

ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ЧЕРНОМОРСКИХ МОЛЛЮСКОВ *Mytilus galloprovincialis* LAM. И *Anadara inaequalis* BR.

О. Л. ГОСТЮХИНА, И. В. ГОЛОВИНА

*Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь;
e-mail: gostolga@yandex.ru*

*Исследовали антиоксидантный (АО) комплекс и пероксидное окисление липидов (ПОЛ) в тканях двух видов черноморских двустворчатых моллюсков: мидии *Mytilus galloprovincialis* и анадары *Anadara inaequalis*. В ноге, гепатопанкреасе и жабрах половозрелых моллюсков определяли активность супероксиддисмутазы (СОД, 1.15.1.1), каталазы (1.11.1.6), глутатионпероксидазы (ГП, 1.11.1.9), глутатионредуктазы (ГР, 1.6.4.2), содержание восстановленного глутатиона (GSH) и продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Показана тканевая и видовая специфичность АО комплекса и ПОЛ моллюсков. В гепатопанкреасе мидии установлены наиболее высокие величины всех изученных показателей, кроме активности ГП. У анадары наряду с гепатопанкреасом в антиоксидантной защите значительное участие принимают жабры и нога: в жабрах обнаружена наибольшая активность ГР, каталазы и СОД; в ноге установлена максимальная активность ГП и самое высокое содержание глутатиона. Для анадары характерен более высокий антиоксидантный потенциал и меньший уровень ПОЛ – во всех исследованных тканях гемоглобинсодержащего моллюска содержание ТБК-активных продуктов по сравнению с мидией вдвое меньше.*

Ключевые слова: антиоксидантный комплекс, пероксидное окисление липидов, двустворчатые моллюски, мидия, анадара.

Показатели антиоксидантного (АО) комплекса и пероксидного окисления липидов (ПОЛ) являются универсальными маркерами стресса для оценки физиологического состояния гидробионтов при воздействии антропогенных и природных факторов [1–3]. Ранее нами было исследовано изменение характеристик АО комплекса и ПОЛ при гипоксии, аноксии, воздействии ксенобиотика, а также во время нереста моллюсков и рыб [4–6]. Анадара, в отличие от других черноморских моллюсков, имеет эритроцитарный гемоглобин и в условиях гипоксии успешно конкурирует с доминирующими видами. Цель настоящей работы – сравнительный анализ особенностей организации системы антиоксидантной защиты тканей двух видов двустворчатых моллюсков: типичной для черноморской фауны мидии *M. galloprovincialis* и вселенца анадары *A. inaequalis*.

Материалы и методы

Объектом исследования служили половозрелые особи мидии и анадары, собранные в весенний период (март). После транспортировки для снятия стресса моллюсков содержали в аквариумах с проточной морской водой в

течение трех суток. Гидрохимические характеристики морской воды были такие же, как в море (соленость – 18‰, концентрация растворенного кислорода – 7,4 мл/л, температура – 7–8 °С, рН – 8,2).

Препарирование тканей (ноги, жабр и гепатопанкреаса), гомогенизацию и центрифугирование (3200 g, 15 мин) проводили при 0–4 °С. Активность энзимов определяли в супернатанте, а содержание ТБК-активных продуктов – в гомогенате, как описано ранее [5]. Для определения уровня восстановленного глутатиона (GSH) гомогенат готовили отдельно. Активность энзимов измеряли при 25 °С. Активность супероксиддисмутазы (СОД, 1.15.1.1) определяли по степени восстановления нитросинего тетразолия в присутствии NADH и феназинметасульфата при рН 7,8, глутатионпероксидазы (ГП, 1.11.1.9) – по накоплению окисленного глутатиона (GSSG) при рН 7,4, глутатионредуктазы (ГР, 1.6.4.2) – по убыли NADPH при рН 8,0, каталазы (1.11.1.6) – по реакции с молибдатом аммония при рН 8,0. Содержание GSH определяли по образованию комплекса с аллоксановым реактивом [6]. Активность ГП выражали в мкмольх GSSG за 1 минуту на 1 мг протеина, ГР – в мкмольх

