

УДК 594:612.017.083.3

А. С. Соколова, В. Р. Микряков, С. В. Кузьмичева,
Т. А. Суворова

**ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ *UNIO TUMIDUS*
(*PHILIPSON, 1788*) НА РАЗНЫХ УЧАСТКАХ
р. АХТУБА¹**

Представлены результаты изучения содержания неспецифических иммунных комплексов, продуктов перекисного окисления липидов и антиоксидантов в тканях (жабры, пищеварительная железа и нога) двустворчатого моллюска *Unio tumidus* из разных экотопов р. Ахтуба. Установлены отличия исследуемых показателей моллюсков, отловленных на разных станциях.

Ключевые слова: р. Ахтуба, экотоп, двустворчатый моллюск *Unio tumidus*, иммунные комплексы, перекисное окисление липидов, антиокислительная активность.

Река Ахтуба — левый рукав Волги, отделяется от нее вблизи Волгограда и затем на протяжении 450 км несет свои воды на юго-восток Астраханской области. На всем протяжении Ахтуба сохраняет связь с Волгой посредством ериков и протоков. Ширина русла составляет от 100 до 650 м, длина реки — 537 км, а глубина колеблется от 2 до 12 м. Дно в основном песчаное, но встречаются и заиленные участки на широких плесах. Скорость течения реки колеблется от 0,1 до 0,4 м/с. Летом обычно жарко, дожди выпадают крайне редко. Дневная температура воздуха составляет 25—35°C, а ночная — 19—25°C [30]. Из вышеизложенного следует, что р. Ахтуба имеет резко различающиеся по гидрологическим характеристикам участки.

Двустворчатые моллюски *Unio tumidus* — широко распространенные обитатели пресноводных экосистем [16, 21]. Их излюбленным местом считаются песчано-илистые грунты на глубине 1—2 м в слабопроточных прибрежных участках рек. Они как биофильтраторы, основой жизни которых являются бактерии, фито- и зоопланктон, играют важную роль в процессах самоочищения и формирования качества воды и биопродуктивности. Лимитирующими факторами, определяющими рост, развитие и численность популяции и ареал их распространения, являются скорость течения, температура, соленость, кислородный режим и состояние кормовой базы. Ранее при

¹ Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012690123-4).

© А. С. Соколова, В. Р. Микряков, С. В. Кузьмичева, Т. А. Суворова, 2018

исследовании видового состава и характера распространения пресноводных моллюсков в разнотипных водных объектах Волгоградской области нами была показана зависимость частоты встречаемости моллюсков от гидрологических особенностей речных экотопов [19].

Установлено, что у мидий и представителей сем. Unionidae, обитающих в антропогенно-загрязненных водоемах, по сравнению с моллюсками из чистых акваторий, увеличивается содержание гемагглютининов [1] и лектинов в гемолимфе [23], активность лизосомальных ферментов [7], усиливается перекисное окисление липидов и снижается количество антиоксидантов [5, 10, 11, 25, 26, 29]. В то же время информация об иммунофизиологических показателях моллюсков, обитающих в пресноводных экосистемах с разными экологическими характеристиками, в доступной литературе отсутствует. Между тем, это имеет важное значение при выяснении вопросов их адаптации к разным экотипам. Для установления связи иммунофизиологического статуса моллюсков с условиями экотопа проведено сравнительное изучение некоторых показателей, отражающих функциональное состояние *U. tumidus* из разных по гидрологическим характеристикам участков р. Ахтуба.

Материал и методика исследований. Материалом исследований послужили 12 латентных особей перловицы *U. tumidus* (Philipson, 1788) в возрасте 4+, длиной 7,5—8,0 см и шириной 3,1—3,6 см. Возраст определяли по дугообразному рисунку на створках раковин [6]. Моллюсков собирали в августе 2014 г. на двух станциях реки Ахтуба: I — широкий участок реки с песчаным дном и быстрым течением — 0,4 м/с и температурой воды 24°C, II — узкая русловая часть реки с заиленным дном, замедленным течением — 0,2 м/с и температурой воды 26°C. На каждой станции отбирали по шесть особей.

Мягкие ткани моллюсков препарировали, разделяя на органы: жабры, ногу (мышцы) и пищеварительную железу (печень и выводные протоки). Пробы сразу замораживали в морозильной камере при температуре от -15 до -20°C и транспортировали в специальных термоконтейнерах со льдом в лабораторию для исследования. Из мягких тканей готовили гомогенаты на физрастворе в соотношении 1 : 6 (масса к объему).

