

УДК 577.121:594.1 (262.5)

О. Л. Гостюхина, И. В. Головина

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
АНТИОКСИДАНТНОГО КОМПЛЕКСА ТКАНЕЙ
ЧЕРНОМОРСКИХ МОЛЛЮСКОВ MYTILUS
GALLOPROVINCIALIS, ANADARA INAEQUIVALVIS И
CRASSOSTREA GIGAS**

Изучали показатели антиоксидантной (АО) системы и пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в тканях черноморских двустворчатых моллюсков с различными эколого-физиологическими характеристиками: мидии, анадары и устрицы. Определяли активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, каталазы, супероксиддисмутазы, содержание восстановленного глутатиона и ТБК-активных продуктов. Ткани мидии имели в большинстве случаев максимальные величины АО показателей и самый высокий уровень ПОЛ. Основная роль в антиоксидантной защите мидии принадлежит гепатопанкреасу, у анадары в этом процессе значительное участие принимают также жабры и нога. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в жабрах, а также глутатионпероксидазы в мышечной ткани гемоглобинсодержащей анадары была вдвое выше, чем у мидии и устрицы. Содержание глутатиона в ноге анадары в четыре раза больше, чем у мидии. В большинстве тканей устрицы, по сравнению с другими видами, установлены низкие величины исследованных показателей, за исключением глутатионредуктазы.

Ключевые слова: антиоксидантная система, видовые особенности, двустворчатые моллюски, Черное море.

Исследование состояния антиоксидантного (АО) комплекса и пероксидного окисления липидов (ПОЛ) позволяет оценить адаптационные возможности двустворчатых моллюсков, поскольку указанные параметры являются ключевыми маркерами окислительного стресса [14, 17, 20].

Цель настоящей работы — сравнительный анализ показателей АО системы в тканях трех видов двустворчатых моллюсков — объектов марикультуры в Черном море: аборигенного вида мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), вселенца анадары *Anadara inaequivalvis* (Bruguère, 1789) и интродуцента устрицы *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Ранее были изучены реакции АО комплекса и ПОЛ у черноморской мидии и анадары при воздействии различных стресс-факторов: поллютантов, гипоксии и аноксии [3, 9, 14, 20]. Определение характеристик АО системы в тканях акклиматизирован-

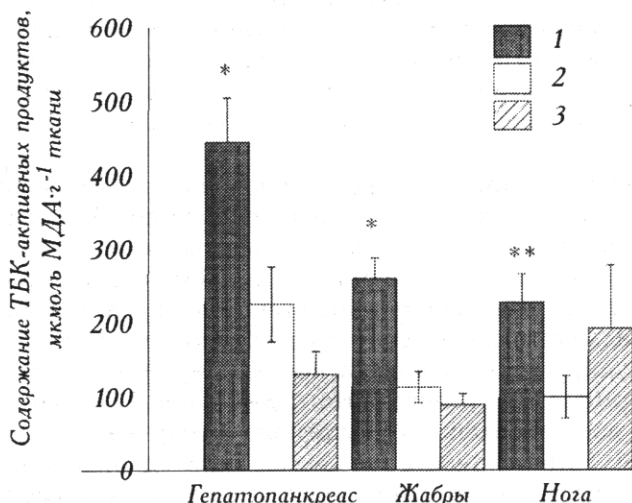
ной устрицы, а также сравнение уровня АО активности и ПОЛ у разных видов черноморских моллюсков не проводилось. Исследование системы антиоксидантной защиты с учетом эколого-физиологических особенностей двустворчатых моллюсков позволит более корректно использовать изучаемые показатели для мониторинга состояния животных и морской среды.

Материал и методика исследований. Исследовали половозрелых особей мидии, анадары и устрицы, собранных весной (март) в районе пос. Кацивели (Южный берег Крыма). После транспортировки моллюсков выдерживали в аквариумах с проточной морской водой в течение 2—3 сут. Препарирование, гомогенизацию и центрифугирование тканей гепатопанкреаса, жабр и мышц (ноги у мидии и анадары; мышцы-аддуктора у устрицы, поскольку у взрослых особей нога редуцируется) проводили при температуре 0—4°C. Определяли активность ферментов в супернатанте, содержание ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) и восстановленного глутатиона (GSH) — в гомогенате, как описано ранее [9]. Интенсивность процессов ПОЛ оценивали по количеству ТБК-активных продуктов (реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой). При стандартной температуре 25°C измеряли активность ферментов: глутатионпероксидазы (ГП, 1.11.1.9) — по накоплению окисленного глутатиона (GSSG), глутатионредуктазы (ГР, 1.6.4.2) — по убыли НАДФН, каталазы (1.11.1.6) — по реакции с молибдатом аммония, супероксиддисмутаза (СОД, 1.15.1.1) — по реакции с тетразолиевым нитросиним. Уровень GSH измеряли по образованию комплекса с аллоксановым реактивом. Содержание белка определяли методом Лоури. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Отличия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$, результаты представлены в виде $M \pm m$. Объем выборочных совокупностей составлял 6—10 особей.