NADPH за 1 мин на 1 мг протеина, каталазы – в мкмольх H_2O_2 за 1 мин на 1 мг протеина, а содержание глутатиона – в нмольх на 1 г сырой ткани. Об уровне ПОЛ судили по накоплению ТБК-активных продуктов, количество которых рассчитывали, используя молярный коэффициент поглощения $\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, и выражали в мкмольх на 1 г сырой ткани [6]. Содержание протеина оценивали методом Лоури. Спектрофотометрические измерения проводили на СФ-26 в кварцевых кюветах (1 см).

Статистическую обработку проводили, используя t-критерия Стьюдента. Сравнивали средние величины, рассчитанные для выборочных совокупностей из 10–11 особей. Различия считали статистически достоверными при $P \leq 0,05$.

В работе использовали 2-тиобарбитуровую кислоту и аллоксан (Merck, Германия), NADH, NADPH, GSH и GSSG (Reanal, Венгрия), остальные реактивы были отечественного производства марки чда или хч.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что содержание ТБК-активных продуктов в тканях обоих видов моллюсков снижалось в ряду гепатопанкреас > жабры \geq нога (рис. 1). Уровень ПОЛ в гепатопанкреасе по сравнению с жабрами был выше в 1,7–2,0 раза ($P \leq 0,05$). Во всех исследованных тканях содержание ТБК-активных продуктов у ми-

дии было в 2,0–2,3 раза больше, чем у анадары ($P \leq 0,05$). Более низкое содержание продуктов ПОЛ в тканях анадары, вероятно, способствует выживанию моллюска в условиях гипоксии и аноксии. Анадара отличается высокой толерантностью к низкой концентрации кислорода в среде [3, 7].

Среди исследованных тканей в ноге мидии на фоне высокого уровня GSH (рис. 2) установлена наименьшая активность ГП (рис. 3). Высокое содержание глутатиона и низкий уровень ТБК-активных продуктов в ноге мидии по сравнению с жабрами и гепатопанкреасом показано в работах других исследователей [8, 9]. По сравнению с анадарой в ноге мидии в 3,9 раза ниже уровень глутатиона ($P \leq 0,001$) и вдвое ниже активность ГП ($P \leq 0,05$), а активность СОД – вдвое выше ($P \leq 0,05$). В целом, в этой ткани у мидии все параметры глутатионпероксидного комплекса ((ГПС) – ГП, ГР, GSH) были в той или иной степени ниже, чем у анадары, а активность СОД и каталазы – выше (рис. 4, 5, 6).

Соотношение активности ГП, ГР и уровня глутатиона в ноге анадары свидетельствует о потенциально высокой скорости оборота GSH и его активном участии в работе ГПС, направленной на удаление пероксида водорода и различных гидроперекисей [10]. При этом скорость возобновления ресурса GSH, вероятно также высока, судя по высокому уровню этого тиола.

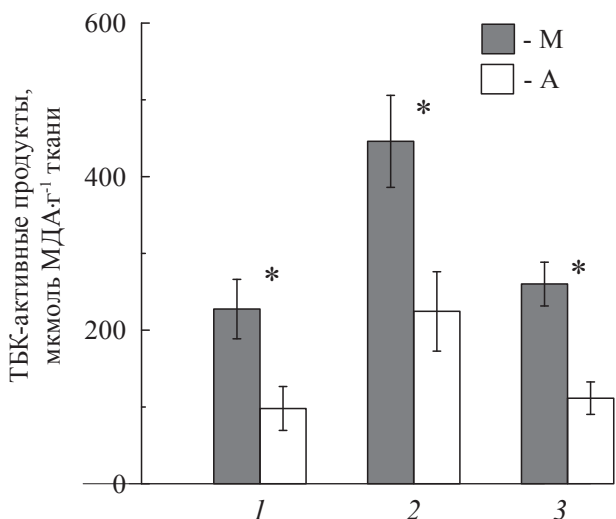


Рис. 1. Концентрация ТБК-активных продуктов в тканях мидии и анадары (мкмоль/г ткани, $n = 10-11$, * $P \leq 0,05$, различия достоверны между видами); 1 – нога, 2 – гепатопанкреас, 3 – жабры; М – мидия, А – анадара

