

О. Л. АЛЕКСАНДРОВА, А. А. СОЛДАТОВ, И. В. ГОЛОВИНА

**ОСОБЕННОСТИ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДНОЙ СИСТЕМЫ В ТКАНЯХ
ДВУХ ЦВЕТОВЫХ МОРФ ЧЕРНОМОРСКОЙ МИДИИ
MYTILUS GALLOPROVINCIALIS LAM.**

Исследовали содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состояние глутатионпероксидной системы (ГПС) в гепатопанкреасе, жабрах и ноге черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. Учитывали две цветовые морфы - черную и коричневую. В ходе исследования выявлена тканевая специфика состояния ГПС и установлена ее зависимость от уровня продуктов ПОЛ. Показано, что наибольшую окислительную нагрузку испытывают жабры. На данном тканевом уровне между моллюсками с разной окраской раковины обнаружены достоверные различия в уровнях активности глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР).

Глутатионпероксидная система является важнейшей составляющей АО системы клеток. Она адаптирована к разрушению низких концентраций перекисных продуктов и поэтому чувствительна к изменению состояния организма моллюска. ГПС представлена группой ферментов: глутатионпероксидазой (ГП), глутатионредуктазой (ГР) и глутатионтрансферазой (ГТ), сопряженных с ресурсом восстановленного глутатиона (GSH) в клетке [3]. Отмечены выраженные реакции ГПС тканей представителей рода *Mytilus* при повышении содержания в воде тяжелых металлов [12, 17], нефтяных и ароматических углеводородов [18], а также в условиях аноксии [14] и при старении моллюсков [11]. Все это дает возможность рассматривать ферменты ГПС как один из чувствительных биохимических индексов, позволяющих диагностировать негативные изменения состояния морской среды на самых ранних этапах их развития.

Сведения о состоянии ГПС тканей у *M. galloprovincialis* ограничены. Имеется информация об активности ГР и уровне GSH в гепатопанкреасе, мышцах ноги и гонадах [7]. Данные об активностях терминальных ферментов (ГП и ГТ) фактически отсутствуют. Необходимо также отметить, что популяции черноморской мидии неоднородны. Различают две основные цветовые морфы - с черной и коричневой окраской раковины, а также ряд промежуточных форм, населяющих различные биотопы [1, 2]. Предполагают, что цвет раковины может служить маркером комплекса генов, контролирующего ряд физиологических и биохимических процессов в организме моллюска. Показано, что между данными фенотипами существуют различия в скорости образования и прочности бисусных нитей [2], темпах соматического роста тканей [10]. Об этом свидетельствуют результаты гибридологического анализа [9], данные о различиях в составе изоферментного спектра неспецифических эстераз Est-2 и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы [8]. Это дает основание предположить и существование особенностей в состоянии ГПС тканей мидий, что важно для выявления наиболее чувствительных объектов биоиндикации.

Целью настоящей работы является сравнение состояния ГПС тканей двух цветовых морф черноморской мидии в естественных условиях.

Материал и методы. Работа выполнена на взрослых особях черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. одного срока оседания. Моллюсков собирали с коллекторных установок в бухте Казачья (район Севастополя, Черное море) в начале марта 2001 г. С целью снятия состояния стресса, вызванного отловом и транспортировкой, животных размещали в проточных аквариумах объемом 2,5 - 3,0 м³ на 2 - 4 суток. Для анализа отбирали особей в состоянии относительного физиологического покоя - III-IV стадия зрелости гонад. Учитывали две цветовые морфы - с черной и коричневой окраской раковины, длина которой составляла 50 - 60 мм.

Препарирование мидий и подготовку к хранению производили на холоду при температуре 4°С. У животных вычленили гепатопанкреас, жабры и ногу, которые затем упаковывали в фольгу и замораживали в жидком азоте.

Ткани гомогенизировали вручную с помощью стеклянного гомогенизатора Поттера. В качестве трансформирующих сред применяли 1,15 % раствор KCl и 5 % раствор

НРО₃. Гомогенаты в дальнейшем подвергали центрифугированию при 6000 об/мин⁻¹ в течение 15 мин. В работе использовали рефрижераторную центрифугу К-23D (Германия). Все процедуры выполняли на холоду (4°C).

В тканях моллюска определяли следующие показатели: активность ГП, ГР, содержание восстановленного глутатиона (GSH), ТБК-активных продуктов и белка.

