

УДК 594:591.4:547.466(321/324)

## СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА В ГОНАДАХ КОРБИКУЛЫ ЯПОНСКОЙ

*В.В. Евдокимов, И.В. Матросова*

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (690600, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4)

**Ключевые слова:** *Corbicula japonica*, гаметогенез, морфология гонад, корбикулин.

### SEASONAL CHANGES IN AMINO ACID COMPOSITION IN THE *CORBICULA JAPONICA* GONADS

*V.V. Evdokimov, I.V. Matrosova*

*Pacific Research Fishery Center (4 Shevchenko Ln., Vladivostok 690600 Russian Federation)*

**Background.** Knowledge of the reproductive process features of *Corbicula japonica* is necessary not only to understand the formation of the species' reproductive strategy in the evolution, but also to arrange the fishing efficiently for the purpose to produce biologically active substances.

**Methods.** There was a research of the shellfish clamed in March-November, 2008 in the estuary of Razdolnaya river from the depth of 0.8–1m. The external features and histological changes in the gonads have been reviewed supplemented with morphometry.

**Results.** In the *Corbicula japonica*'s sexual cycle the following maturity stages for a gonad have been identified according to the season's specificity: 1) sexual inertia, 2) the beginning of the oocytes' growth, 3) active gametogenesis, 4) prespawning, 5) spawning, 6) postspawning. The content of individual amino acids in the male gonads was higher than in the female gonads. A tendency to increase the number of amino acids in the gonads was observed in the stages of active gametogenesis and spawning, while a tendency to decrease – in the postspawning stage.

**Conclusions.** At all sexual cycle stages of the *Corbicula japonica*, like other bivalves, the dominant amino acids are glutamic and aspartic. The results of the chemical composition study showed that the essential nutrients content in the clam's soft tissues is changeable and depends on the season.

**Keywords:** *Corbicula japonica*, gametogenesis, gonad morphology, corbiculin.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 1, p. 48–51.

Исследования последних лет показали, что большинство аминокислот, содержащихся в моллюсках, являются неизменными участниками белкового обмена в организме человека. Они оказывают определенное стимулирующее действие на его функции и необходимы для жизнедеятельности в качестве питательных добавок на определенных стадиях развития [2]. В литературе отмечается, что аминокислоты необычного строения, к которым относятся саркозин, фосфосерин, гидроксизин, цитруллин, орнитин и некоторые другие, преобладают у малоисследованных по химическому составу моллюсков (модиолус, каллиста, мерценария и др.), в т.ч. у корбикулы японской, являющейся объектом промысла [1]. Знание особенностей репродуктивного процесса *Corbicula japonica* необходимо не только для понимания становления репродуктивной стратегии вида в эволюции, но и для рационально обоснованной организации промысла с целью получения биологически активных веществ [5]. Из корбикулы вырабатывают биологически активную пищевую добавку – экстракт «Корбикулин». Экстракт обладает гепатопротекторным действием, предупреждает развитие типичных для

острого и хронического гепатита патологических изменений в клеточной структуре печени, используется для профилактики и лечения острых и хронических, в том числе алкогольных, гепатитов, а также других заболеваний печени и желудочно-кишечного тракта [10].

Цель настоящей работы заключалась в анализе репродуктивного процесса у *C. japonica* в естественных условиях. Изучали морфологию и аминокислотный состав гонад самок и самцов моллюска в различные сезоны года, определяли стадии их зрелости, исследовали динамику клеточного состава половых желез.

**Материал и методы.** Материалом для исследования послужили ежемесячные сборы корбикулы в устье реки Раздольной Амурского залива (Японское море) с глубины 0,8–1 м, с марта по ноябрь 2008 г. Для изучения гаметогенеза использовались половозрелые особи с длиной раковины 35–40 мм. Половозрелость животных оценивали по весу и внешним признакам, визуальные наблюдения дополняли гистологическими исследованиями. Для этого кусочки гонады до 0,5 см в поперечнике фиксировали в жидкости Буэна. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм для морфологических исследований окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином [3]. На гистологических препаратах измеряли диаметр ацинусов, ооцитов, их ядер и ядрышек, а затем вычисляли их объемы по формуле эллипсоида:

$$V = \pi/6 \times A \times B^2,$$

где  $A$  – большой диаметр,  $B$  – малый диаметр [6].