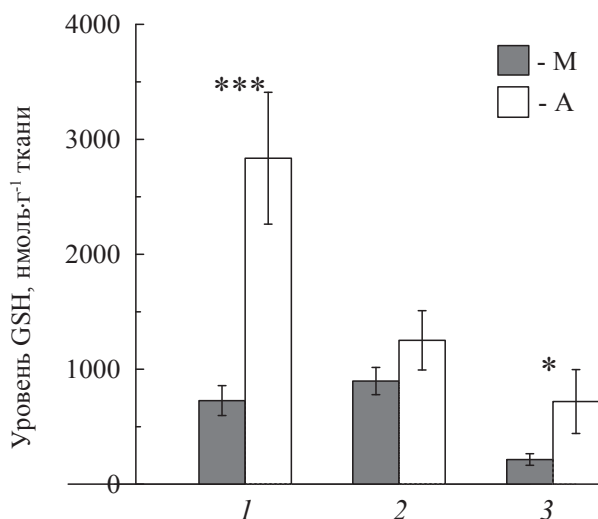


Рис. 2. Концентрация глутатиона в тканях мидии и анадары (нмоль/г ткани, $n = 10-11$, * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$, различия достоверны между видами); 1 – нога, 2 – гепатопанкреас, 3 – жабры; М – мидия, А – анадара

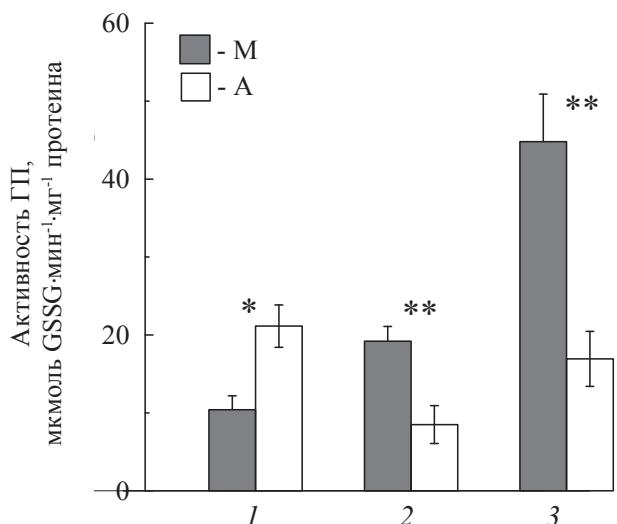


Рис. 3. Активность глутатионпероксидазы в тканях мидии и анадары (мкмоль GSSG/мин·мг протеина, $n = 10-11$, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, различия достоверны между видами); 1 – нога, 2 – гепатопанкреас, 3 – жабры; М – мидия, А – анадара

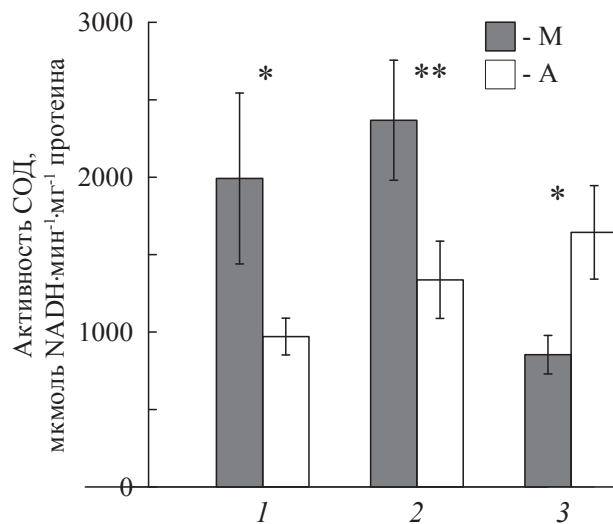


Рис. 5. Активность супероксиддисмутазы в тканях мидии и анадары (мкмоль NADH/мин·мг протеина, $n = 10-11$, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, различия достоверны между видами); 1 – нога, 2 – гепатопанкреас, 3 – жабры; М – мидия, А – анадара