Активность ГП оценивали по методу [4]. В состав реакционной среды входили 1 мл 0,3 М фосфатного буфера (pH 7,4), включающего 12 мМ азид натрия и 6 мМ ЭДТА, 0,5 мл 2,5 мМ восстановленного глутатиона, 0,5 мл 1,8 мМ H₂O₂, 2 - 200 мкл KCl-супернатанта ткани. Запуск реакции осуществляли внесением перекиси водорода и останавливали через 2 мин добавлением 1 мл 10 % ТХУ. После центрифугирования при 3000 об/мин⁻¹ в течение 15 мин определяли экстинкцию окисленного глутатиона при длине волны 260 нм. Активность ГП выражали в мкМ GSSG мин⁻¹ мг⁻¹ белка.

Для определения активности ГР использовали реакционную среду, содержащую 2 мл 0,05 М фосфатного буфера (pH 8,0), 0,2 мл 1 мМ ЭДТА, 0,5 мл 7,5 мМ GSSG, 0,1 мл 1,2 мМ НАДФН, 0,1-0,4 мл KCl-супернатанта ткани. Активность фермента определяли по убыли НАДФН в течение 5 мин при длине волны 340 нм и выражали в мкМ НАДФН мин⁻¹ мг⁻¹ белка [4]. Температура инкубационной среды поддерживалась на уровне 25,0 ± 0,5°C.

Содержание восстановленного глутатиона оценивали в супернатантах, приготовленных на основе 5 % НРО₃ по реакции с аллоксановым реактивом [5]. Фотометрирование проводили при длине волны 305 нм. Уровень GSH выражали в мг г⁻¹ ткани.

Количество ТБК-активных продуктов в тканях определяли по методу [16]. Полученные результаты выражали в мкМ малонового диальдегида (МДА) мг⁻¹ белка. Содержание белка контролировали по Лоури [15]. Все измерения выполнены на СФ-26.

Цифровой материал обработан с использованием t-критерия Стьюдента [6]. Результаты в таблицах представлены как M ± m.

Результаты. Анализ уровня ПОЛ в тканях мидий черной морфы показал, что максимальное содержание конечных (ТБК-активных) продуктов было обнаружено в жабрах и составляло 1446,3 ± 133,9 мкМ МДА мг⁻¹ белка, что в 1,64 раза и в 2,23 раза превышало соответствующие показатели в ткани гепатопанкреаса и ноги (p < 0,001). Минимальный уровень ТБК-активных продуктов был выявлен в ткани ноги (табл. 1).

Подобное распределение перекисных продуктов коррелировало с состоянием ГПС тканей черных мидий. В жабрах на фоне максимального уровня ТБК-активных продуктов отмечено сравнительно низкое содержание GSH, что практически совпадало с таковым в ткани ноги. При этом в гепатопанкреасе зафиксирован высокий уровень GSH, превышающий таковой в других тканях моллюска в 2,5 - 2,6 раза (p < 0,001).

Сравнительная оценка тканевых особенностей активности ГР у моллюсков черной морфы показала наличие выраженной тканевой специфики. В жабрах было обнаружено максимальное значение активности данного фермента, которое составляло 139,9 ± 17,9 мкМ НАДФН мин⁻¹ мг⁻¹ белка, что в 1,7 раза превышало активность ГР в гепатопанкреасе (p < 0,001) и в 3,2 раза - в ноге (p < 0,001). Различия между тканями гепатопанкреаса и ноги также были достоверны при p < 0,001 (табл. 1).

В уровнях активности ГП в тканях черных мидий выраженных различий не обнаружено.

Распределение перекисных продуктов в тканях мидий коричневой морфы имело особенности, сходные с таковыми у особей черной морфы. Ткань жабр характеризовалась максимальным содержанием ТБК-активных продуктов - 1412,2 ± 234,2 мкМ МДА мг⁻¹ белка. В отличие от особей черной морфы различий между жабрами и гепатопанкреасом обнаружено не было. В ноге было отмечено минимальное содержание ТБК-активных продуктов. В сравнении с жабрами значения данного показателя были в 2,2 раза ниже (p < 0,05) (табл. 2).

Состояние ГПС в тканях моллюсков коричневой морфы в целом имело особенности, сходные с таковыми у особей с черной раковиной, за исключением жабр, где обнаружены выраженные различия в активностях ферментов (табл. 1, 2).

Таблица 1. Показатели ГПС и уровня ТБК-активных продуктов у мидий черной морфы
Table 1. Characters of GPS and TBA-active products in the mussels tissues of black morph

Параметры	Черная морфа		
	Гепатопанкреас	Жабры	Нога
Содержание ТБК-активных продуктов (мкМ мг ⁻¹ белка)	883.1±59.0 n=19	1446.3±133.9 n=19	648.9±134.1 n=15
Активность ГП (мМ GSSG мин ⁻¹ мг ⁻¹ белка)	39.3±4.3 n=16	40.5±3.9 n=13	32.4±5.4 n=13
Активность ГР (мкМ НАДФН мин ⁻¹ мг ⁻¹ белка)	83.2±7.4 n=17	139.9±17.9 n=14	43.4±4.3 n=14
Содержание GSH (мкг г ⁻¹ ткани)	384.8±56.8 n=16	154.8±18.4 n=15	147.2±25.9 n=15

Примечание: n – число особей

Сравнительная оценка активности ГП в тканях коричневых мидий показала наличие выраженной тканевой специфики фермента. По сравнению с гепатопанкреасом и ногой значения данного показателя в жабрах были выше соответственно в 1,6 раза и в 2,1 раза ($p < 0,001$).