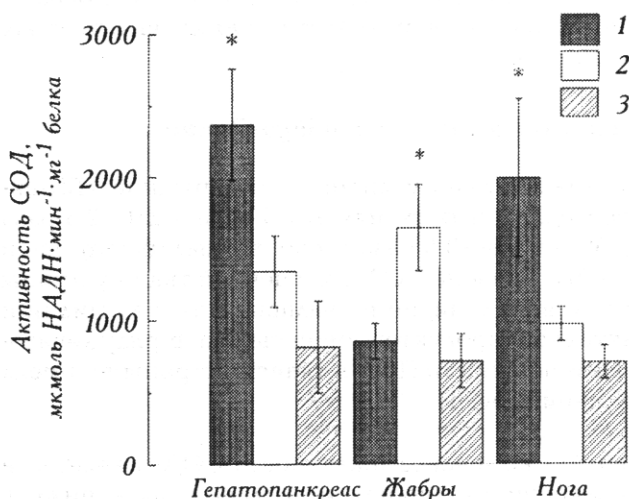
Результаты исследований и их обсуждение

Наибольший уровень ПОЛ обнаружен у мидии — содержание ТБК-активных продуктов во всех исследованных тканях этого вида в 2,0—2,3 раза выше, чем у анадары ($p \leq 0,05$), и в 3,0—3,5 раза выше в гепатопанкреасе и жабрах, чем у устрицы ($p \leq 0,001$). Уровень ПОЛ в мышечной ткани устрицы достоверно не отличался от такового у мидии и анадары. В тканях мидии и анадары содержание ТБК-активных продуктов уменьшалось в ряду гепатопанкреас > жабры = нога. Интенсивность ПОЛ в тканях устрицы не имела значительных тканевых различий (рис. 1).

Большинство показателей АО комплекса (активность СОД, каталазы и ГП) в тканях устрицы по сравнению с мидией и анадарой были ниже в 1,8—7,1 раза ($p \leq 0,05—0,001$) (рис. 2—4). Исключение составила активность ГР, которая была в 2,6—3,6 раза выше ($p \leq 0,05—0,001$), чем у других исследованных видов (рис. 5). Таким образом, наименьшему уровню ПОЛ в большинстве тканей устрицы соответствовала и минимальная активность АО ферментов. Возможно, это свидетельствует о меньшей чувствительности устрицы к окислительному стрессу. В частности, устрица лучше, чем мидия, адаптирована к загрязнению металлами [13].



1. Содержание ТБК-активных продуктов в гепатопанкреасе, жабрах и мышечной ткани моллюсков. Здесь и на рис. 2—6: 1 — мидии; 2 — анада́ры; 3 — устрицы; * различия достоверны по сравнению с другими видами; ** различия достоверны по сравнению с анада́рой.



2. Активность супероксиддисмутазы в гепатопанкреасе, жабрах и мышечной ткани моллюсков; * различия достоверны по сравнению с другими видами.

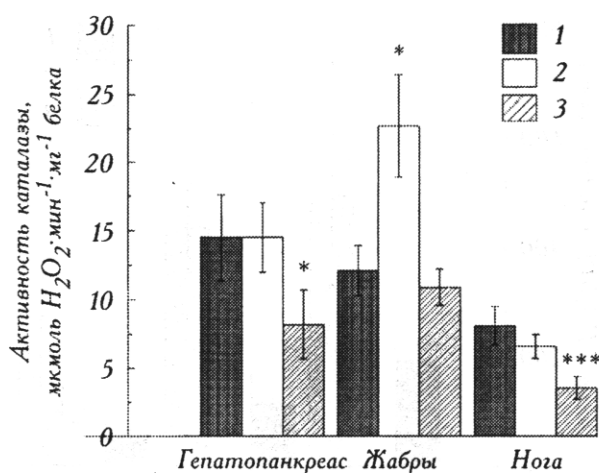
У анада́ры в мышечной ткани отмечена максимальная активность ГП, в 1,8—2,0 раза выше ($p \leq 0,05$), чем у устрицы и мидии, и наибольший уровень GSH, в 3,9 раза более высокий ($p \leq 0,05$) по сравнению с мидией (рис. 6). Содержание GSH в тканях устрицы не определяли.

