

О. Л. ГОСТЮХИНА, А. А. СОЛДАТОВ, И. В. ГОЛОВИНА,
А. Я. СТОЛБОВ

**АНТИОКСИДАНТНЫЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КОМПЛЕКС ТКАНЕЙ
РАЗЛИЧНЫХ ЦВЕТОВЫХ МОРФ ЧЕРНОМОРСКОГО МОЛЛЮСКА
MYTILUS GALLOPROVINCIALIS LAM.**

Исследовали состояние антиоксидантной (АО) системы и содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гепатопанкреасе, жабрах и ноге черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. Рассматривали 3 группы мидий – с черной и коричневой окраской раковины, а также с полосатой раковинной и депигментированными тканевыми структурами. Обнаружено, что депигментация тканевых структур обуславливает снижение активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ), падение уровня восстановленного глутатиона и усиление процессов ПОЛ. Наиболее выраженные различия зафиксированы в жабрах. Рассматриваются возможные механизмы, лежащие в основе выявленных различий.

Популяции черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. включают две основные цветовые морфы – с черной и коричневой окраской раковины, а также ряд промежуточных форм [4]. Предполагают, что цвет раковины может служить маркером комплекса генов, контролирующего ряд физиологических и биохимических процессов в организме моллюсков [3]. Установлено, что между 2 основными фенотипическими группами мидий существуют различия в темпах соматического роста тканей [14], в скорости образования и прочности биссусных нитей [3]. О различиях свидетельствуют и результаты гибридологического анализа [11], данные о составе изоферментного спектра неспецифических эстераз Est-2 и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы [10]. Вышеизложенное дает основание предполагать и наличие специфики в состоянии АО ферментативного комплекса тканей у разных цветовых морф черноморской мидии.

При анализе коллекторных популяций этих мидий в 2001 г. нами обнаружена немногочисленная группа особей с измененной окраской раковины и депигментированными тканевыми структурами [9]. Для этих моллюсков характерны полупрозрачная раковина с зеленовато-бурой окраской и радиальной полосатой исчерченностью, а также белый мантийный край, белая нога, слабо окрашенные жабры, гепатопанкреас. Депигментация тканей может встречаться у особей-альбиносов, а также в случае отсутствия или низкого содержания каротиноидов, что может быть следствием нарушения усвоения пигментов в процессе питания. Причины появления слабо выраженной окраски тканей и раковины у указанной группы мидий на данный момент не определены.

Каротиноидные пигменты являются важным звеном АО комплекса двустворчатых моллюсков, который в значительной мере определяет способность тканей противостоять окислительной нагрузке при сохранении функциональной полноценности клеточных структур. Каротиноиды придают тканям животных характерную пигментацию [2]. Согласно данным литературы, содержание данной группы соединений в организме фильтраторов в 5 – 6 раз превышает таковое у других систематических групп гидробионтов и является их специфической особенностью [1, 7, 15]. Значительное снижение содержания каротиноидов у депигментированных особей безусловно должно сказаться на состоянии всего АО комплекса тканей моллюсков и привести к качественным изменениям в его функционировании.

Целью настоящей работы явилось сравнение состояния АО ферментативного комплекса тканей у разных цветовых морф черноморской мидии.

Материал и методы. Объектом исследования служили взрослые особи *Mytilus galloprovincialis* Lam. одного срока оседания. Длина раковины составляла 50 – 60 мм.

© О. Л. Гостюхина, А. А. Солдатов, И. В. Головина, А. Я. Столбов, 2005

Животные были собраны одновременно в начале марта 2001 г. с коллекторных установок в бухте Казачья (район Севастополя, Черное море). В сравнительных исследованиях использовали три группы моллюсков – с полосатой, коричневой и черной окраской раковины. У особей первой группы пигментация тканей была слабо выражена, тогда как у двух других, напротив, была хорошо развита.

Образцы тканей гепатопанкреаса, жабр и ноги хранили в жидком азоте. Определяли активность следующих ферментов АО защиты клеток: глутатионпероксидазы (ГП) по накоплению окисленного глутатиона [12], глутатионредуктазы (ГР) по убыли НАДФН [12], супероксиддисмутазы (СОД) по восстановлению нитросинего тетразолия [12] и каталазы (КАТ) по снижению концентрации H_2O_2 [5]. Температура инкубационной среды поддерживалась на уровне $25,0 \pm 0,5^\circ C$. Одновременно оценивали содержание восстановленного глутатиона (GSH) [13], ТБК-активных продуктов [18] и белка [17] в тканях. Цифровой материал обработан с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты. Черная морфа. Наибольшее содержание ТБК-активных продуктов зафиксировано в ткани жабр – $1919,2 \pm 147,8$ мкмоль МДА mg белка $^{-1}$, что соответственно в 1,7 ($p \leq 0.01$) и 2,8 ($p \leq 0.001$) раза выше, чем в ткани гепатопанкреаса и ноги (табл. 1).