Для определения степени зрелости семенников ежемесячно на гистологических препаратах при 70-кратном увеличении учитывали количество ацинусов в поле зрения микроскопа; к зоне роста относили часть ацинуса, занятую сперматогониями и сперматоцитами I и II порядка, к зоне формирования – часть, на которой располагались сперматиды и спермии. Аминокислотный состав белков в гонадах определяли на аминокислотном анализаторе Hitachi L 8800 [9].

Математическую обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики [8].

**Результаты исследования.** Репродуктивная система корбикулы японской устроена просто. Она состоит из гонад и гонодуктов. Зачаток гонады расположен в районе брюшной стенки перикардия. В ходе формирования половой железы образуются трубочки с многочисленными терминальными и латеральными фолликулами (половыми пузырьками), проникающими в соединительную ткань висцеральной массы с правой и левой сторон. Концевые расширенные участки этих трубочек носят название ацинусов. Трубочки каждой гонады в результате серий слияний образуют пару

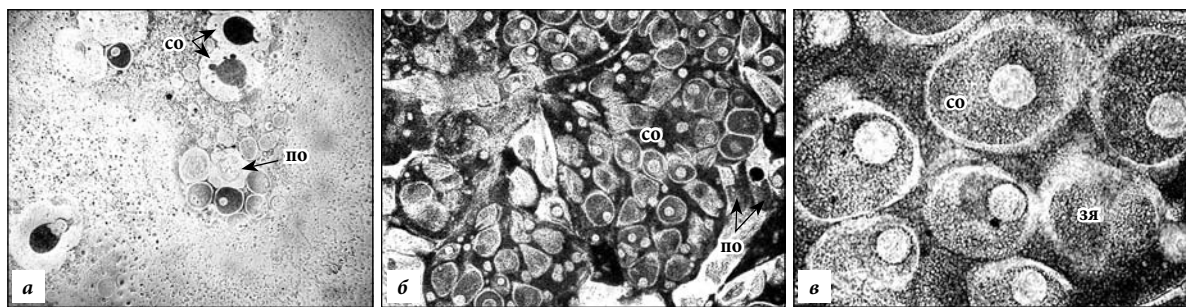


Рис. Яичник корбикулы японской – *Corbicula japonica*:

а – посленерестовая стадия, б – стадия активного гаметогенеза, в – нерестовая стадия; по – пристеночный ооцит, со – свободно-лежащий ооцит, зя – зрелая яйцеклетка. Окр. гематоксилином и эозином, ×400.

гонодуктов, которые идут каудально и дорзально по направлению к области половых отверстий. Отверстия в виде продольных щелей расположены в крошечных папиллах, локализованных на каждой стороне дорзальной вершины висцеральной массы, как раз впереди от мышцы ретрактора ноги. Строение гонодуктов зависит от нерестовой активности моллюсков. Осенью, в период пролиферации оогониев и сперматогониев, и весной, в период активного гаметогенеза, стенки гонодуктов утолщены и спавшиеся. В период нереста гонодукт сильно растянут, и складок на его стенке нет. В ходе нереста гаметы выходят из гонады, проходят по гонодуктам и направленным током жидкости выводятся из мантийной полости в воду, и во внешней среде происходит оплодотворение и все последующее развитие.

При осмотре вскрытых половозрелых особей корбикулы японской хорошо заметна гонада, она прорастает почти всю соединительную ткань мантии. На основании осмотра половых желез и анализа гистологических изменений в них у самок и самцов в течение года выявлено 5 характерных стадий полового цикла, согласно имеющейся в литературе классификации для этих животных [6]. На преднерестовой и нерестовой стадиях репродуктивного цикла пол корбикулы японской можно определить визуально. Цвет мужской гонады — белый, женской – темно-фиолетовый.

В преднерестовом состоянии корбикула встречалась с конца июня до середины июля. Половые железы самок и самцов занимали в это время всю мантийную полость. У самок в ацинусах преобладали зрелые ооциты, размер которых не превышал 60–80 мкм [12]. Они плотно прилегали друг к другу и имели полигональную форму. Вдоль стенки ацинусов часто встречались растущие пристеночные ооциты, среди которых располагались мелкие ооциты. В гонадах самок во время нереста количество ооцитов резко уменьшалось за счет частичного их вымета, ацинусы спадались. Яйцеклетки, готовые к вымету, свободно располагались в ацинусе (рис., в), объем их увеличивался. В ацинусах самцов в конце июня зона формирования состояла только из сперматид на разных стадиях спермиогенеза. В июле эта зона была представлена как сперматидами, так и спермиями. Ацинусы самцов спадались, в них появлялись просветы, соединительная ткань между ацинусами была развита слабо. Нерест корбикулы наблюдался с конца июля и продолжался до конца августа. Посленерестовая стадия

продолжалась весь сентябрь и до середины октября. Гонады у самок и самцов в это время небольшие, дряблые, лишены тургора и окраски (рис., а).