Среди исследованных трех видов двусторчатых моллюсков анада́ра отличается наличием эритроцитарного гемоглобина и наименьшей чувствительностью к изменению концентрации кислорода [4, 8, 16]. Предполагают, что гемоглобин оказывает непосредственное влияние на АО активность тканей животных, так как его сульфгидрильные (SH) группы могут инактивировать активные формы кислорода (АФК), образующиеся при гипоксии [12]. Вероятно, SH-группы гемоглобина анада́ры, наряду с глутатионом, обезвреживают свободные радикалы, что снижает интенсивности ПОЛ в тканях моллюска.

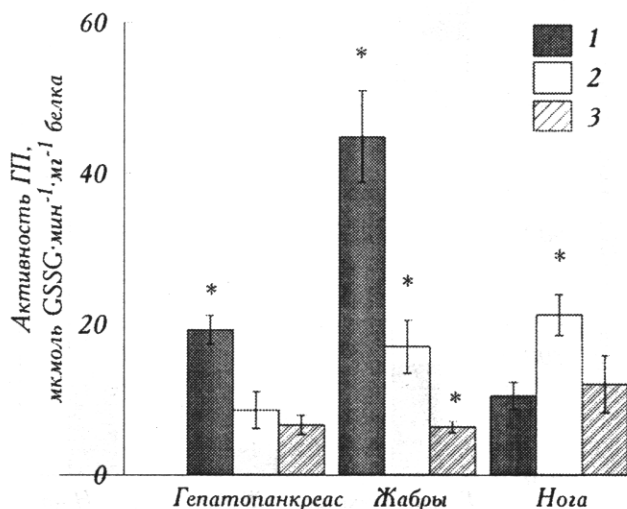
Анада́ра, в отличие от мидии и устрицы, ведущих прикрепленный образ жизни, может активно перемещаться по дну и зарываться в грунт. Ткани моллюска ярко окрашены и содержат кароти-

ноидов больше, чем у мидии [1]. Способность каротиноидов и гемоглобина запасать кислород [15], вероятно, приводит к понижению интенсивности ПОЛ. Кроме того, повышенный обмен веществ в тканях подвижной анадары [2] может способствовать более стабильному соотношению уровня ПОЛ и АО активности, чем у других исследованных видов.

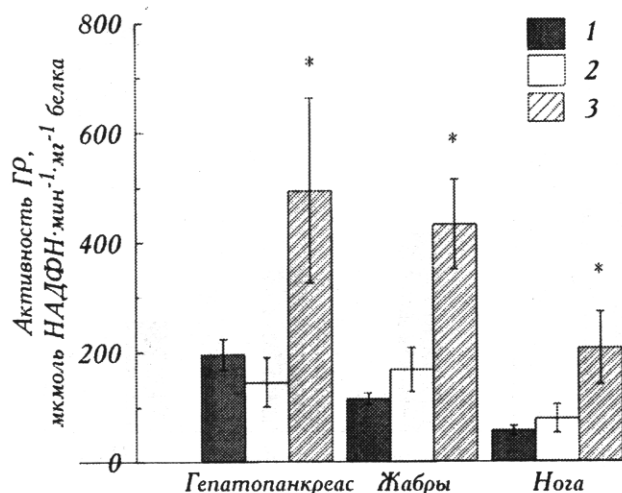
Состояние нереста также влияет на АО активность и ПОЛ в тканях моллюсков [19, 21]. Ранее нами было показано, что у мидии в период нереста происходит активация ПОЛ и ряда АО ферментов [9]. АФК принимают участие в регуляции репродуктивных циклов у моллюсков и активно генерируются в этот период [12]. Массовый нерест у мидии происходит в марте при температуре воды $+7-8^{\circ}\text{C}$, когда и были собраны исследованные нами моллюски. Устрица — более теплолюбивый вид, нерестится позднее при температуре воды не менее 18°C [10]. Вымет половых продуктов у анадары происходит одновременно в августе—сентябре [11]. Принимая во внимание сроки нереста моллюсков, можно предположить, что высокий уровень продуктов ПОЛ в марте у мидии, по сравнению с устрицей и анадарой, обусловлен влиянием нерестового состояния.



