

## СООТНОШЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО И ФЕРМЕНТНОГО ЗВЕНА АНТИОКСИДАНТНОГО КОМПЛЕКСА В ТКАНЯХ МОЛЛЮСКА-ВСЕЛЕНЦА *ANADARA KAGOSHIMENSIS*

О. Л. Гостюхина<sup>1</sup>, Т. И. Андреевко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, РФ,  
gostolga@yandex.ru

<sup>2</sup>Севастопольский государственный университет, Севастополь, РФ

Исследовали активность антиоксидантных ферментов глутатионредуктазы (ГР), супероксиддисмутазы (СОД), содержание восстановленного глутатиона (GSH), аминокислот, мочевины и глюкозы в гепатопанкреасе, жабрах и ноге черноморского гемоглобинсодержащего моллюска *Anadara kagoshimensis*. Обсуждаются особенности взаимодействия между ферментами и низкомолекулярными антиоксидантами в условиях обитания моллюска при дефиците кислорода.

**Ключевые слова:** анадара, антиоксидантный комплекс, ферменты, глутатион, мочевина, аминокислоты

Черноморский моллюск-вселенец *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) (Bivalvia: Arcidae) – один из видов, широко распространенных в Азово-Черноморском бассейне и наиболее устойчивых к ряду неблагоприятных для жизни факторов водной среды, и в первую очередь, к недостатку кислорода [1, 2].

В условиях дефицита кислорода одной из ведущих защитных систем гидробионтов от действия свободно-радикального окисления (СРО) выступает антиоксидантный (АО) комплекс, обеспечивающий неспецифический ответ организма на любые неблагоприятные воздействия [1, 3, 4]. Как показано нами ранее, в условиях обитания при недостатке кислорода АО комплекс анадары, содержащей гемоглобин, имеет ряд особенностей, отличающих ее от многих других двустворчатых моллюсков, не имеющих гемоглобина. Нами проведен также сравнительный анализ состояния АО системы анадары, мидии и устрицы Черного моря [5]. В работах ряда авторов рассматриваются реакции АО комплекса дальневосточной анадары при аноксии и последующий реоксигенации [6, 7]. Однако вопросам взаимного влияния ферментного и низкомолекулярного (НМ) звена АО системы анадары [4, 8] уделяется меньше внимания.

Цель данного исследования – рассмотреть некоторые аспекты взаимодействия ферментов АО комплекса и низкомолекулярных антиоксидантов в тканях анадары.

**Материал и методы.** Половозрелые особи анадары *A. inaequalis* с длиной раковины 30-33 мм собрали весной (март) в прибрежной зоне пос. Качивели (Южный берег Крыма). После транспортировки моллюсков для снятия стресса выдерживали в аквариумах с проточной морской водой в течение 2-3 суток. Гепатопанкреас, жабры и ногу препарировали и гомогенизировали при температуре 0-4°C на ледяной бане. Уровень восстановленного глутатиона (GSH) определяли по реакции с аллоксановым реактивом при длине волны 305 нм [9].

В супернатантах измеряли активность антиоксидантных ферментов: глутатионредуктазы (ГР) – по убыли НАДФН и супероксиддисмутазы (СОД) – по реакции с тетразолиевым нитросиним [9]. Оценку уровня свободного аминного азота (аминокислот) проводили по цветной реакции с нингидрином, содержание пирувата – с использованием метода Умбрайт по интенсивности окраски гидразона, динитрофенилгидразином в щелочной среде [10], содержание белка определяли методом Лоури, мочевины – по ре-

акции с диацетилмонооксимом [10]. Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Отличия считали статистически достоверными при  $p \leq 0.05$ . Объем выборки – 10–20 особей.

