в гепатопанкреасе (а) и ноге (б) *M. galloprovincialis* от выраженности красного компонента (*R*) в цвете ее раковины.



3. Зависимость активности альдолазы в жабрах *M. galloprovincialis* от выраженности красного компонента (*R*) в цвете ее раковины: полигон распределения (а), статистическая обработка по четырем группам (б).

Известно, что в ходе старения организма у животных может происходить частичная инактивация альдолазы, вызванная нарушениями процесса трансляции [14, 23]. На активность фермента могут влиять также многочисленные точечные мутации, изменяющие первичную структуру активного центра фермента [22]. Ранее при помощи метода RAPD-PCR показано, что

мидии переходной окраски обладают большей генетической неоднородностью, чем мидии краевых групп [5].

### Заклучение

В жабрах у мидий переходной и темно-коричневой групп активность альдолазы была в 1,5—2,0 раза ниже, чем у моллюсков с черной и светло-коричневой окраской раковины. Зависимость активности фермента от цвета раковины моллюска хорошо описывается уравнением параболической функции. Различия могут быть детерминированы генетически, поскольку проявлялись в сходных условиях среды. В ноге и гепатопанкреасе разноокрашенных групп мидий активность альдолазы была близкой.

\*\*

*Вивчено активність альдолази (ФДФ-А, КФ 4.1.2.13) у тканинах (жабра, гепатопанкреас, нога) двостулкового моллюска *Mytilus galloprovincialis* з різною пігментацією стулків мушель. Характер забарвлення черепашок моллюсків оцінювали за допомогою методу фотографування та комп'ютерної обробки знімків у графічному редакторі Adobe Photoshop CS-3. Активність ферменту визначали за реакцією продуктів розщеплення фруктозо-1,6-фосфату з 2,4-днітрофенілгідразіном. Ідентифіковано чотири кольорні групи мідій: чорна (значення червоного компонента кольору знаходилося в діапазоні 37,2—61,8 у. о.), перехідна (71,6—89,6 у. о.), темно-коричнева (91,2—126,0 у. о.) і світло-коричнева (130,8—146,0 у. о.). Встановлено, що в жабрах мідій перехідної та темно-коричневої груп активність альдолази була в 1,5—2,0 разу нижчою, ніж у чорних і світло-коричневих моллюсків. Залежність добре описується параболическою функцією. У нозі і гепатопанкреасі різнозабарвлених мідій активність альдолази була близькою. Обговорюються причини виявлених відмінностей.*

\*\*

*Aldolase activity in tissues of *Mytilus galloprovincialis* with different shell colour has been studied. Mussels' shell colour was measured by photographing and computer processing of digital pictures using Adobe Photoshop CS-3. Four colour groups were identified: black, intermediate, dark and light brown. It has been shown that in gill of intermediate and dark brown mussels aldolase activity was lower than black and light brown. This correlation is best described by parabolic function. Aldolase activity in podium and hepatopancreas of differently coloured mussels was similar. Reasons of this differences were discussed.*

\*\*

1. Булатов К.В., Звездина Т.Ф. Различие в прикреплении к субстрату мидий разных генотипов // Цитология и генетика. — 1987. — Т. 21, № 1. — С. 71—72.
2. Иванов В.Н., Холодов В.И., Сеничева М.И. и др. Биология культивируемых мидий. — Киев: Наук. думка, 1989. — 99 с.
3. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. — М.: МЕДпресс-информ, 2004. — 501 с.

4. Куликова А.Д. Выявления цветowych морф моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. с использованием компьютерной обработки фотографий // Мор. экол. журн. — Т. 11, № 3. — 2012. — С. 63—67.
5. Куликова А.Д. Особенность генетического полиморфизма цветowych групп *Mytilus galloprovincialis* Lam. в Черном море // Тез. VIII Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus-2013», посвящ. 50-летию образования Ин-та биологии южных морей НАН Украины, Севастополь, 1—4 окт. 2013 г. — Севастополь, 2013. — С. 83—84.
6. Куликова А.Д., Ангреевко Т.И., Солгатов А.А. Цветовой полиморфизм раковины и активность аминотрансфераз тканей *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Доп. НАН України. — 2014. — № 3. — С. 147—152.
7. Солгатов А.А., Гостюхина О.Л., Головина И.В. Состояние антиоксидантного ферментативного комплекса тканей черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. в условиях естественного окислительного стресса // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. — 2008. — Т. 44, № 2. — С. 150—155.
8. Столбова Н.Г., Ладыгина Л.В. Генетический полиморфизм мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. у берегов Крыма // Цитология и генетика. — 1994. — Т. 28, № 2. — С. 62—66.
9. Столбова Н.Г., Пуркова А.В., Ладыгина Л.В. Наследование цвета раковины у мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Там же. — 1996. — Т. 30, № 6. — С. 62—65.
10. Шурова Н.М., Золоторев 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 цветowych морф мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Экология моря: Сб. науч. тр. — 2000. — Т. 53. — С. 77—81.
12. Ahmad M., Skibinski D.O.F., Beardmore J.E. An estimate of the amount of genetic variation in the common mussel *Mytilus edulis* // Biochem. Genetics. — 1977. — Vol. 15, Iss. 9—10. — P. 833—846.
13. Cui L., Liu C., Lu Y. Studies on mussels gills // Shandong Fish. Qilu. Yuye. — 1996. — Vol.13, N 5. — P. 11—14.
14. Gershon H., Gershon D. Altered enzyme molecules in senescent organisms: mouse muscle aldolase // Mechanisms of Ageing and Development. — 1973. — Vol. 2. — P. 33—41.
15. Grant W.S., Cherry M.I. *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in Southern Africa // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. — 1985. — Vol. 90. — P. 179—191.
16. Hochachka P.W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia // Science. — 1986. — Vol. 231. — P. 234—241.
17. Johnson A.G., Utter F.M. Electrophoretic variants of aspartate aminotransferase of the bay mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) // Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. — 1973. — Vol. 44. — P. 317—323.

18. 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.
19. Maoka T., Etoh T., Borodina A.V., Soldatov A.A. A series of 19'-hexanoyloxy-fuco-xanthin derivatives from the sea mussel, *Mytilus galloprovincialis*, grown in Black Sea, Ukraine // J. Agric. Food Chem. — 2011. — Vol. 59, Iss. 24. — P. 13059—13064.
20. Soldatov A.A., Gostyukhina O.L., Golovina I.V. Antioxidant enzyme complex of tissues of the bivalve *Mytilus galloprovincialis* Lam. under normal and oxidative-stress conditions: a review // Appl. Biochem. Microbiol. — 2007. — Vol. 43, N 5. — P. 556—562.
21. Viarengo A., Canesi L., Garcia Martinez P. et al. Pro-oxidant processes and antioxidant defence system in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared to the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*) // Comp. Biochem. Physiol. — 1995. — Vol. 111, Iss. 1. — P. 119—126.
22. Wang Ch., Wang H., Li Y. Identification of a fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene and association of the single nucleotide polymorphisms with growth traits in the clam *Meretrix meretrix* // Mol. Biol. Rep. — 2012. — Vol. 39. — P. 5017—5024.
23. Zeelon P., Gershon H., Gershon D. Inactive enzyme molecules in aging organisms. Nematode fructose-1,6-diphosphate aldolase // Biochemistry. — 1973. — Vol. 12, Iss. 9. — P. 1743—1750.

<sup>1</sup> Институт биологии южных морей, Севастополь

<sup>2</sup> Севастопольский национальный  
технический университет

Поступила 09.10.14