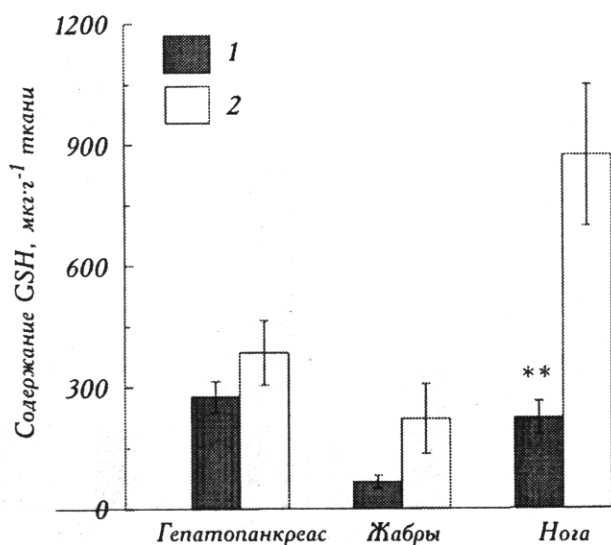
3. Активность каталазы в гепатопанкреасе, жабрах и мышечной ткани моллюсков; * различия достоверны по сравнению с другими видами; *** различия достоверны по сравнению с мидией.



4. Активность глутатионпероксидазы в гепатопанкреасе, жабрах и мышечной ткани моллюсков; * различия достоверны по сравнению с другими видами.



5. Активность глутатионредуктазы в гепатопанкреасе, жабрах и мышечной ткани моллюсков; * различия достоверны по сравнению с другими видами.



6. Содержание восстановленного глутатиона в гепатопанкреасе, жабрах и мышечной ткани моллюсков; ** различия достоверны по сравнению с анадарой.

Установленное нами соотношение активности глутатионовых ферментов и уровня GSH у анадары предполагает высокую скорость оборота GSH. Следовательно, глутатионпероксидная система (ГПС) эффективно инактивирует пероксид водорода в ноге моллюска [6] и играет значительную роль в работе АО комплекса. Вероятно, глутатион не только участвует в указанных реакциях, но и накапливается в клетке, что связано с его способностью неферментативно обезвреживать АФК [5, 6]. Это согласуется и с низким уровнем ПОЛ в мышечной ткани анадары по сравнению с другими исследованными видами (см. рис. 1).

Высокий резерв глутатиона в ноге у анадары, возможно, обусловлен приспособлением моллюска к обитанию в условиях низкого содержания кислорода в среде. В тканях анадары наблюдается повышенный уровень свободных аминокислот [8], донором которых в гипоксических усло-

виях может служить GSH [6]. Более низкая активность ГП и уровень GSH в ноге мидии по сравнению с анадарой свидетельствует о меньшей эффективности ГПС у мидии.

Активность каталазы и СОД в мышечной ткани трех исследованных видов моллюсков понижалась в ряду: мидия — анадара — устрица. Достоверно более высокая активность СОД у мидии ($p \leq 0,05$), возможно, связана с тем, что у основания ее ноги находится железа, продуцирующая биссусную нить. В отличие от устрицы, которая «цементируется» к субстрату одной из створок, раковины мидий прикрепляются к субстрату нитями биссуса [10]. Представители лишь немногих групп двустворчатых моллюсков сохраняют работающую биссусную железу на протяжении всей жизни. Большинство таких форм ведёт малоподвижный или неподвижный образ жизни на твёрдых субстратах. Состоящие из коллагена биссусные нити постоянно обновляются [18], в разрушении коллагеновых волокон принимает участие супероксидный анион-радикал (СОАР), трансформацию которого осуществляет СОД [7].

Установлены четкие видовые различия по активности ГП в жабрах моллюсков (см. рис. 4). Максимальная активность фермента обнаружена в жабрах мидии, что больше, чем у анадары и устрицы соответственно в 2,6—7,1 раза ($p \leq 0,001$). При высокой активности ГП мидия имеет небольшой ресурс GSH, что определяет высокую скорость оборота этого тиола и его активную роль в поддержании работы ГП по расщеплению перекисидных соединений. Средние величины активности ГП, ГР и более высокий уровень GSH в жабрах анадары предполагают наиболее сбалансированное соотношение элементов ГПС и ее эффективное функционирование. В жабрах устрицы ГПС была наименее функционально активной. Об этом позволяет судить соотношение активности глутатион-зависимых ферментов: низкая активность ГП в сочетании с высокой активностью ГР.