Оценку иммунофизиологического состояния проводили по данным анализа уровня неспецифических иммунных комплексов (ИК), интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и общей антиокислительной активности (ОАА).

ИК изучали методом селективной преципитации полиэтиленгликолем с молекулярной массой 6000 при длине волны спектрофотометра 450 нм [8].

Интенсивность ПОЛ в тканях оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА) — одного из конечных продуктов перекисного окисления. Концентрацию МДА определяли по количеству продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой и дающих с ней окрашенный комплекс. Интенсивность окрашивания оценивали спектрофотометрически по изменению максимума поглощения при 535 нм. Кон-

центрацию МДА вычисляли с учетом коэффициента молярной экстинкции МДА ($1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) и выражали в наномолях на 1 г ткани [2].

Общую антиокислительную активность оценивали по кинетике окисления субстрата восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха по общепринятой методике [18]. Сущность метода заключается в том, что чем выше скорость окисления субстрата в присутствии биологического материала, тем ниже содержание антиоксидантов в тканях. Константу ингибирования окисления субстрата (КОС), являющуюся показателем антиокислительной активности ткани, определяли относительно контроля по формуле: $K_i = K_{\text{кон}} - K_{\text{оп}}/C$, где $K_{\text{кон}}$ и $K_{\text{оп}}$ — константы скорости окисления субстрата соответственно в контроле и в опыте; C — концентрация биологического материала в кювете.

Статистическая и графическая обработка данных проведена с помощью прикладных программ Microsoft Office Excel, Statistica 6.0 с использованием t -теста ($p < 0,05$).

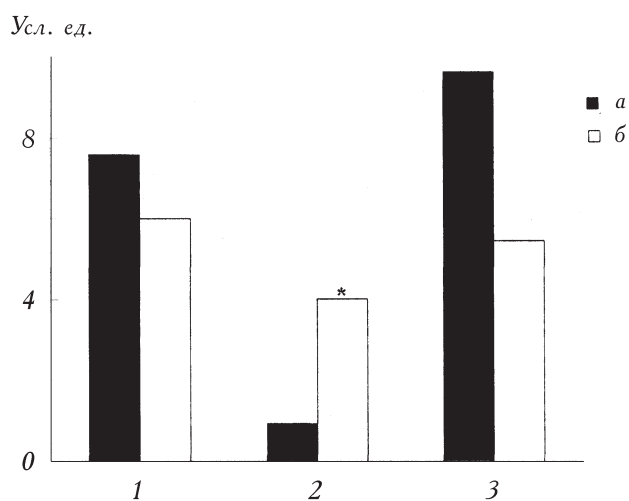
Результаты исследований и их обсуждение

Проведенные исследования показали зависимость иммунофизиологических показателей двустворчатых моллюсков от места их обитания. Перловицы с I и II участков различались величинами и размахом изменчивости исследуемых признаков (рис. 1—3).

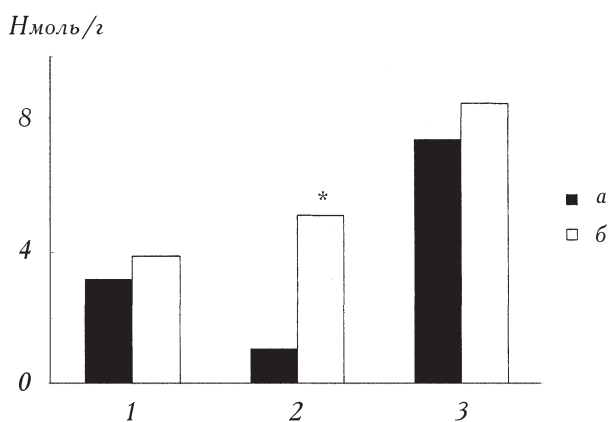
Уровень ИК в исследуемых органах колебался в зависимости от характера выполняемой тканями функции (см. рис. 1). При исследовании моллюсков с разных станций значение этого показателя имели разнонаправленный характер. У особей со станции I зафиксировано достоверно низкое значение в тканях ноги, а в остальных исследуемых органах, наоборот, — высокое по сравнению с моллюсками II станции. Самый высокий уровень ИК отмечен в пищеварительной железе, а самый низкий — в жабрах.