Таблица 1. Содержание ТБК-активных продуктов в тканях трех групп мидий *M. galloprovincialis* Lam.

Table 1. TBA-products content in the tissues of three group of mussel *M. galloprovincialis* Lam.

Тип ткани	ТБК-активные продукты, мкмоль МДА mg бел $^{-1}$					
	Черные		Коричневые		Депигментированные	
	n	M $\pm$ m	n	M $\pm$ m	n	M $\pm$ m
Гепатопанкреас	35	1101.7 $\pm$ 85.6	21	1161.7 $\pm$ 88.3**	9	1520.3 $\pm$ 148.3**
Жабры	29	1919.2 $\pm$ 147.8*	24	1678.3 $\pm$ 205.7	10	2819.3 $\pm$ 260.7*
Нога	34	693.3 $\pm$ 121.1	20	585.7 $\pm$ 84.9	12	607.3 $\pm$ 102.5

Примечание: n – число особей; * – отличия достоверны при $p < 0.01$; ** – отличия достоверны при $p < 0.05$

Тканевое распределение активности каталазы, инактивирующей H_2O_2 , было сходным со спецификой ГП: в гепатопанкреасе значение каталазной активности составило $4991,7 \pm 373$ ммоль H_2O_2 $min^{-1} mg$ бел $^{-1}$, что в 3,3 раза и в 9,0 раз ($p \leq 0.001$) превышает значения, зарегистрированные для жабр и ноги (рис. 1).

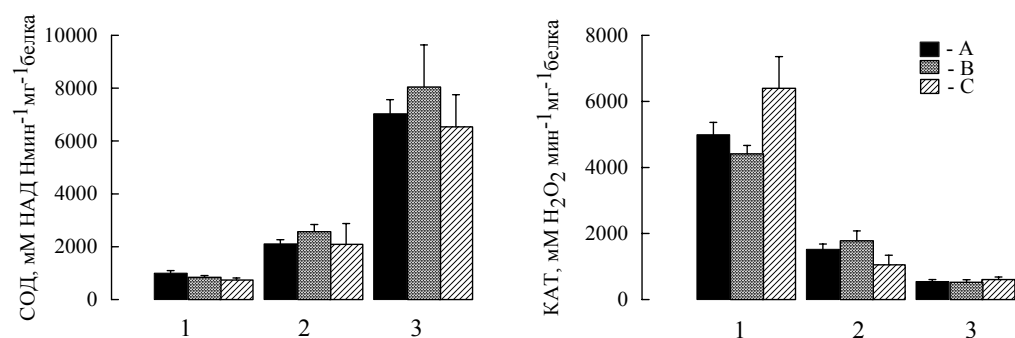


Рисунок 1. Активность СОД и каталазы в тканях трех групп мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. (A – черная морфа; B – коричневая морфа; C – депигментированные мидии; 1 – гепатопанкреас; 2 – жабры; 3 – нога)

Figure 1. SOD and catalase activity of the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. three groups (A – black morph; B – brown morph; C – depigmented mussels; 1 – hepatopancreas; 2 – gills; 3 – foot)

Распределение активности СОД, напротив, носило обратный характер. Максимальные значения были выявлены в ноге. В сравнении с жабрами и гепатопанкреасом различия составили соответственно 3,3 раза и 7,0 раз ($p \leq 0.001$) (рис. 1).

Состояние ГПС было функционально взаимосвязано с тканевым распределением продуктов ПОЛ. В жабрах на фоне максимальной окислительной нагрузки обнаружено наименьшее содержание GSH (рис. 2).