**Результаты и обсуждение.** Наиболее высокое содержание глутатиона выявлено в ноге анадары –  $871.9 \pm 176.2$  мкг  $\text{г}^{-1}$ , что в 2.3–3.9 раза выше ( $p \leq 0.05-0.01$ ), чем в жабрах и гепатопанкреасе (рис. 1). Наибольшие отличия достигали 2.5 раза ( $p \leq 0.01$ ). В активности ферментов СОД и ГР наибольшие значения отмечали в гепатопанкреасе и жабрах, наименьшие – в ноге моллюска. Различия между этими величинами в тканях составили 1.9-2.1 и 1.4-1.7 раза ( $p \leq 0.05$ ) по активности ГР и СОД соответственно (рис. 1А).

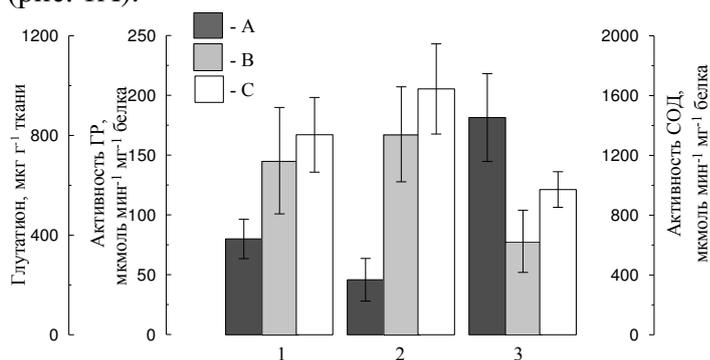


Рис. 1А Содержание восстановленного глутатиона, активность глутатионредуктазы (ГР) и супероксиддисмутазы (СОД) в тканях анадары (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога, А – глутатион, В – активность ГР, С – активность СОД)

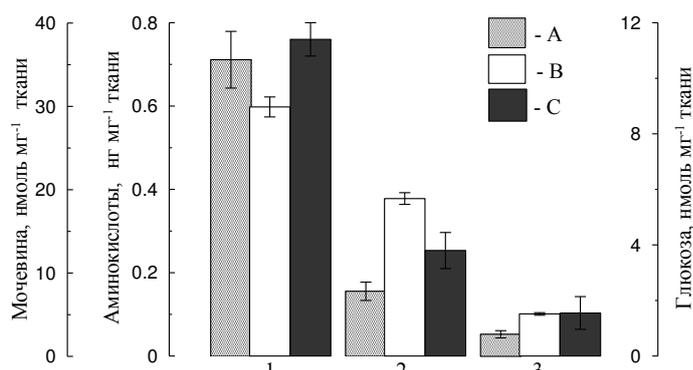


Рис. 1Б Содержание мочевины, аминокислот и глюкозы в тканях анадары (1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога, А – содержание мочевины, В – содержание аминокислот, С – содержание глюкозы)

Распределение остальных показателей в тканях анадары было сходным между собой: наиболее высокое содержание мочевины, аминокислот и глюкозы выявлено в гепатопанкреасе, наименьшее – в ноге животного. Наибольшие отличия между указанными тканями составили: по содержанию мочевины – 13.4 раза ( $p \leq 0.001$ ), по уровню аминокислот – 5.9 раза ( $p \leq 0.001$ ), глюкозы – 7.4 раза ( $p \leq 0.001$ ) (рис. 1Б).

Глутатионовая система (ГС) – одна из наиболее эффективных систем АО защиты. Глутатион способен, как в составе ГС, так и самостоятельно, нейтрализовывать ряд видов активных форм кислорода (АФК), и в том числе супероксидный радикал  $\text{O}_2^-$  и таким образом замещать действие СОД [3, 10]. Как показали наши результаты, нога анадары отличалась наименьшей активностью СОД по сравнению с гепатопанкреасом и жабрами, но имела наибольший ресурс восстановленного глутатиона (рис. 1А). Возможно, недостаток активности фермента отчасти компенсируется высоким ресурсом этого важного НМ антиоксиданта. В то же время, как показано нами ранее, в ноге у мидии, напротив, и активность СОД, и уровень GSH, в сравнении с другими тканями были наименьшими [4, 5]. Возможно, подобная особенность анадары, в отличие от мидии и других моллюсков, связана с наличием гемоглобина и высокого содержания кароти-

ноидов, особенно в ноге моллюска. Эти пигменты и гемоглобин способны депонировать кислород [3], что, в свою очередь, может способствовать усилению СРО и накоплению АФК. Вероятно, это привело к ответному росту уровня GSH в ноге анадары.