Стадия половой инертности у исследованных животных характеризовалась почти полным отсутствием зрелых половых клеток, как у мужских так и у женских особей. Ацинусы самок содержали небольшое число оогониев. В гонадах самцов в просветах ацинусов появлялось небольшое количество сперматогониев.

«Начало роста ооцитов» у корбикулы японской – самая продолжительная стадия полового цикла. Она отмечалась с середины октября до середины мая. На ее протяжении можно отметить довольно резкое увеличение гонады за счет роста ацинусов. Половые железы самок были окрашены в светло-фиолетовый цвет. Гонады мужских и женских особей приобретали хороший тургор по сравнению с посленерестовой стадией. В начале этой стадии у самок объем ацинусов был небольшим – 0,0058 мм<sup>3</sup>. Ооциты располагались вдоль

Таблица 1  
Содержание свободных аминокислот в гонадах корбикулы японской

Аминокислота	Содержание аминокислот (навеска 10 г), %			
	Посленерестовая стадия, яичник	Активный гаметогенез, яичник	Нерестовая стадия, яичник	Нерестовая стадия, семенник
Аспарагиновая	4,9	5,4	5,5	5,9
Треонин	2,5	3,0	3,1	2,9
Серин	1,9	2,0	2,2	2,1
Глутаминовая	8,0	8,4	8,0	9,4
Глицин	3,0	2,9	2,7	3,0
Аланин	4,4	5,0	4,6	5,0
Цистеин	0,8	0,2	0,4	0,4
Валин	2,5	2,8	2,8	2,8
Метионин	0,8	0,4	0,6	0,9
Изолейцин	2,1	2,3	2,4	2,4
Лейцин	3,7	3,8	3,7	4,1
Тирозин	1,5	1,4	1,5	1,6
Фенилаланин	2,2	2,4	2,5	2,4
Лизин	3,7	4,0	3,9	4,2
Гистидин	2,2	2,0	1,7	1,8
Аргинин	3,3	3,4	3,3	3,8

Таблица 2

Состав свободных аминокислот, их биологическое действие и рекомендуемая суточная доза для биологически активных пищевых добавок по В. Гриффиту [4]

Аминокислота	Суточная доза пищевой добавки, мг				Биологическое действие
	Моллоскам (ТИПРО-Центр)	Аминоват (Австрия)	Дискавери (Россия)	Максавит (Австралия)	
Таурин	28–38	–	–	–	Нейромедиатор, тормозящий синаптическую передачу, кардиотропное, противосудорожное действие, защита сетчатки и др.
Аспарагиновая	14–47	6	8	0,11	Строительный материал белков
Треонин	14–21	11	4	0,07	Улучшение пищеварения
Серин	11–15	7	3	0,09	Стимулятор метаболизма в мышечной и жировой тканях
Глутаминовая	40–86	9	2	0,29	Нейромедиатор, стимулирующий передачу возбуждения
Пролин	–	29	4	0,17	Составная часть коллагена
Глицин	21–115	17	3	0,03	Нейромедиатор тормозного типа, седативное действие, при нарушениях мозгового кровообращения
Аланин	14–21	3	4	0,05	Строительный материал белков
Валин	17–22	5	2	0,11	Стимулятор умственных способностей
Метионин	8–14	11	4	0,04	Стимулятор метаболизма в мышечной ткани
Изолейцин	15–20	4	2	0,09	Стимулятор метаболизма в мышечной ткани
Лейцин	21–36	9	4	0,15	Стимулятор метаболизма в мышечной ткани
Тирозин	5–6	15	8	0,09	Антидепрессант, улучшает память, облегчает боль, стимулирует метаболизм жировой ткани
Фенилаланин	11–13	9	2	0,08	Стимулятор метаболизма в мышечной и жировой ткани, участие в синтезе тироксина
Гистидин	8–9	8	1	0,04	Возможно противовоспалительное действие
Лизин	23–34	8	6	0,07	Стимулятор роста, выработка антител, гормонов, противогерпетическая активность
Аргинин	20–25	4	2	0,06	Иммуностимулятор, гепато- и кардиопротектор, противовирусная активность

их стенок, соединяясь с ними широким основанием. В гонадах самцов, с таким же объемом ацинусов, как и у самок, появлялось небольшое количество сперматогониев и сперматоцитов, а в середине мая количество тех и других значительно увеличивалось.