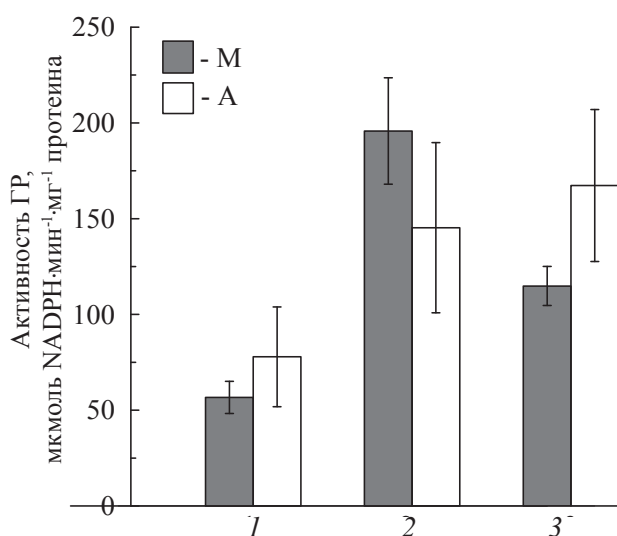


Рис. 4. Активность глутатионредуктазы в тканях мидии и анадары (мкмоль NADPH/мин·мг протеина, $n = 10-11$); 1 – нога, 2 – гепатопанкреас, 3 – жабры; М – мидия, А – анадара

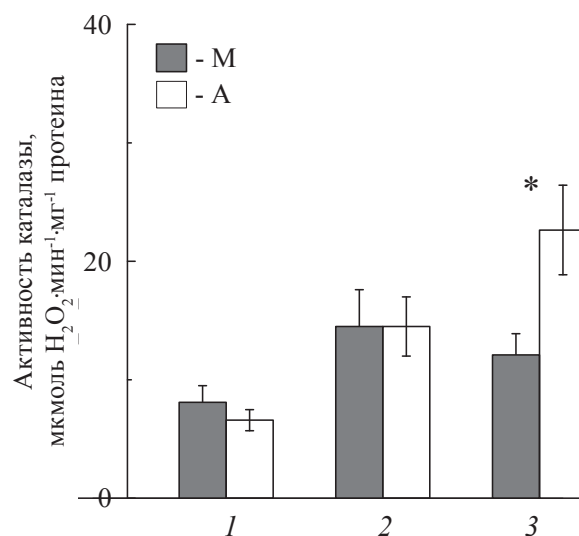


Рис. 6. Активность каталазы в тканях мидии и анадары (мкмоль H_2O_2 /мин·мг протеина, $n = 10-11$, * $P \leq 0,05$, различия достоверны между видами); 1 – нога, 2 – гепатопанкреас, 3 – жабры; М – мидия, А – анадара

В отличие от мидии, ведущей прикрепленный образ жизни, анадара способна активно передвигаться и зарываться в грунт. Интенсивность аэробного и анаэробного метаболизма в ноге анадары выше, чем у мидии [11]. В ярко окрашенной, массивной ноге анадары содержание каротиноидов почти в 6 раз

больше, чем у мидии [12, 13]. Каротиноиды и гемоглобин способны депонировать кислород, [14, 15], что может влиять на интенсивность свободнорадикального окисления.