Как свидетельство взаимодействия между GSH и СОД у моллюсков можно рассматривать реакции АО комплекса литорины *Littorina mandschurica* [7]. Моллюск эволюционно адаптирован к дефициту кислорода в режиме периодической смены прилива и отлива. В условиях экспериментальной гипоксии/аноксии обнаружены реакции, сходные с выявленными нами у анадары, – рост как активности ферментов СОД и ГР, так и уровня НМ антиоксиданта – GSH. Авторы связывают это со способностью АО системы литорины к быстрому реагированию на повышенную продукцию АФК при периодическом дефиците кислорода в среде.

Установлено, что анадара даже в условиях внешней нормоксии существенно снижает потребление кислорода тканями – до 20 раз. При этом в тканях моллюска преобладают анаэробные процессы, а потребление кислорода незначительно [1]. Но в отличие от других моллюсков, высокое содержание каротиноидов и гемоглобина у анадары способствуют дополнительной генерации АФК [3]. Поэтому высокий уровень глутатиона как универсального антиоксиданта, вероятно, является одним из важнейших элементов поддержания баланса про- и антиоксидантных процессов у анадары в условиях дефицита кислорода или колебаний его уровня в среде.

Как известно, достаточный уровень GSH важен для поддержания необходимого уровня АТФ в клетке. Истощение пула GSH при помощи CDNB приводит к увеличению генерации митохондриальных АФК, и в конечном итоге, резко понижает жизнеспособность клеток [10]. По нашим данным, уровень GSH снижается в ряду нога > гепатопанкреас ≥ жабры. Как показали результаты исследования [1], выполненного на одной с нами группе анадары, в ноге отмечен также наиболее высокий уровень адениловых нуклеотидов, АМФ, АДФ и АТФ, в отличие от жабр и гепатопанкреаса. Это подтверждает взаимосвязь между содержанием GSH и уровнем адениловых нуклеотидов и АТФ в клетке. Подобные результаты получены для тканей мидии Грэй из загрязненного Уссурийского залива: наиболее высокое содержание GSH сопровождалось и наибольшей активностью АТФазы, что отмечали в жабрах и гонадах моллюска [8].

Глутатион, состоящий из аминокислот глутамата, глицина и цистеина, служит одним из основных источников этих веществ в клетке [3, 10]. С их участием протекают реакции с образованием аланина и  $\alpha$ -кетоглутарата, а затем – янтарной кислоты. В результате в клетке образуется дополнительный ресурс ГТФ и НАДН<sub>2</sub> [1]. Высокое содержание глутатиона у анадары может служить источником глутамата для осуществления подобных реакций при гипоксии.

Выявленное нами высокое содержание мочевины в гепатопанкреасе говорит об усилении белкового катаболизма, так как мочевина – конечный продукт распада белков [3]. На это же указывает и большой пул свободных аминокислот, установленный нами. Вероятно, мочевина, образующаяся в гепатопанкреасе при распаде белков, может служить в роли НМ антиоксиданта, дополняя работу ферментного звена АОС. Как известно, при деградации гемовых структур высвобождаются ионы Fe<sup>2+</sup>, способные индуцировать ПОЛ. В этой связи важна роль мочевины, которая легко проникая через гистогематический барьер, способна связываться в эритроцитах с гемоглобином и уменьшать число железосодержащих центров перекисного окисления липидов [3]. Вероятно, подобные реакции могут протекать в тканях гемоглобинсодержащей анадары, о чем свидетельствует наименьший уровень ПОЛ в ноге этого моллюска как по сравнению с

собственными гепатопанкреасом и жабрами, так и в сравнении с ногой мидии [5].

