

УДК 577.121:594.1 (262.5)

О. Л. Гостюхина, И. В. Головина

**ТКАНЕВЫЕ ОСОБЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ
СИСТЕМЫ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА
ANADARA INAEQUIVALVIS**

Изучали тканевую специфику показателей антиоксидантной (АО) системы и перекисного окисления липидов (ПОЛ) черноморского двустворчатого моллюска *Anadara inaequivalvis*. Наибольшая активность глутатионпероксидазы и высокое содержание глутатиона при низком уровне ТБК-активных продуктов установлено в ноге анадары. В гепатопанкреасе моллюска наблюдалась максимальная интенсивность ПОЛ и более высокая по сравнению с ногой активность глутатионредуктазы, каталазы и супероксиддисмутазы. Среди исследованных тканей жабры имели максимальную активность большинства ферментов АО системы и самое низкое содержание глутатиона.

Ключевые слова: антиоксидантный комплекс, перекисное окисление липидов, тканевые особенности, двустворчатые моллюски, *Anadara inaequivalvis*, Черное море.

Двустворчатый моллюск *Anadara inaequivalvis* Bruguiere, проникший в Черное море из Средиземного в начале 1980-х годов, в настоящее время завершил колонизацию Азово-Черноморского бассейна [2]. Анадара — эврибионтный вид, способный переносить длительное голодание, гипоксию, аноксию, распреснение воды до 10—12‰ и значительные колебания температуры [1, 2, 4, 9]. Интенсивность потребления кислорода вселенцем в условиях нормоксии в 6—7 раз меньше по сравнению с характерной для черноморской фауны мидией *Mytilus galloprovincialis* Lam. [9]. Перечисленные факты дают основание предполагать наличие отличительных черт в организации биохимических систем, обеспечивающих защиту тканей от действия неблагоприятных факторов среды. Одной из таких систем является антиоксидантный (АО) комплекс, который во многом определяет адаптационные возможности моллюсков [5, 8, 10, 11, 17]. Для *A. inaequivalvis* установлены особенности белкового и углеводного обмена в тканях [1, 4, 9], выявлен качественный и количественный состав каротиноидов [3]. Исследование параметров АО комплекса и перекисного окисления липидов (ПОЛ) черноморской анадары ранее не проводилось, что определило цель настоящей работы.

© Гостюхина О. Л., Головина И. В., 2012

Материал и методика исследований. Исследовали половозрелых особей анадары *A. inaequalvis* с длиной раковины 30—33 мм. Моллюсков собирали в марте 2009 г. в районе пос. Кацивели (Южный берег Крыма), после сбора и транспортировки выдерживали в аквариумах с проточной морской водой в течение 2—3 сут, температура в которых была такой же, как в море.

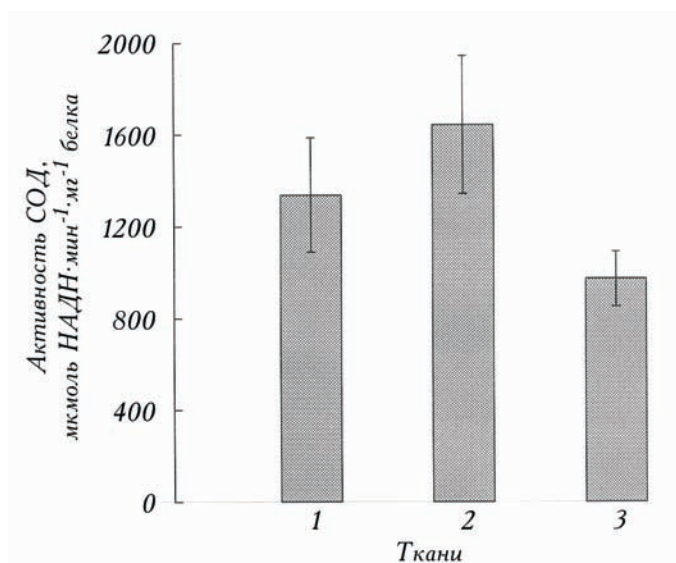
Процедуры по выделению и обработке образцов тканей проводили на холоде. Гомогенаты гепатопанкреаса, жабр и ноги центрифугировали при 3200 g в течение 15 мин в рефрижераторной центрифуге K-23D (Германия). В работе использовали методы определения активности АО ферментов, уровня GSH и содержания продуктов ПОЛ, описанные ранее [8]. Интенсивность процессов ПОЛ оценивали по количеству ТБК-активных продуктов (реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой) в гомогенатах тканей. В цитоплазме измеряли активность глутатионпероксидазы (ГП, КФ 1.11.1.9) по накоплению окисленного глутатиона (GSSG), глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) — по убыли НАДФН, каталазы (КФ 1.11.1.6) — по реакции с молибдатом аммония, супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) — по реакции с тетразолиевым нитросиним. Уровень восстановленного глутатиона (GSH) измеряли по образованию комплекса с аллоксановым реактивом. Содержание белка определяли методом Лоури. Активность ГП выражали в мкмольх GSSG за 1 минуту на 1 мг белка, ГР — в мкмольх НАДФН за 1 минуту на 1 мг белка, каталазы — в мкмольх H₂O₂ за 1 минуту на 1 мг белка. Содержание глутатиона выражали в мкг на 1 г сырой ткани, ТБК-активных продуктов — в мкмольх на 1 г сырой ткани. Измерения экстинкции проводили на спектрофотометре СФ-26 в сантиметровой кварцевой кювете объемом 3 мл. Активность ферментов определяли при стандартной температуре 25°C.

Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Отличия считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$, результаты представлены в виде $M \pm m$. Нормальность распределения оценивали путем сопоставления значений средней арифметической и моды. Количество выборочных совокупностей составило 10—11 особей.

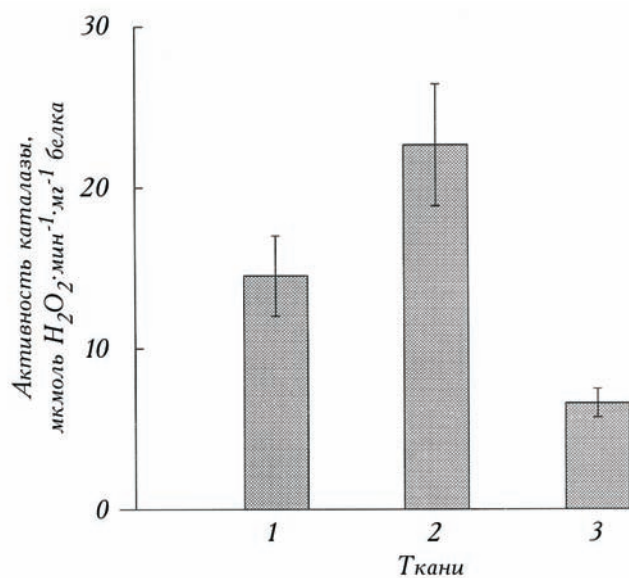
Результаты исследований и их обсуждение

Среди исследованных тканей нога анадары характеризовалась максимальным содержанием глутатиона, наиболее высокой активностью ГП и низким уровнем ТБК-активных продуктов, минимальной активностью ГР, каталазы и СОД (рис. 1—6). Содержание восстановленного глутатиона в ноге было $871,9 \pm 176,2$ мкг·г⁻¹ ткани, что выше по сравнению с жабрами и гепатопанкреасом соответственно в 2,2—4,0 раза ($p \leq 0,01$). Активность ГП в ноге составила $21,1 \pm 2,7$ мкмоль GSSG·мин⁻¹·мг⁻¹ белка, что в 2,5 раза ($p \leq 0,01$) больше, чем в гепатопанкреасе.

Высокая активность ГП и большое количество глутатиона в ноге *A. inaequalvis* предполагает значительную скорость оборота этого соединения и активное участие в процессе инактивации гидроперекисей. Низкая активность ГР в сочетании с высоким уровнем глутатиона, поддержание которого и обеспечивает данный фермент, вероятно, связана с особенностями углеводного метаболизма моллюска. Известно, что глюкоза является исходным



1. Активность супероксиддисмутазы в тканях анадара. Здесь и на рис. 2—6: 1 — гепатопанкреас; 2 — жабры; 3 — нога.