Высокая интенсивность окислительных процессов и образование активных форм кислорода в ноге анадары могут служить причи-

ной повышенной активности ГП и большого содержания GSH, которые инактивируют образующиеся продукты ПОЛ: уровень ТБК-активных продуктов в ноге анадары вдвое меньше, чем у мидии. Вероятно, глутатионовая система у анадары играет ключевую роль в антиоксидантной защите тканей ноги в случае окислительного повреждения.

Различия в активности СОД в ноге этих моллюсков могут быть обусловлены их эколого-физиологическими особенностями. В основании ноги мидии расположена железа, вырабатывающая биссусную нить для прикрепления моллюска к субстрату, основным компонентом нити является коллаген [16, 17]. В процессе жизни мидии биссусные нити подвергаются постоянному повреждению и обновлению. Супероксидный анион-радикал (СОАР), инактивируемый СОД, принимает участие в разрушении коллагеновых волокон [18]. СОАР, возможно, регулирует количество коллагена в составе биссуса, что определяет его высокую концентрацию, и, следовательно, активность СОД в ноге мидии.

Таким образом, в функционировании АО комплекса ноги анадары преобладает высокая активность ГП и ресурс GSH, инактивирующие низкие концентрации активных форм кислорода. У мидии доминирует активность СОД, что защищает клетку от повышенных количеств СОАР.

В гепатопанкреасе мидии по сравнению с анадарой активность ГП и СОД выше в 2,3 и 1,8 раза соответственно ($P \leq 0,01-0,05$). Выявленные между моллюсками различия в активности ГП и СОД пропорциональны интенсивности ПОЛ в этом органе. Высокая активность СОД предполагает активную генерацию СОАР и согласуется с более высоким уровнем ПОЛ у мидии. Среди тканей мидии в гепатопанкреасе обнаружена наиболее высокая активность каталазы и СОД — ключевых антиоксидантных ферментов, утилизирующих высокие концентрации H_2O_2 и СОАР в условиях интенсивного ПОЛ. В работе [9] показано, что активность каталазы у мидии понижается в ряду: гепатопанкреас > жабры > мантия > нога, что аналогично нашим результатам. Установленные факты отражают более высокий уровень окислительного стресса в гепатопанкреасе мидии по сравнению как с другими тканями, так и гепатопанкреасом анадары.

Подтверждением эффективности АО защиты анадары являются результаты воздействия на моллюска продолжительной аноксии (168 ч) с последующей реоксигенацией

[2]. Аноксия приводит к частичному падению уровня интегральной антиоксидантной активности и содержания GSH, а также накоплению продуктов ПОЛ (МДА). В процессе реоксигенации в гепатопанкреасе происходит полное восстановление антиоксидантной активности до исходного уровня. Высокая буферная емкость АО системы гепатопанкреаса анадары способствует выживанию моллюска при аноксии.

В жабрах мидии по сравнению с анадарой достоверно ниже активность каталазы, СОД и содержание GSH ($P \leq 0,001-0,05$), а также установлена тенденция к более низкой активности ГР.

Исследования, проведенные на тканях двух видов моллюсков в жабрах мидии, показали максимальную активность ГП (на фоне наименьшего уровня GSH), позволяющую предположить, что скорость утилизации GSH превосходит скорость его возобновления. Об этом свидетельствует и более низкая, чем у анадары, активность ГР, вероятно недостаточная для поддержания необходимого уровня GSH. Это может приводить к истощению его запасов и смещению баланса про- и антиоксидантных процессов в сторону развития окислительного стресса [10]. Повышенный ресурс GSH у анадары и более высокая активность ГР, могут быть связаны с адаптацией к обитанию с низким содержанием кислорода в воде. Ткани анадары в условиях гипоксии отличаются высоким уровнем протеинового катаболизма [7], причем гидролизу подвергаются, в основном, низкомолекулярные пептиды. В дальнейшем аминокислоты, в частности глутаминовая, могут участвовать в реакциях с образованием аланина и α -кетоглутарата, а затем — янтарной кислоты. Результатом этих реакций служит образование в клетке дополнительного ресурса ГТФ и $NADH_2$, а также исключается накопление токсичного лактата. Глутатион является в клетке донором свободных аминокислот — глутамата, глицина и цистеина [10]. Высокий ресурс глутатиона в жабрах анадары может служить источником глутамата для осуществления указанных реакций в гипоксических условиях, причем не только в жабрах, но и в других тканях моллюска, что является энергетически выгодным, поскольку ведет к поддержанию уровня макроэргических соединений [7], а сам транспорт глутатиона осуществляется без затрат энергии — с помощью носителя или путем диффузии [10]. Наши результаты подтверждают литературные данные: содержание GSH в жабрах дальневосточной анадары выше,