Известно, что ИК играют важную роль в процессах регуляции иммунных реакций, элиминации ксенобиотиков из организма и поддержания иммунофизиологического гомеостаза, как это установлено на позвоночных животных [17]. Они отражают степень накопления в организме чужеродных тел, в том числе ксенобиотиков, и являются причиной снижения функции антибиотического иммунитета, аутоиммунного разрушения иммунокомпетентных клеток, тканей и органов. Избыточное образование ИК, как правило, происходит при накоплении в организме чужеродных тел, в том числе аутоантигенов, поллютантов и инфекционных агентов, вследствие снижения клиринговой функции клеток фагоцитарной системы [8, 13, 17].

Выявленные различия в содержании ИК у моллюсков I и II станций, на наш взгляд, обусловлены разной концентрацией микроорганизмов в местах их обитания. Вероятно, микроорганизмы, как объекты их питания, выполняют функцию антигена и являются одной из основных причин активации или супрессии образования ИК. Для подтверждения данного положения необходимы дальнейшие полевые и экспериментальные исследования связи



1. Уровень неспецифических иммунных комплексов в органах *Unio tumidus*. Здесь и на рис. 2, 3: 1 — жабры; 2 — нога; 3 — пищеварительная железа; а — I станция; б — II станция; * достоверно относительно I станции (при $p \leq 0,05$).



2. Концентрация малонового диальдегида в органах *Unio tumidus*.

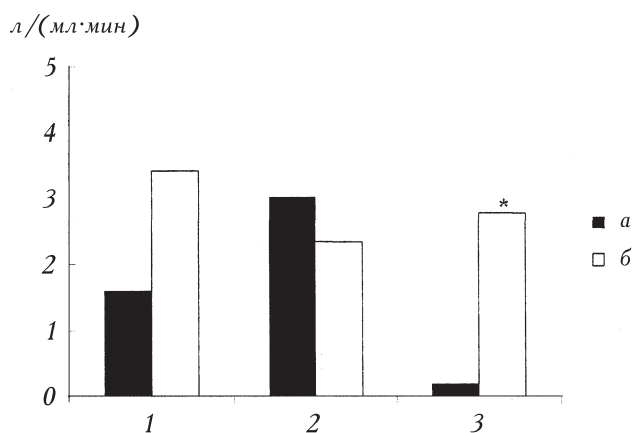
льный физиологический процесс, а его усиление, как правило, происходит при воздействии на водные организмы неблагоприятных стресс-факторов, вызванных загрязнением воды токсикантами, дефицитом кислорода, изменением рН воды, резкими перепадами температуры и др. На воздействие стресса организмы реагируют изменением соотношения между ПОЛ и антиокислительной активностью тканей [14, 25, 26, 29], что, в конечном итоге, отражается на характере течения метаболических процессов [9].

между величиной концентрацией микрофлоры и содержанием ИК в исследуемых тканях перловиц.

Моллюски из разных экотопов отличались не только содержанием ИК, но и интенсивностью ПОЛ и значением КОС. Концентрация МДА во всех исследуемых органах моллюсков со II станции была выше, чем у особей с I, однако достоверные различия зафиксированы только в тканях ноги (см. рис. 2). Более высокие величины МДА отмечены в пищеварительной железе. У перловиц с I станции, по сравнению с особями II, значение КОС в жабрах и пищеварительной железе было ниже, а в мышцах ног — выше (см. рис. 3), но достоверными оказались различия только в пищеварительной железе.

Согласно существующим представлениям, ПОЛ — норма-

Одним из основных механизмов регуляции метаболических процессов в любом организме является динамическое окислительно-восстановительное равновесие, обеспечиваемое прооксидант-антиоксидантной системой [3]. При оптимальных условиях равновесие этой системы жизнеобеспечения поддерживается на стационарном минимальном уровне [24, 28]. Антиокислительная защита осуществляется анти-



3. Константа окисления субстрата в органах *Unio tumidus*.