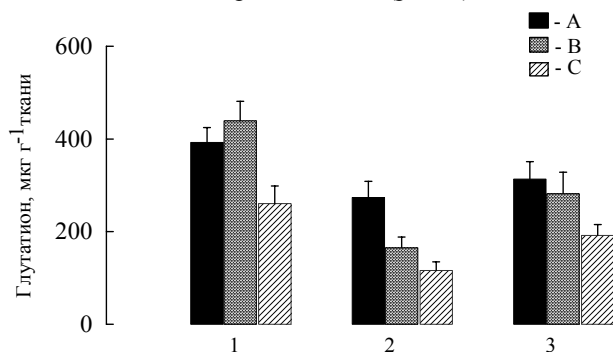
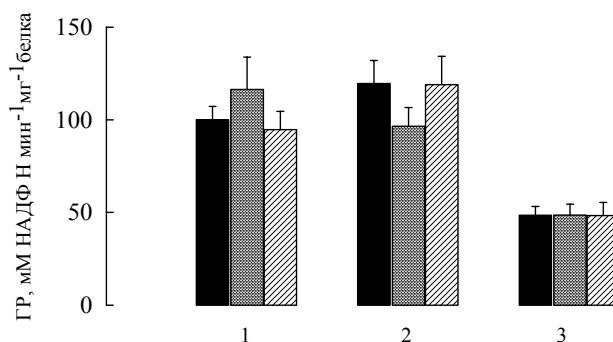
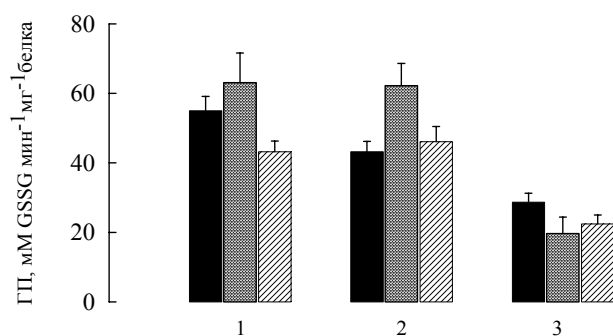


Рисунок 2. Особенности ГПС в тканях трех групп мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. (A – черная морфа; B – коричневая морфа; C – депигментированные мидии; 1 – гепатопанкреас; 2 – жабры; 3 – нога)

Figure 2. The particular features of GPS in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. three groups (A – black morph; B – brown morph; C – depigmented mussels; 1 – hepatopancreas; 2 – gills; 3 – foot)



При этом ферменты, сопряженные с ресурсом GSH, проявляли разную активность. ГП, непосредственно контактирующая с гидроперекисями, имела сходные значения активности в сравнении с другими тканями, тогда как активность ГР, осуществляющей ресинтез GSH, была наибольшей – $119,5 \pm 12,5$ мкмоль НАДФН мин⁻¹. Максимальный ресурс GSH отмечали в гепатопанкреасе – $392,6$ мкг г⁻¹. Он в 2,5 раза ($p \leq 0.05$) превышал значения, полученные для жабр, и на 31,2 % ($p \leq 0.05$), определенные для ноги. Данный уровень GSH был обусловлен высоко активной ГР – $100 \pm 7,2$ мкмоль НАДФН мин⁻¹ мг⁻¹ белка (рис. 2). В гепатопанкреасе обнаружена также максимальная активность ГП. Она была соответственно в 1,3 и в 1,9 раза выше, чем в жабрах ($p \leq 0.05$) и в ноге ($p \leq 0.001$).

Достаточно высокий ресурс глутатиона выявлялся в ноге моллюска, но при минимальных активностях ГР и ГП, что хорошо согласуется с низким уровнем ПОЛ в данной ткани.

Коричневая морфа. Тканевая специфика распределения активностей АО ферментов, а также уровней ТБК-активных продуктов и GSH у особей коричневой и черной

морф полностью совпадала (рис. 1, 2). Сравнение абсолютных значений регистрируемых показателей позволило установить статистически значимые различия на уровне ряда тканей: в жабрах коричневой морфы был выявлен более низкий уровень глутатиона, а в гепатопанкреасе пониженная активность ГП. Различия составили соответственно 39,6 и 27,3 % ($p \leq 0,05$). В остальных случаях значения контролируемых величин были близкими.

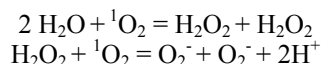
Депигментированные моллюски. Депигментированные ткани отличались наибольшим содержанием ТБК-активных продуктов (табл. 1). Наиболее заметные различия были выявлены на уровне жабр. В сравнении с моллюсками, имеющими черную и коричневую окраску раковины, уровень ТБК-активных продуктов у них был соответственно на 32,0 % ($p \leq 0,01$) и 40,5 % ($p \leq 0,001$) выше. Для гепатопанкреаса различия были выявлены только между депигментированными и черными мидиями и составили 27,5 % ($p \leq 0,05$). В ноге моллюсков уровень перекисных продуктов был близок у всех исследованных цветовых морф.