чем у двустворчатых моллюсков (не имеющих гемоглобина) – митилид, гребешков, устриц [2].

Таким образом, в результате исследования была показана тканевая и видовая специфичность АО комплекса и ПОЛ моллюсков. Основная роль в антиоксидантной защите тканей мидии принадлежит гепатопанкреасу, в нем установлены наибольшие величины всех изученных показателей, кроме активности ГП. У анадари помимо гепатопанкреаса в антиоксидантной защите значительное участие принимают жабры и нога: наибольшая активность ГР, каталазы и СОД обнаружена в жабрах, а в ноге установлена максимальная активность ГП и самое высокое содержание глутатиона. Для анадари характерен более высокий антиоксидантный потенциал и меньший уровень окислительного стресса – во всех исследованных тканях гемоглобинсодержащего моллюска интенсивность ПОЛ по сравнению с мидией вдвое меньше.

**ОСОБЛИВОСТІ СИСТЕМИ
АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ
ЧОРНОМОРСЬКИХ МОЛЮСКІВ
Mytilus galloprovincialis LAM. ТА *Anadara inaequivalvis* BR.**

О. Л. Гостюхина, И. В. Головина

Інститут біології південних морів
ім. О. О. Ковалевського
НАН України, Севастополь;
e-mail: gostolga@yandex.ru

Досліджували антиоксидантний комплекс (АО) і пероксидне окислення ліпідів (ПОЛ) в тканинах двох видів чорноморських двостулкових моллюсків: мідії *Mytilus galloprovincialis* та анадари *Anadara inaequivalvis*. У нозі, гепатопанкреасі та зябрах статевозрілих моллюсків визначали активність супероксиддисмутазу (СОД, 1.15.1.1), каталази (1.11.1.6), глутатіонпероксидази (ГП, 1.11.1.9), глутатіонредуктази (ГР, 1.6.4.2), вміст відновленого глутатіону (GSH) і ТБК-реактивних продуктів. Показана тканинна та видова специфічність АО комплексу та ПОЛ моллюсків. У гепатопанкреасі мідії встановлені найвищі величини всіх досліджуваних показників, крім активності ГП. В антиоксидантному захисті у анадари, поряд з гепатопанкреасом, значну участь беруть зябри та нога: найбільша активність ГР, каталази і СОД виявлена в зябрах; у нозі встановлена максимальна активність ГП і найвищий вміст глутатіону.

Для анадари властивий вищий антиоксидантний потенціал і менший рівень окислювального стресу – в усіх досліджених тканинах гемоглобінвмісного моллюска інтенсивність ПОЛ у 2 рази менша порівняно з мідією.

Ключові слова: антиоксидантний комплекс, пероксидне окислення ліпідів, двостулкові моллюски, мідія, анадара.