Таблица 2. Показатели ГПС и уровня ТБК-активных продуктов у мидий коричневой морфы
Table 2. Characters of GPS and TBA-active products in the mussels tissues of brown morph

Параметры	Коричневая морфа		
	Гепатопанкреас	Жабры	Нога
Содержание ТБК-активных продуктов (мкМ мг ⁻¹ белка)	1123.2±223.0 n=15	1412.2±234.2 n=14	632.6±180.6 n=9
Активность ГП (мкМ GSSG мин ⁻¹ мг ⁻¹ белка)	33.3±2.2 n=15	52.3±5.5 n=15	25.1±2.6 n=10
Активность ГР (мМ НАДФН мин ⁻¹ мг ⁻¹ белка)	82.5±3.8 n=16	80.7±13.5 n=16	38.8±6.8 n=12
Содержание GSH (мкг г ⁻¹ ткани)	409.7±64.4 n=16	171.2±36.0 n=13	130.0±24.2 n=10

Примечание: то же, что и в таблице 1.

Характер распределения активности ГР в тканях мидий коричневой морфы отличается от такового у животных черной морфы. Уровни активности ГР практически совпадали в гепатопанкреасе и жабрах, при этом значение данного показателя в ноге были в 2,1 раза меньше значений в остальных тканях ($p < 0,001$).

Сравнительный анализ состояния ГПС и ПОЛ у животных двух цветовых морф в целом не выявил значительных отличий. Отмечено совпадение уровней ТБК-активных продуктов и глутатиона в исследуемых тканях, а также активностей ГП и ГР в ткани гепатопанкреаса и ноги. Достоверные различия в активностях ферментов выявлены в жабрах. У моллюсков черной морфы активность ГР в 1,7 раза ($p < 0,001$) превышала таковую у коричневых особей, тогда как активность ГП, напротив, была существенно ниже. В последнем случае различия составляли 1,3 раза ($p < 0,001$) (табл. 1, 2).

Обсуждение. Высокий уровень ТБК-активных продуктов в жабрах может быть обусловлен структурно-функциональными особенностями данной ткани. Известно, что толщина жаберного эпителия незначительна [13]. 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 испытывает данная ткань.

Содержание ТБК-активных продуктов имело выраженную корреляцию с состоянием ГПС. Сравнительный анализ тканевых особенностей содержания восстановленного глутатиона и активностей GSH-зависимых ферментов позволил установить степень окислительной нагрузки в исследуемых тканях мидий. В жабрах моллюсков был обнаружен сравнительно низкий уровень GSH при максимальной активности ГП и ГР. Это свидетельствует о высокой скорости оборота GSH и отражает степень окислительного стресса в данном виде ткани. В гепатопанкреасе на фоне максимального содержания GSH отмечены средние значения активности ферментов при сравнительно невысоком уровне ТБК-активных продуктов. Это означает, что процессы ПОЛ в данной ткани протекают с меньшей интенсивностью, чем в жабрах. Последнее обусловлено тем, что контакт гепатопанкреаса со средой носит опосредованный характер и определяется содержанием ТБК-активных продуктов в гемолимфе. Нога, напротив, имела низкий уровень ТБК-активных продуктов, GSH и активности ГП и ГР. Это отражает минимальную интенсивность процессов свободно-радикального окисления (СРО) в данной ткани.

Сопоставление показателей ГПС у особей двух цветовых морф обнаружило достоверные различия в уровнях активности ГП и ГР в жабрах. Для мидий черной морфы была характерна высокая активность ГР, а для моллюсков с коричневой окраской раковины – максимальная активность ГП. Эти различия позволяют предположить, что метаболизм GSH в жабрах черных мидий протекает с преобладанием процессов его ресинтеза. Обмен глутатиона в жабрах особей коричневой морфы, напротив, направлен в сторону его активной утилизации в процессах АО защиты клеток. Такая стратегия обмена GSH в тканях моллюсков данного фенотипа мало перспективна, так как в условиях окислительного стресса ресурс глутатиона может быть быстро исчерпан. ГПС же особей черной морфы, исходя из особенностей ее организации, способна поддерживать уровень GSH в течение более продолжительного времени и обеспечивать тем самым устойчивость организма моллюска к условиям окислительной нагрузки.