Стадия активного гаметогенеза у корбикулы японской отмечалась с конца мая по июнь включительно. Половые железы у самок в это время становились плотными, окрашенными в темно-фиолетовый цвет. В ацинусах яичников регистрировались генерации половых клеток от гониев до закончивших рост ооцитов (рис., б). В гонаде самцов вдоль стенки ацинусов в несколько слоев располагаются сперматогонии. Появляется много сперматоцитов I порядка на разных стадиях мейоза. Сперматоциты II порядка лежали большими группами сразу после гониев и сперматоцитов I порядка или вклинивались между их большими группами. Летом в мужской гонаде основной ее клеточный состав представлен сперматидами и спермиями. Состояние женской и мужской гонад приближалось к преднерестовому периоду.

Известно, что наиболее ярким признаком роста яйцеклетки является увеличение ее объема. Сравнительно небольшие клетки, вступившие в гаметогенетический цикл, достигали значительных размеров, увеличиваясь в десятки раз. Рост ооцитов, как правило,

обусловлен увеличением количества цитоплазмы и накоплением в ней трофических материалов. Средний объем ооцитов у корбикулы на разных стадиях полового цикла варьировал от 4145 до 134795 мкм<sup>3</sup>.

Самые мелкие ооциты в гонадах корбикулы наблюдались в сентябре, они характерны для стадии половой инертности. Их средние объемы увеличивались на стадии «начало роста ооцитов». Интенсивный рост ооцитов начинался на стадии активного гаметогенеза. При этом объемы клеток значительно возрастали по сравнению с предыдущей стадией.

На нерестовой стадии отмечалось увеличение объема клетки, который достигал максимального значения – 134795 мкм<sup>3</sup>, шло быстрое накопление желтка.

Таким образом, в половом цикле корбикулы японской нами выделены следующие стадии зрелости гонады, характерные для определенных сезонов года: 1) половой инертности, 2) начало роста ооцитов, 3) активный гаметогенез, 4) преднерестовая, 5) нерестовая, 6) посленерестовая.

Содержание аминокислот в семенниках на различных стадиях развития практически одинаковое, поэтому в работе представлена одна нерестовая стадия (табл. 1). Количество отдельных аминокислот, в частности аргинина, в гонадах у самцов было выше, чем

в гонадах самок. Это связано, вероятно, с повышенной потребностью в аргинине, который обеспечивает сперматозоиды энергией, необходимой для передвижения. У самок наряду с постепенным снижением количества ряда аминокислот в течение репродуктивного цикла (табл. 1) содержание глутаминовой кислоты по мере созревания гонад не изменялось.

**Обсуждение полученных данных.** У корбикулы японской стадия пролиферации очень продолжительная. *S. japonica* – теплолюбивый вид, обитающий на небольшой глубине, ее нерест начинается при прогревании воды до 24 °С [11]. Этим, вероятно, можно объяснить, что стадии активного гаметогенеза (преднерестовая и нерестовая) идут почти параллельно и в сжатые сроки. С началом нереста в июле гаметогенез не прекращается, а процессы овогенеза наблюдаются до конца августа.

Переход от гаметогенеза к нересту означает качественное преобразование механизмов регуляции и новое физиологическое состояние организма моллюска. Это отражается на спектре аминокислот в гонадах. Биохимический анализ половых желез показал, что тенденция к увеличению количества аминокислот в 100 г белка отмечается в гонадах на стадиях активного гаметогенеза и нерестовой (рис., б, в, табл. 1), а тенденция к уменьшению – на посленерестовой стадии (рис., а, табл. 1).

Нами установлено, что в начале июля 10% животных уже отнерестились. К середине августа отнерестились более 50% особей. Полностью нерест заканчивался к 10 сентября. В половом цикле корбикулы японской рост овоцитов, начавшийся в июне, продолжался до конца августа. Стадия активного гаметогенеза протекала в июне. Массовый нерест животных (более 50% особей) регистрировался с середины июля до середины августа.

Знание протекания репродуктивного процесса у корбикулы японской позволяет сделать вывод о том, что в различные периоды полового цикла в гонаде у этого животного образуются вещества в гаметах, ответственные за формирование желтка, а также пластические и энергетические функции клетки.