В жабрах анадары активность ключевых АО ферментов — СОД и каталазы, была в 1,9—2,3 раза выше ($p \leq 0,05$), чем у мидии и устрицы, что подтверждает особый АО статус гемоглобинсодержащего моллюска (см. рис. 2—3). Различий в активности СОД и каталазы в жабрах мидии и устрицы не установлено.

При аноксии и гипоксии происходит рост интенсивности ПОЛ и компенсаторная активация ряда АО ферментов, в том числе СОД [12]. Очевидно, жабры анадары испытывают большую окислительную нагрузку, моллюск устойчив к гипоксии благодаря наличию каротиноидов и гемоглобина [15], который увеличивает кислородную емкость его гемолимфы по сравнению с мидией и устрицей. Повышенная активность СОД является соответствующим адаптивным механизмом против постгипоксического роста ПОЛ [12]. Вероятно, СОД и каталаза обеспечивают основную защиту жабр анадары, тем более, что активность ГП в этой ткани существенно ниже по сравнению с мидией.

В гепатопанкреасе мидии активность ГП и СОД была в 2—3 раза выше ($p \leq 0,05—0,01$), чем у анадары и устрицы, активность каталазы у мидии и анадары была одинаково высока и достоверно больше, чем у устрицы в 1,7 раза ($p \leq 0,05$). Повышенная активность ГП и СОД и более высокий уровень ПОЛ в гепатопанкреасе мидии по сравнению с анадарой и устрицей, по-видимому, свидетельствует об активации различных звеньев АО системы в ответ на

возрастающую окислительную нагрузку в период нереста. По активности ГП, СОД и каталазы устрица уступала двум другим видам в большинстве исследованных тканей.

Заключення

Таким образом, установлены видовые особенности системы АО защиты и уровня ПОЛ у трех видов черноморских моллюсков. Наибольшей окислительной нагрузкой характеризовались ткани мидии, имевшие в большинстве случаев максимальные величины АО показателей и самый высокий уровень ПОЛ. Среди исследованных тканей мидии основная роль в антиоксидантной защите принадлежит гепатопанкреасу, у анадары в этом процессе значительное участие принимают также жабры и нога. Активность ключевых АО ферментов СОД и каталазы в жабрах, а также ГП в мышечной ткани гемоглобинсодержащей анадары была вдвое выше, чем у мидии и устрицы. Содержание глутатиона в ноге анадары в 4 раза больше, чем у мидии. В большинстве тканей устрицы установлены низкие величины исследованных показателей, за исключением глутатионредуктазы, активность которой была в несколько раз выше, чем у других моллюсков. Степень участия в антиоксидантной защите различных тканей устрицы практически одинакова.

Вивчали показники антиоксидантної (АО) системи та перексидного окиснення ліпідів (ПОЛ) в тканинах чорноморських двостулкових молюсків з різними еколого-фізіологічними особливостями: мідії, анадари та устриці. Визначали активність глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, каталази та супероксиддисмутази, вміст відновленого глутатіону та ТБК-реакуючих продуктів. Тканини мідії мали в більшості випадків максимальні величини АО показників і найбільший рівень ПОЛ. Основна роль в антиоксидантному захисті мідії належить гепатопанкреасу, у анадари в цьому процесі значну участь беруть також жабра і нога. Активність супероксиддисмутази та каталази в жабрах і глутатіонпероксидази в м'язовій тканині анадари, яка містить гемоглобін, була вдвічі вища, ніж у мідії та устриці. Вміст глутатіону в нозі анадари у 4 рази більший, ніж у мідії. У більшості тканин устриці, порівняно з іншими видами, встановлено низькі величини досліджуваних показників, за винятком глутатіонредуктази.

The parameters of antioxidant (AO) system and lipid peroxidation (LP) in tissues of the Black Sea bivalve mollusks with different ecological and physiological characteristics — mussel, anadara and oyster — have been studied. The activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase, superoxide dismutase, content of reduced glutathione and TBA-reactive products have been determined. Mussel's tissues had the greatest values of antioxidant parameters in many cases and the highest level of TBA-products. Hepatopancreas has been found to have the main role in antioxidant defense of mussel, gills and foot have also been found to take part in this process in anadara. The activity of SOD and catalase in gills and glutathione peroxidase in muscle tissue of hemoglobin-containing anadara was two times higher than those of mussel and oyster. The content of glutathione in foot of anadara was four times higher than those of mussel. Comparing with other species in most tissues of oyster low values of parameters investigated have been found with the exception of glutathione reductase.