2. Активность каталазы в тканях анадара.

метаболизмом в пентозофосфатном пути окисления углеводов, ведущем к образованию НАДФН — энергетического эквивалента для ГР при восстановлении окисленной формы глутатиона. По сравнению с мидией уровень глюкозы в ноге анадара значительно ниже [9], что может приводить к снижению уровня НАДФН, и, как следствие, к более низкой активности ГР. Возможно, у моллюска в таких условиях имеются дополнительные механизмы восстановления GSH или его синтеза *de novo*.

Анадара — подвижный моллюск, способен активно перемещаться и зарываться в грунт [2]. Интенсивность метаболизма в ткани ноги анадара выше, чем у мидии [4, 10]. Содержание каротиноидов в ноге анадара больше, чем в гепатопанкреасе и жабрах [3]. Кроме того, в отличие от других черноморских моллюсков, вселенец имеет эритроцитарный гемоглобин,

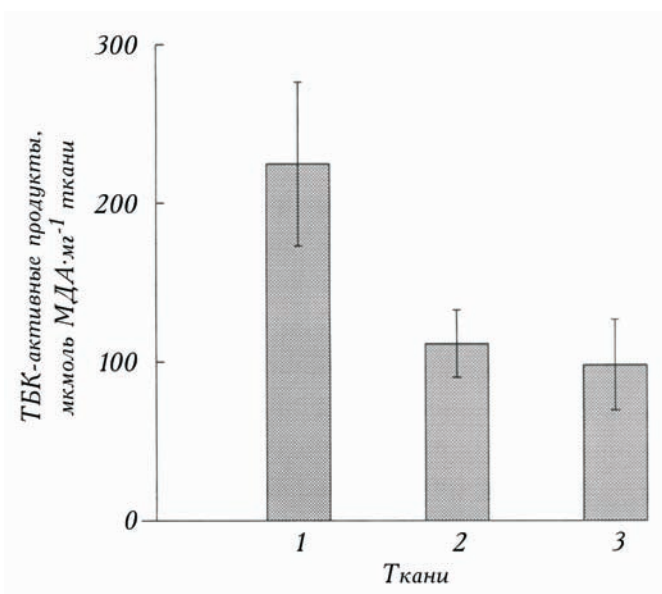
обеспечивающий более высокую кислородную емкость его гемолимфы [14]. Вероятно, окислительная нагрузка активировала компоненты АО комплекса, в частности ГП и GSH, которые участвуют в утилизации пероксида водорода и различных гидроперекисей. Об эффективном обезвреживании этих соединений в ноге анадара свидетельствует и низкий уровень ТБК-активных продуктов. Минимальная активность СОД и каталазы позволяет

предположить, что концентрация пероксида водорода и супероксидного радикала в ноге была невысока, а ведущая роль в антиоксидантной защите принадлежала глутатионовой системе (ГП, ГР, GSH).

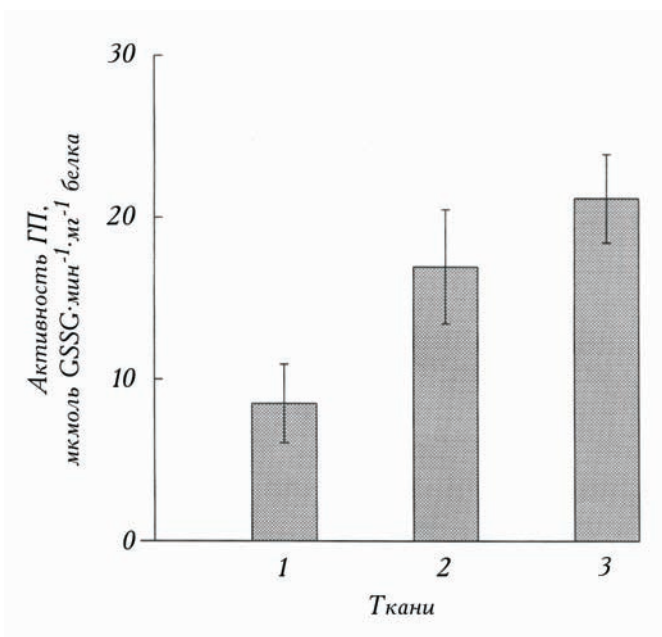
Гепатопанкреас анадары выделялся высоким содержанием ТБК-активных продуктов: $224,44 \pm 51,67$ мкмоль МДА·г⁻¹ сырой ткани. Это превышало значения данного показателя в ноге и жабрах моллюска в 2,0—2,3 раза ($p \leq 0,05$). Активность ГР и каталазы в гепатопанкреасе была соответственно в 1,9—2,2 раза выше ($p \leq 0,05—0,01$), чем в ноге, но достоверно не отличалась от таковой в жабрах. Активность ГП была низкой. По содержанию глутатиона и активности СОД гепатопанкреас занимал промежуточное положение среди исследованных тканей.