**PECULIARITIES OF ANTIOXIDANT
DEFENSE SYSTEM ORGANIZATION
OF THE BLACK SEA MOLLUSKS *Mytilus galloprovincialis* LAM. AND *Anadara inaequivalvis* BR.**

O. L. Gostyukhina, I. V. Golovina

O. O. Kovalevsky Institute of Biology
of the Southern Seas, National Academy
of Sciences of Ukraine, Sevastopol;
e-mail: gostolga@yandex.ru

Summary

Antioxidant (AO) system and lipid peroxidation (LP) in tissues of two species of the Black Sea bivalve mollusks *Mytilus galloprovincialis* and *Anadara inaequivalvis* were investigated. The activity of superoxide dismutase (SOD, 1.15.1.1), catalase (1.11.1.6), glutathione peroxidase (GP, 1.11.1.9), glutathione reductase (GR, 1.6.4.2), concentrations of reduced glutathione (GSH) and TBA-reactive products were determined in the foot, hepatopancreas and gills of mature mollusks. The characteristics of AO complex and LP products connected with tissue and species specificity of mollusks were found. Hepatopancreas of mussels has been found to have higher values of all characteristics investigated, except GP. The gills and the foot of anadara have been found to be involved in AO defense along with hepatopancreas: maximum activity of GR, catalase and SOD was found in the gills and the highest activity of GP and maximum level of GSH was observed in the foot. Anadara has been shown to have higher antioxidant potential and lower level of oxidative stress because the LP intensity in all tissues examined of the hemoglobin-containing mollusk was twice lower in comparison with the mussel.

Key words: antioxidant complex, lipid peroxidation, Bivalvia, mussel, anadara.

1. Столяр О. Б., Грубінко В. В., Зінковська Н. Г. та ін. // Медична хімія. – 2004. – 6, № 3. – С. 66–68.
2. Довженко Н. В. Реакция антиоксидантной системы двустворчатых моллюсков на

- воздействие повреждающих факторов среды: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. – Владивосток, 2006. – 22 с.
3. *Irato P., Piccinni E., Cassini A., Santovito G.* // *Mar. Pollut. Bull.* – 2007. – **54**, N 7. – P. 1020–1030.
 4. *Гостюхина О.Л., Солдатов А.А., Головина И. В.* // *Доп. НАНУ.* – 2007. – № 11. – С. 147–151.
 5. *Солдатов А. А., Гостюхина О. Л., Головина И. В.* // *Журн. эволюц. биохимии и физиологии.* – 2008. – **44**, № 2. – С. 150–155.
 6. *Гостюхина О. Л., Головина И. В.* // *Укр. біохім. журн.* – 2010. – **82**, № 5. – С. 35–41.
 7. *Солдатов А. А., Андрееенко Т. И., Головина И. В.* // *Доп. НАНУ.* – 2008. – № 4. – С. 161–165.
 8. *Ribera D., Narbonne J. F., Daubeze M., Michel X.* // *Mar. Environ. Res.* – 1989. – **28**. – P. 279–283.
 9. *Будняк А. К., Захариева З. Е., Сорокин А. В., Петров С. А.* // *Вестник Одесского нац. ун-та. Сер.: Биология.* – 2007. – № 12 (5). – С. 19–24.
 10. *Кулинский В. И., Колесниченко Л. С.* // *Биомедиц. химия.* – 2009. – № 3. – С. 255–277.
 11. *Головина И. В.* // *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер.: Біологія.* – 2005. – № 4 (27). – С. 46–47.
 12. *Бородина А. В., Солдатов А. А.* // *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер.: Біологія.* – 2010. – № 3 (44). – С. 25–28.
 13. *Бородина А. В., Нехорошев М. В., Солдатов А. А.* // *Доп. НАНУ.* – 2009. – № 5. – С. 186–190.
 14. *Карнаухов В. Н.* *Биологические функции каротиноидов.* – Москва: Наука, 1988. – 240 с.
 15. *Hourdez St., Weber R. E.* // *J. Inorganic Biochem.* – 2005. – **99**. – P. 130–141.
 16. *Lucas J. M., Vaccaro E., Waite J. H.* // *J. Exp. Biol.* – 2002. – **205**, N 12. – P. 1807–1817.
 17. *Qin X., Waite J. H.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – **95**, N 18. – P. 10517–10522.
 18. *Меньшикова Е. Б., Зенков Н. К.* // *Успехи соврем. биол.* – 1993. – **113**, № 4. – С. 442–455.

Получено 30.06.2011