Интенсивность процессов СРО в тканях мидий в значительной мере определяется кислородным режимом местообитания животных. Известно, что исследуемые цветовые морфы способны населять различные экотопы. Особи коричневого фенотипа часто встречаются на илистых грунтах (низкое PO_2), а черного фенотипа – преобладают в прибойной зоне (высокое PO_2) [1, 2]. Различия в напряжении кислорода в среде не могут не отразиться на состоянии ГПС их тканей. В настоящей работе это выразилось в несопадении активностей ГП и ГР жабр животных этих фенотипических групп. В связи с этим, по нашему мнению, перспективным является изучение изоферментного спектра этих ферментов с целью установления более глубоких генетических различий у моллюсков данных цветовых морф.

Выводы. 1. Наибольшей окислительной нагрузке в естественных условиях подвержена ткань жабр у мидий обеих цветовых морф. 2. Уровень перекисных продуктов имеет положительную корреляцию с состоянием ГПС в тканях животных. 3. Между моллюсками с разной окраской раковины установлены выраженные различия в уровнях активности ГП и ГР в ткани жабр, что обусловлено особенностями функционирования ГПС у этих двух групп черноморской мидии.

Авторы выражают глубокую признательность Г.С. Минюк, О. А. Шахматовой (ИнБЮМ НАН Украины) и В.С. Мартынюку (ТНУ, Симферополь) за содействие в работе и поддержку.

1. Булатов К.В. Генетическая природа окраски раковин у черноморских мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. // ДАН УССР. – 1984. – Серия Б. - № 6. – С. 54 – 56.
2. Иванов В.Н., Холодов В.И., Сеничева М.И. и др. Биология культивируемых мидий. – Киев: Наук. думка, 1989. – 99 с.
3. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Биологическая роль глутатиона // Усп. совр. биол. -1990. – 110, вып. 1. – С. 20 – 33.
4. Переслегина И.А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Лаб. дело. – 1989. - № 11. – С. 20 – 23.
5. Путилина Ф.Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях / Методы биохим. исслед. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. – С. 183 – 186.

6. Рокицкий П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов. – Минск: Изд-во БелГУ, 1961. – 221 с.
7. Руднева-Тимова И.И. Соотношение процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности в тканях черноморской мидии // Гидробиол. журн. – 1996. – 32, № 5. – С. 50 – 57.
8. Столбова Н.Г., Ладыгина Л.В. Генетический полиморфизм мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. у берегов Крыма // Цитология и генетика. – 1994. – 28, № 2. – 62 – 66.
9. 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.
10. Щербань С.А. Особенности соматического и генеративного роста у некоторых цветовых морф мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Экология моря. – 2000. – Вып. 53. – С. 77 – 81.
11. Canesi L., Viarengo A. Age-related differences in glutathione metabolism in mussel tissues (*Mytilus edulis* L.) // Comp. Biochem. Physiol., B 1997. – 116B, № 2. – P. 217 – 221.
12. Canesi L., Viarengo A., Leonzio C. et al. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues // Aquat. Toxicol. – 1999. – 46, № 1. – P. 67 – 76.
13. Cui L., Liu C., Lu Y. et al. Studies on mussel's gills // Shandong Fish. Qilu. Yuye. – 1996. – 13, № 5. – P. 11 – 14.
14. Isami G., Serra R., Cattani O. et al. Adenylate energy charge and metallothionein as stress indices in mussels exposed to anoxia // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. – 1997. – 77, № 4. – P. 1187 – 1197.
15. 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.
16. 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.
17. Regoli F., Principato G. Glutathione, GSH-dependent and antioxidant enzymes in mussel, exposed to metals under field and laboratory conditions // Aquat. Toxicol. – 1995. – 31, № 2. – P. 143 – 164.
18. Sole M., Porte C., Albaiges J. The use of biomarkers for assessing the effects pollution in mussels // Sci. Total. Environ. – 1995. – 159, № 2 – 3. – P. 147 – 153.

Институт биологии южных морей НАНУ,
г. Севастополь

Получено 20.10.2001

O.L. ALEXANDROVA, A.A. SOLDATOV, I.V. GOLOVINA

GLUTATHIONE PEROXIDE SYSTEM CHARACTERS IN TWO COLOUR MORPHS TISSUES OF BLACK SEA MUSSEL *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM.

Summary

Lipid peroxidation (LP) products contents and glutathione peroxide system (GPS) status in the hepatopancreas, gills and foot of Black Sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. were investigated. Two colour morphs were considered (black and brown). During the research tissue particularities of GPS status and correlation between GPS status and LP level had been found. It was shown that the gills were influenced by maximal oxidative load. In gill tissues valid differences between glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in mussel of two colour morphs were found.