Небольшая активность ГП в гепатопанкреасе анадары сопровождалась высокой активностью ГР и уровнем GSH. Подобное соотношение величин глутатионпероксидазы в тканях анадары со-

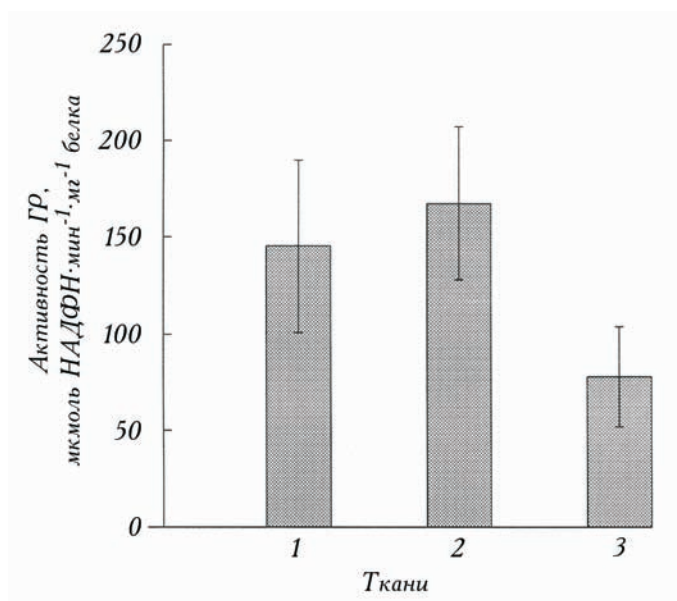
провождалась высокой активностью ГР и уровнем GSH. Подобное соотношение величин глутатионпероксидазы свидетельствует о малоэффективной работе ГП. Возможно, в целом эта система обеспечивала накопление GSH и поддержание его резерва на достаточном уровне, необходимом для самостоятельного АО действия глутатиона [6]. Основная роль в защите гепатопанкреа-



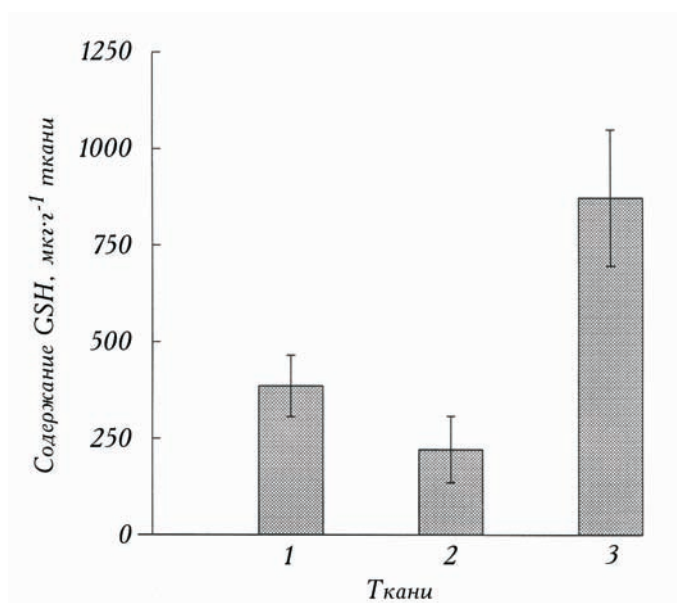
3. Содержание ТБК-активных продуктов в тканях анадары.