1. Бородина А.В., Нехорошев М.В., Солдатов А.А. Особенности состава каротиноидов тканей двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* Bruguiere // Доп. НАН України. — 2009. — № 5. — С. 186—190.
2. Головина И.В. Влияние неблагоприятных факторов среды на активность ферментов в тканях черноморских моллюсков // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія. — 2005. — Т. 4 (27). — С. 46—47.
3. Гостюхина О.Л., Солдатов А.А., Головина И.В. Влияние тетрадецилтри-метиламмоний бромида на состояние ферментативной системы антиоксидантной защиты тканей черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Доп. НАН України. — 2007. — № 11. — С. 147—151.
4. Довженко Н.В. Реакция антиоксидантной системы двустворчатых моллюсков на воздействие повреждающих факторов среды: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Владивосток, 2006. — 22 с.
5. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Успехи совр. биологии. — 1993. — Т. 113, вып. 4. — С. 456—470.
6. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // Биомед. химия. — 2009. — Т.55. — Вып. 3. — С. 255—277.
7. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи совр. биологии. — 1993. — Т. 113, № 4. — С. 442—455.
8. Солдатов А.А., Ангренко Т.И., Головина И.В., Столбов А.Я. Особенности организации тканевого метаболизма у моллюсков с различной толерантностью к внешней гипоксии // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. — 2010. — Т. 46, № 4. — С. 284—290.
9. Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Головина И.В. Состояние антиоксидантного ферментативного комплекса тканей черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. в условиях естественного окислительного стресса // Там же. — 2008. — Т. 44, № 2. — С. 150—155.
10. Холодов В.И., Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Выращивание мидий и устриц в Черном море / Под. ред. В. Н. Еремеева. — Севастополь, 2010. — 424 с.
11. Чикина М. В., Колючкина Г. А., Кучерук Н. В. Аспекты биологии размножения *Scapharca inaequalis* (Bruguiere) (Bivalvia, Arcidae) в Черном море // Экология моря. — 2003. — Вып. 64. — С. 72—75.
12. Cell and Molecular Response to Stress: Environmental Stressors and Gene Responses / Ed by J. M. Storey, K. B. Storey. — Elsevier Science, 2000. — Vol. 1. — 320 p.
13. Funes V., Alhama J., Navas J.I., Lyppez-Barea J., Peinado J. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral // Environ. Pollution. — 2006. — Vol. 139, Iss. 2. — P. 214—223.
14. Gorinstein S., Moncheva S., Katrich E. et al. Antioxidants in the black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as an indicator of Black Sea coastal pollution // Mar. Poll. Bull. — 2003. — Vol. 46. — P. 1317—1325.

15. Hourdez St., Weber R.E. Molecular and functional adaptations in deep-sea hemoglobins // J. Inorganic Biochem. — 2005 — Vol. 99. — P. 130—141.
16. Irato P., Piccinni E., Cassini A., Santovito G. Antioxidant responses to variations in dissolved oxygen of *Scapharca inaequivalvis* and *Tapes philippinarum*, two bivalve species from the lagoon of Venice // Mar. Pollut. Bull. — 2007. — Vol. 54, N 7. — P. 1020—1030.
17. Livingstone D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms // Ibid. — 2001. — Vol. 42, N 8. — P. 656—666.
18. Lucas J.M., Vaccaro E., Waite J.H. A molecular, morphometric and mechanical comparison of the structural elements of byssus from *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* // J. Exp. Biol. — 2002. — Vol. 205, N 12. — P. 1807—1817.
19. Niyogi S., Biswas S., Sarker S., Datta A.G. Antioxidant enzymes in brackish-water oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences // Sci. Tot. Environ. — 2001. — Vol. 281. — P. 237—246.
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., Pertica M., Livingstone D.R. Seasonal variations in the antioxidant defense systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels // Comp. Biochem. Physiol. — 1991. — Vol. 100 C. — P. 187—190.

Институт биологии южных морей
НАН Украины, Севастополь

Поступила 23.07.12