Депигментация тканевых структур затрагивала и ферментативный комплекс АО защиты клетки. В жабрах депигментированных животных на фоне максимальной интенсивности ПОЛ обнаружено наибольшее снижение защитного потенциала ключевых АО ферментов – СОД и каталазы (рис. 1). В сравнении с особями черной морфы, падение активности СОД составило 2,1 раза ($p \leq 0,01$), а каталазы – 1,8 раза ($p \leq 0,05$). В гепатопанкреасе и ноге различия между этими двумя группами были меньше и составили соответственно 1,6 ($p \leq 0,05$) и 1,4 раза ($p \leq 0,05$).

Характер пигментации тканевых структур оказывал заметное влияние и на состояние ГПС моллюсков. У депигментированных животных уровень глутатиона в тканях был существенно ниже (рис. 2). Наиболее ярко это проявлялось на уровне жабр, где накопление ТБК-активных продуктов было наибольшим. О величине снижения можно судить по сопоставлению результатов полученных для двух цветовых групп: черных и депигментированных. В жабрах различия между ними составили 2,4 раза ($p \leq 0,001$). В гепатопанкреасе и ноге отличия были менее выражены – 33,6 % ($p \leq 0,05$) и 38,8 % ($p \leq 0,01$) соответственно. Низкий уровень глутатиона в депигментированных тканях был сопряжен с высокой активностью ГП, что хорошо согласуется с величиной окислительной нагрузки в тканях. Например, на уровне жабр активность данного фермента была на 30,5 и 25,9 % ($p \leq 0,01$) выше у особей черной и коричневой цветовых морф. В отличие от ГП, активность ГР мало зависела от содержания пигмента в тканевых структурах моллюска. Имеющиеся различия не были статистически выражены.

Обсуждение. Результаты сравнительного анализа позволяют сделать вывод о том, что максимальные различия в функционировании АО системы обнаружены между особями с выраженной (черная и коричневая морфа) и слабой пигментацией тканей (депигментированные). Это выражалось в снижении ресурса восстановленного глутатиона, падении уровня активности СОД и каталазы, а также общей активизации процессов ПОЛ.

Пигментация тканей у *M. galloprovincialis* в основном определяется содержанием в них каротиноидов [1, 2, 15]. Эта группа соединений является одной из самых эффективных «ловушек» синглетного кислорода (1O_2) в 35 – 50 раз превосходящая связывающую способность α -токоферола [19]. Отсюда следует, что депигментация тканевых структур у ряда цветовых морф *M. galloprovincialis* должна сопровождаться ростом содержания в них 1O_2 . К процессам, обеспечивающим образование 1O_2 , можно отнести следующие реакции: Фентона, Габера-Вейса, спонтанной дисмутации, разложения H_2O_2 КАТ и ряд других. Данная форма активированного кислорода не является долгоживущей. Время ее существования составляет $10^{-6} - 10^{-12}$ с [8]. Однако, при отсутствии или низком содержании пигментов, нейтрализующих 1O_2 , это может приводить к накоплению в тканях более стабильных соединений - H_2O_2 и O_2^- :



Рост H_2O_2 и O_2^- может иметь ряд негативных последствий для ферментов АО защиты клетки. Известно инактивирующее действие H_2O_2 на СОД [6]. В настоящей работе эта ситуация действительно имела место. У животных с депигментированными тканевыми структурами активность СОД во всех изученных тканях была в 1,4 – 2,1 раза ниже. Низкая активность СОД в свою очередь предполагает увеличение содержания O_2^- в клетке, который должен подавлять активность КАТ [6]. Анализ активности данного фермента, проведенный в настоящей работе, позволил обнаружить подобное состояние. Как уже отмечалось, на уровне жабр активность КАТ у животных, не содержащих пигмента, была существенно ниже.

Свидетельством роста содержания в тканях депигментированных животных H_2O_2 явилось значительное снижение уровня GSH. В жабрах и гепатопанкреасе это происходило на фоне увеличения активности ГП. Следует отметить, что жабры моллюска являются наиболее чувствительной к среде тканью, что обусловлено их структурно-функциональными особенностями. Толщина жаберного эпителия незначительна [16]. Это является необходимым условием для полноценного газообмена между гемолимфой и мантийной жидкостью. Отсутствие защитных структур в эпителии жабр и объясняет наличие значительной окислительной нагрузки, которую они испытывают в сравнении с другими тканями.