4. Активность глутатионпероксидазы в тканях анадары.



5. Активность глутатионредуктазы в тканях анадары.



6. Содержание восстановленного глутатиона в тканях анадары.

са, очевидно, принадлежала каталазе и СОД, проявлявших высокую активность, что согласуется и с максимальным уровнем ПОЛ. Вероятно, СОД и каталаза в гепатопанкреасе осуществляют последовательную инактивацию высоких концентраций супероксидного радикала и образующегося затем пероксида водорода, а глутатионовая система активируется на стадиях удаления низких концентраций перекисных продуктов.

Повышенный уровень процессов ПОЛ в гепатопанкреасе связан с интенсивно протекающими процессами распада и синтеза белков, липидов и других соединений [18]. Доля полиненасыщенных жирных кислот — преимущественных субстратов ПОЛ, в составе жирных кислот гепатопанкреаса достигает 70% [16, 19]. В нем установлен высокий уровень эндогенной генерации активных форм кислорода (АФК) [15], постоянно происходит

трансформация и детоксикация веществ, а также атрофия и разрушение гепатоцитов в результате повреждающего действия ксенобиотиков [16, 20], аккумулируя последние, гепатопанкреас сохраняет способность к полноценному функционированию. Для него характерна эффективная АО защи-

та [13, 16, 20] и высокая активность ферментов биотрансформации, которые предохраняют АО ферменты от окислительной деструкции [12]. В гепатопанкреасе содержится много каротиноидов [3, 5, 7], которые дополняют функционирование ферментативного звена АО системы.

Величина исследованных АО показателей гепатопанкреаса анадары была средней или минимальной по сравнению с жабрами и ногой при максимальной интенсивности ПОЛ. Аналогичная картина установлена по содержанию суммарных каротиноидов в тканях анадары [3], активности ферментов углеводного и белкового обмена [4, 9]. Напротив, у мидии *M. galloprovincialis* величины большинства АО параметров в гепатопанкреасе по сравнению с другими тканями были наибольшими на фоне высокого уровня ПОЛ [8]. Содержание каротиноидов в гепатопанкреасе мидии *M. galloprovincialis* в десятки раз больше, чем в гонадах и жабрах этого вида, а также, чем в гепатопанкреасе анадары *Anadara inaequalis* [3, 7]. У митилид и устриц (*Crenomytilus grayanus*, *Crassostrea gigas*, *Modiolus kurilensis*, *Glycymeris yessoensis*) уровень GSH и каротиноидов значительно выше, чем в гепатопанкреасе анадары *A. broughtonii* и *A. boucardi*, а активность каталазы в гепатопанкреасе *C. grayanus* — в 7,5—12 раз превышала активность фермента обоих видов анадары [5].

АО комплекс жабр анадары характеризовался максимальной активностью ГР, каталазы и СОД, достоверно большей по сравнению с ногой в 1,7—3,4 ($p \leq 0,05$ — $0,001$). Активность ГП была незначительно ниже, чем в ноге, но в 2 раза ($p \leq 0,05$) выше, чем в гепатопанкреасе. Содержание GSH в жабрах было наименьшим.

Значения показателей глутатионовой системы позволяют заключить, что глутатион активно задействован в работе ГП, а ГР обеспечивает постоянное возобновление его ресурса [6]. Низкий уровень глутатиона свидетельствует о превышении скорости его утилизации над скоростью ресинтеза, что может приводить к исчерпанию его запаса. Возможно, это компенсируется повышенной активностью каталазы и СОД в жабрах анадары. Интенсивно аэрируемая ткань жабр имеет тонкий водно-гематический барьер, высокий уровень продукции АФК [15, 17], с участием которых протекают процессы регенерации поврежденных жаберных филламентов [18].

АО комплекс жабр анадары имеет высокую активность большинства исследованных ферментов, в то время как у митилид и гребешка максимальные величины параметров АО системы характерны для гепатопанкреаса [5, 8, 13]. По нашим данным содержание ТБК-активных продуктов в тканях анадары вдвое ниже, чем у мидии, хотя уровень ПОЛ у обоих видов понижался в ряду гепатопанкреас > жабры > нога.