оксидантной системой клеток и тканей (антиоксидантными ферментами: супероксиддисмутазой, каталазой, глутатионпероксидазой, глутатион-S-трансферазой) и низкомолекулярными антиоксидантными соединениями (δ -токоферол, восстановленный глутатион, фенольная форма коэнзима Q₁₀, β -каротин, аскорбиновая кислота и др.). При воздействии негативных стресс-факторов происходит активация процессов окислительного стресса, которая связана с избыточным накоплением активных форм кислорода (АФК) и снижением активности ферментных и неферментных антиоксидантов. Избыток АФК (супероксидный и гидроксильный радикалы, синглетный кислород, пероксиды и многие другие соединения) становится причиной активации ПОЛ клеточных мембран, разрушения нуклеиновых кислот, белков, повреждения ДНК, митохондрий, разрушения полиненасыщенных жирных кислот клеточных мембран, пероксидации липидов и инактивации структур антиокислительной защиты [3, 12, 14, 24, 28].

Высокий уровень МДА и КОС у данного вида, вероятно, обусловлены стрессирующим влиянием среды обитания, в основе которого лежат высокая температура воды и дефицит кислорода, последствиями чего являются активация процессов окислительного стресса и снижение содержания антиоксидантов, предотвращающих образование токсических кислородных метаболитов.

Содержание МДА и ИК, а также значение КОС в клетках пищеварительной железы были выше, чем в жабрах и ноге, что, вероятно, обусловлено интенсивностью метаболических процессов, связанных с деградацией и разрушением пищевых консументов. Известно, что процесс пищеварения сопровождается активацией окислительно-восстановительных процессов и образованием активных кислородных метаболитов, а пищеварительная железа выводит все конечные продукты распада [20, 22]. В ряде работ по исследованию антиоксидантного комплекса и ПОЛ, проведенных на морских

моллюсках, также отмечались высокие показатели в пищеварительной железе и жабрах [5, 10, 20, 27].

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали, что для *Unio tumidus* характерны существенные различия исследуемых показателей в тканях и органах на разных участках р. Ахтуба, отражающие экотопические особенности их места обитания. Высокие значения ПОЛ и низкие — антиоксидантов (кроме мышечной ткани) в тканях моллюсков указывают на то, что условия среды обитания на II станции менее благоприятны, чем на I. Вероятно, это связано с более высокой температурой воды, низкими скоростью течения и содержанием кислорода. Выявленные изменения могут служить индикатором при оценке влияния экологических факторов на двустворчатых моллюсков.

**

*Наведено результати визначення вмісту неспецифічних імунних комплексів, продуктів перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантів у тканинах (зябра, травна залоза і нога) двостулкового моллюска *Unio tumidus* з різних екотопів річки Ахтуба. Встановлено відмінності досліджуваних показників моллюсків, відловлених на різних станціях.*

**

*The results are presented on the content of nonspecific immune complexes, products of lipid peroxidation and antioxidants in the tissues (gills, digestive gland and foot) of the bivalve *Unio tumidus* from the different ecotopes of the river Akhtuba. It has been established the differences in the studied parameters between clams collected at various stations.*

**

1. Алехина Г.П., Логинова Е.Г., Мисетов И.А. Иммунологическая реакция пресноводных двустворчатых моллюсков на неблагоприятное воздействие среды // Вестн. Оренбург. ун-та. — 2010. — № 6. — С. 52—54.
2. Андreeва Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. — 1988. — № 11. — С. 41—43.
3. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс. — СПб.: Наука, 1992. — 148 с.
4. Болдырев А.А. Окислительный стресс и мозг // Сорос. образоват. журн. — 2001. — Т. 7. — № 4. — С. 21—28.
5. Будняк А.К., Захариева З.Е., Сорокин А.В., Петров С.А. Состояние окислительно-восстановительной системы в органах Черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* в присутствии солей цинка и меди в среде обитания // Вестн. Одес. ун-та. Сер. Биология.. — 2007. — Т. 12. — № 5. — С. 19—24.
6. Власов Б.В. Методы определения возраста Unionidae по раковине и их значение в научно-промысловых исследованиях // Зап. Болшев. биол. станции. — 1935. — Вып. 7—8. — С. 133—149.