Рост содержания активированных форм кислорода (${}^1\text{O}_2$, H_2O_2 , O_2^-) на фоне снижение ресурсов ферментативных систем АО защиты клетки должен сопровождаться усилением процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Сопоставление содержания ТБК-активных продуктов в тканях пигментированных и депигментированных животных подтвердило данную закономерность. У последних она была существенно выше.

Закключение. Депигментация тканевых структур у отдельных цветковых морф *Mytilus galloprovincialis* негативно влияет на состояние их ферментативной системы АО защиты клетки. Это выражается в снижении активности ключевых ферментов антирадикальной защиты СОД и КАТ, падении ресурса GSH и общей активизации процессов ПОЛ в тканях животных. Причину данного состояния, по-видимому, следует искать в низком содержании каротиноидов и, как следствие, неспособности тканей противостоять образованию ${}^1\text{O}_2$ и других активированных кислородных метаболитов.

1. Анцупова Л. В., Руснак Г. М. Каротиноиды мидий Одесского залива // Экология моря. – 1990. – Вып. 6. – С. 61 - 64.
2. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
3. Булатов К. В. Генетическая природа окраски раковин у черноморских мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. // ДАН УССР. – 1984. – Серия Б. - № 6. – С. 54 – 56.
4. Иванов В. Н., Холодов В. И., Сеничева М. И. и др. Биология культивируемых мидий. – Киев: Наук. думка, 1989. – 99 с.
5. Гири С. В. Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах // Лаб. диагностика. – 1999. - № 4. – С. 45 - 46.
6. Дубинина Е. Е., Шугалей И. В. Окислительная модификация белков // Усп. совр. биол. – 1993. – **113**, вып. 1. – 71 - 81.
7. Карнаухов В. Н. Биологические функции каротиноидов. - М.: Наука, 1988. – 240 с.
8. Меньшикова Е. Б., Зенков Н. К. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Усп. совр. биол. – 1993. – **113**, вып. 3. – С. 286 - 296.
9. Солдатов А. А., Александрова О. Л., Головина И. В., Столбов А. Я. Ферментативная система антиоксидантной защиты у черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. с пигментированными и депигментированными тканевыми структурами // Доп. НАН України. – 2003. - №5. – С. 162 – 166.
10. Столбова Н. Г., Ладыгина Л. В. Генетический полиморфизм мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. у берегов Крыма // Цитология и генетика. – 1994. – **28**, № 2. – 62 - 66.

11. Столбова Н. Г., Пиркова А. В., Ладыгина Л. В. Наследование цвета раковины у мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Цитология и генетика. – 1996. – **30**, № 6. – С. 62 – 65.
12. Переслегина И. А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Лаб. дело. – 1989. - № 11. – С. 20 - 23.
13. Путилина Ф. Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях // Методы биохим. исслед.- Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. – С. 183 - 186.
14. Щербань С. А. Особенности соматического и генеративного роста у некоторых цветовых морф мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Экология моря. – 2000. – Вып. 53. – С. 77 - 81.
15. Bjerkeng B., Hertzberg S., Liaaen-Jensen S. Carotenoids in food chain studies. Carotenoids of the bivalves *Modiolus modiolus* and *Pecten maximus* – structural, metabolic and food chain aspects // Comp. Biochem. Physiol. – 1993. – **106 B**, № 2. – P. 243 - 250.
16. Cui L., Liu C., Lu Y. et al. Studies on mussels gills // Shandong Fish. Qilu. Yuye. – 1996. – **13**, № 5. – P. 11 - 14.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**. - № 266. - P. 75.
18. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Analyt. Biochem. – 1979. – **95**, № 1. – P. 351 - 358.
19. Shimidzu N., Goto M., Miki W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms // Fisheries Science. – 1996. – **62**, № 1. – P. 134 - 137.

Институт биологии южных морей НАН Украины,
г. Севастополь

Получено 25.06.2005

O. L. GOSTYUKHINA, A. A. SOLDATOV, I. V. GOLOVINA,
A. Ya. STOLBOV

ANTIOXIDANT ENZYME SYSTEM OF DIFFERENT COLOUR MORPHS TISSUES OF BLACK SEA MUSSEL *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM.

Summary

The state of enzyme antioxidant system and lipid peroxidation (LP) content were investigated in the hepatopancreas, gills and foot of Black Sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. It was examined 3 mussel group: black, brown and depigmented species. It was found the superoxiddismutase and catalase activities decreasing, glutathione reduced level declining and the LP intensity increasing were caused by depigmentation of tissues. More significant distinctions were marked in gills. It was supposed that there were some possible molecular mechanisms, which form basis for antioxidant system particularities found.