Таким образом, в ноге анадары выявлены наиболее высокий ресурс восстановленного глутатиона и наименьшая активность СОД и ГР. Это свидетельствует о его активной самостоятельной антиоксидантной роли. Содержание мочевины, аминокислот и глюкозы в гепатопанкреасе и жабрах было наибольшим, а в ноге – наименьшим. Использование низкомолекулярного звена АО защиты позволяет анадаре эффективно приспосабливаться к неблагоприятным условиям обитания и успешно конкурировать с аборигенными видами Черного моря при дефиците кислорода в среде.

1. Солдатов А.А., Андреев Т.И., Головина И.В., Столбов А.Я. Особенности организации тканевого метаболизма у моллюсков с различной толерантностью к внешней гипоксии // *Журн. эволюц. биохимии и физиол.* 2010. Т. 46. № 4. С. 284–290.
2. Шиганова Т.А., Мусаева Э.И., Лукашова Т.А. и др. Увеличение числа находок средиземноморских видов в Черном море // *Росс. журнал биологических инвазий.* 2012. № 3. С. 61–99.
3. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // *Успехи соврем. биологии.* 1993. Т. 113. Вып. 4. С. 456–470.
4. Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Головина И.В. Функциональные состояния антиоксидантного ферментного комплекса тканей *Mytilus galloprovincialis* Lam. в условиях окислительного стресса // *Журн. эволюц. биохимии и физиологии.* 2014. Т. 50, № 3. С. 183–189.
5. Гостюхина О.Л., Головина И.В. Сравнительное исследование антиоксидантного комплекса тканей черноморских моллюсков: *Mytilus galloprovincialis*, *Anadara inaequalis* и *Crassostrea gigas* // *Гидробиол. журнал.* 2013. Т. 49, № 1 (289). С. 82–90.
6. Довженко Н. В. Реакция антиоксидантной системы двустворчатых моллюсков на воздействие повреждающих факторов среды: автореф. дисс...канд. биол. наук. Владивосток, 2006. 22 с.
7. Истомина А.А., Довженко Н.В., Челомин В.П. Реакция антиоксидантной системы на аноксию и реоксигенацию у морского двустворчатого моллюска *Scapharca broughtoni* // *Электр. журн. «Вестник Московского гос. обл. университета».* 2011. Вып. 3. Биология. С. 12–16.
8. Лукьянова О. Н. Молекулярные биомаркеры энергетического метаболизма мидий при антропогенном загрязнении зал. Петра Великого Японского моря // *Экология.* 2006. №3. С. 227–231.
9. Переслегина И.А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // *Лаб. дело.* 1989. № 11. С. 20–23.
10. Камышников В.С. *Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике* 2-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2004. С. 245–246.
11. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатион-трансферазы, глутатионпероксидазы // *Биомедицинская химия.* 2009. Т. 55(3). С. 255-277.

## THE INTERRELATION OF LOW MOLECULAR AND ENZYME PART OF ANTIOXIDANT COMPLEX IN TISSUES OF MOLLUSC-INVADER ANADARA KAGOSHIMENSIS

O. L. Gostyukhina<sup>1</sup>, T. I. Andreenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kovalevsky Institute of Marine Biological Research, RAS, Sevastopol, RF, gostolga@yandex.ru

<sup>2</sup>Sevastopol State University, Sevastopol, RF

The activity of antioxidant enzymes glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD), the contents of reduced glutathione (GSH), amino acids, uric acid and glucose have been investigated in hepatopancreas, gills and foot of Black Sea hemoglobin-containing mollusk *Anadara kagoshimensis*. The particular features of interrelation between antioxidant enzymes and low molecular antioxidants of anadara in the oxygen deficiency conditions in littoral zone have been discussed.

*Key words:* anadara, antioxidant complex, enzymes, glutathione, urea, amino acids