7. *Высоцкая Р.У., Шкляревич Г.А., Вдовиченко Е.А., Дивненко В.Ю.* Лизосомальные ферменты в эколого-биохимических адаптациях мидий и амфипод Кандалакшского залива Белого моря // Уч. зап. Петрозавод. ун-та. — 2015. — № 6. — С. 21—27.
8. *Гриневич Ю.А., Алферов А.Н.* Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело. — 1981. — № 8. — С. 493—496.
9. *Грубинко В.В., Леус Ю.В., Арсан О.М.* Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у рыб (обзор) // Гидробиол. журн. — 2001. — Т. 37, № 1. — С. 64—78.
10. *Гостюхина О.Л., Головина И.В.* Состояние антиоксидантного комплекса и перекисного окисления липидов в тканях мидии из Севастопольских бухт в ранневесенний период // Экол. химия. — 2011. — № 20 (4). — С. 211—217.
11. *Довженко Н.В., Бельчева Н.Н., Челомин В.П.* Реакция антиоксидантной системы мидии Грея *Mytilus grayanus* как индикатор загрязнения прибрежных акваторий (залив Петра Великого в Японском море) // Вестн. Моск. гос. обл. ун-та. Сер. естеств. науки. — 2014. — № 4. — С. 57—66.
12. *Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Вольский Н.Н., Козлов В.А.* Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз // Успехи совр. биологии. — 1999. — Т. 119. — № 5. — С. 440—450.
13. *Логинов С.И., Смирнов П.Н., Трунов А.Н.* Иммунные комплексы у животных и человека: норма и патология. — Новосибирск: Сиб. отд. РАСХН, 1999. — 144 с.
14. *Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др.* Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. — Новосибирск: АРТА, 2008. — 284 с.
15. *Микряков В.Р., Силкина Н.И., Микряков Д.В.* Влияние антропогенного загрязнения на иммунологические и биохимические механизмы поддержания гомеостаза у рыб Черного моря // Биология моря. — 2011. — Т. 37. — № 2. — С. 142—148.
16. *Романенко В.Д.* Основы гидроэкологии. — Киев: Генеза, 2004. — 664 с.
17. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология. — М.: Мир, 2000. — 592 с.
18. *Семенов В. Л., Ярош А.М.* Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Укр. биохим. журн. — 1985. — Т. 57, № 3. — С. 50—51.
19. *Соколова А.С., Карпенко Р.В.* Видовой состав и особенности распространения пресноводных моллюсков в разнотипных водных объектах Волгоградской области // Биология внутр. вод. — 2015. — № 2. — С. 80—84.
20. *Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Головина И.В.* Антиокислительный ферментный комплекс тканей двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. В норме и в условиях окислительного стресса (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. — 2007. — Т. 43, № 5. — С. 621—628.
21. *Старобогатов Я.И.* Раки, моллюски. — Л.: Лениздат, 1988. — С. 16—30.
22. *Флоренсов В.А., Пестова И.М.* Очерки эволюционной иммуноморфологии. — Иркутск: Изд-во Иркутск. ун-та, 1990. — 244 с.

23. Чикаловец И.В., Черников О.В., Шехова Е.А. и др. Изменение содержания лектинов в мантии мидии *Mytilus trossulus* в ответ на действие загрязняющих воду веществ // Биология моря. — 2010. — Т. 36, № 1. — С. 70—74.
24. Filho W.D. Fish antioxidant defences — a comparative approach // Braz. J. Med. and Biol. Res. — 1996. — Vol. 29, № 12. — P. 1735—1742.
25. Romeo M., Gnassia-Barelli M. Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the mediterranean clam *Ruditapes decussates* // Comp. Biochem. Physiol. — 1997. — Vol. 118, № 1. — P. 33—37.
26. Viarengo A., Pertica M., Canesi L. et al. Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussel tissues // Mar. Environ. Res. — 1988. — Vol. 24, № 1—4. — P. 354—358.
27. Vlahogianni T.H., Valavanidis A. Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant defence enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis* // Chem. Ecol. — 2007. — Vol. 23, № 5. — P. 361—371.
28. Winston G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Comp. Biochem. Physiol. — 1991. — Vol. 100, № 1—2. — P. 173—176.
29. Zaroogian G., Norwood C. Glutathione and metallothionein status in an acute response by *Mercenaria mercenaria* brown cells to copper in vivo // Ecotoxicol. Environ. Safety. — 2002. — Vol. 53, № 2. — P. 285—292.
30. <http://www.w-fish.ru/info/reka-ahtuba-i-ee-poyma.php>.

Институт биологии внутренних
вод РАН, Борок, РФ

Поступила 09.01.18