#### Заключение

Содержание биологически активных веществ, в данном случае аминокислот, у *S. japonica* выше в яичниках на стадиях активного гаметогенеза и нерестовой и ниже на посленерестовой стадии. Доминирующими аминокислотами на всех этапах полового цикла моллюска являются глутаминовая и аспарагиновая. Это согласуется с литературными данными для тканей двустворчатых моллюсков [5, 7]. Результаты исследований химического состава корбикулы показали, что содержание основных питательных веществ в мягких тканях этого моллюска непостоянно, и зависит от сезона года.

По мнению В. Гриффита [4], многие аминокислоты являются нейромедиаторами и стимуляторами метаболизма в различных тканях (табл. 2). Поэтому препараты, обогащенные свободными аминокислотами,

представляют собой ценные биологически активные добавки. В настоящее время разработана технология получения биологически активной добавки «Моллюскам», для изготовления которой использовали наряду с другими моллюсками и *Corbicula japonica* [5]. Этот продукт обладает широким спектром биологического действия с антиоксидантной направленностью и содержит комплекс аминокислот, он может употребляться в качестве самостоятельного средства и в составе пищевых продуктов.

#### References:

1. Ayushin N.B. Taurine: pharmaceutical properties and prospects of obtaining from marine organisms // Bulletin PRIFO.2001. Vol. 129. P. 129–145.
2. Besednova N.N., Epstein L.M. Immunoactive peptides from hydrocoles. Vladivostok: PRIFO-Centre. 2004. 248 p.
3. Volkova O.V., Eletskiy Yu.K. Fundamentals of histology with histological appliances. M.: Medicine. 1989. 342 p.
4. Griffith B. Vitamins, herbs, minerals and food supplements: Directory / translation from English. K. Tkachenko. M.: MSU, 1998. 300 p.
5. Davidovich V.V., Pivnenko T.N. Amino acids of bivalves: biological role and their use as supplements // Bulletin PRIFO. 2001. Vol. 129. P. 146–153.
6. Kalinina G.G., Matrosova I.V., Evdokimova A.V., Evdokimov V.V. Seasonal characteristics of gametogenesis of *Corbicula japonica* // Cytology. 2006. Vol. 48, No. 2. P. 149–152.
7. Kudryashov Yu.B., Goncharenko E.N. Modern problems of radioprotective chemical protection of organisms // Radiation biol. radioecol. 1999. Vol. 39, No. 2. P. 197–211.
8. Lakin G.F. Biometrics. M.: Higher School, 1980. 184 p.
9. Osterman L.A. Chromatography of proteins and nucleic acids. M.: Nauka. 1985. 315 p.
10. Sklyar L.F., Markelova E.V., Kropotov A.V.[et al.]. Corbiculin – preventive food product with hepatoprotective and antioxidant effect // Patent of RF No. 2219805, МРКА 23 L 1/30. 2005.
11. Yavnov S.V., Rakov V.A., *Corbicula*. Vladivostok: PRIFO-Centre, 2002. 145 p.
12. Evdokimov V.V., Matrosova I.V. Seasonal characteristics of gametogenesis of some marketable hydrobionts // J. Cell and Tissue Biology. 2009. Vol. 3, No. 6. P. 593–602.

Received 2012.11.21.

#### Сезонные изменения аминокислотного состава в гонадах корбикулы японской

В.В. Евдокимов, И.В. Матророва

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (690600, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4)

**Резюме.** Изучен репродуктивный цикл, морфологические особенности и аминокислотный состав гонад у корбикулы японской – *Corbicula japonica*. В половом цикле моллюска выделены следующие стадии зрелости гонады: 1) половой инертности, 2) начало роста овоцитов, 3) активный гаметогенез, 4) преднерестовая, 5) нерестовая, 6) посленерестовая. Тенденция к увеличению количества аминокислот в половых железах отмечалась на стадиях активного гаметогенеза и нерестовой, а тенденция к уменьшению – на посленерестовой стадии. Доминирующими аминокислотами на всех этапах полового цикла являлись глутаминовая и аспарагиновая. Результаты исследований химического состава показали, что содержание основных питательных веществ в мягких тканях этого моллюска непостоянно, и зависит от сезона года. Данные по гистологической организации и клеточному составу половых желез исследованных моллюсков дополняют сведения об их репродуктивной биологии и аминокислотном составе гонад.

**Ключевые слова:** *Corbicula japonica*, гаметогенез, морфология гонад, корбикулин.