Заключение

Установлена тканевая специфика организации антиоксидантного комплекса и перекисного окисления липидов у черноморского двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* Br. Наибольшая активность ГП и высокое содержание глутатиона при низком уровне ТБК-активных продуктов обнаружено в ноге анадары. В

гепатопанкреасе моллюска выявлена максимальная интенсивность ПОЛ и более высокая по сравнению с ногой активность ГР, каталазы и СОД. Жабры характеризовались максимальной активностью ГР, каталазы и СОД и самым низким содержанием глутатиона.

Градации тканей по исследованным показателям была следующая:

- по активности ГР, каталазы и СОД: жабры > гепатопанкреас > нога;
- по активности ГП: нога > жабры > гепатопанкреас;
- по содержанию глутатиона: нога > гепатопанкреас > жабры;
- по уровню ТБК-активных продуктов: гепатопанкреас > жабры > нога.

Вероятно, физиолого-биохимические особенности АО защиты тканей анадари наряду с высокой подвижностью моллюска и наличием гемоглобина расширяют адаптационные возможности вида и позволяют успешно осваивать новые биотопы.

**

*Вивчали тканину специфіку показників антиоксидантної (АО) системи та перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) чорноморського двостулкового молюска *Anadara inaequalvis*. Найбільшу активність глутатіонпероксидази і великий вміст глутатіону при низькому рівні ТБК-реагуючих продуктів виявлено в нозі анадари. В гепатопанкреасі спостерігали максимальну інтенсивність ПОЛ і більшу, ніж у нозі, активність глутатіонредуктази, каталази та супероксиддисмутази. Серед досліджених тканин зябри мали максимальну активність більшості ферментів АО системи і найменший вміст глутатіону.*

**

*The tissue specificity of parameters of antioxidant (AO) system and lipid peroxidation (LP) of the Black Sea bivalve mollusk *Anadara inaequalvis* have been determined. The highest activity of glutathione peroxidase and high content of glutathione at the background of TBA-active products have been found in foot of anadara. In mollusk's hepatopancreas the maximal intensity of LP and higher activity of glutathione reductase, catalase and superoxide dismutase comparing with foot have been revealed. Gills have been characterized by the maximal activity of most AO enzymes and the least level of glutathione among the tissues examined.*

**

1. Андрущенко Т.И., Солдатов А.А., Головина И.В. // Морск. экол. журн. — 2009. — Т. 8, № 3. — С. 15—24.
2. Анистратенко В.В., Халиман И.А. Двустворчатый моллюск *Anadara inaequalvis* (Bivalvia, Arcidae) в северной части Азовского моря: завершение колонизации Азово-черноморского бассейна // Вестн. зоологии. — 2006. — Т. 40, № 6. — С. 505—511.

3. Борогина А.В., Нехорошев М.В., Солдатов А.А. Особенности состава каротиноидов тканей двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis* Bruguiere // Доп. НАН України. — 2009. — № 5. — С. 186—190.
4. Головина И.В. Влияние неблагоприятных факторов среды на активность ферментов в тканях черноморских моллюсков // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-та. Сер.: Біологія. — 2005. — Т. 4 (27). — С. 46—47.
5. Довженко Н.В. Реакция антиоксидантной системы двустворчатых моллюсков на воздействие повреждающих факторов среды: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Владивосток, 2006. — 22 с.
6. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Обмен глутатиона // Успехи совр. биологии. — 1990. — Т. 31, № 6. — С. 157—179.
7. Поспелова Н.В., Нехорошев М.В. Содержание каротиноидов в системе «взвешенное вещество — мидия (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) — биоотложения мидий» // Экология моря. — 2003. — Вып. 64. — С. 62—66.
8. Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Головина И.В. Состояние антиоксидантного ферментативного комплекса тканей черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. в условиях естественного окислительного стресса // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. — 2008. — Т. 44, № 2. — С. 150—155.
9. Солдатов А.А., Андриенко Т.И., Головина И.В., Столбов А.Я. Особенности организации тканевого метаболизма у моллюсков с различной толерантностью к внешней гипоксии // Там же. — 2010. — Т. 46, № 4. — С. 284—290.
10. Столяр О.Б., Грубінко В.В., Зіньковська Н.Г. та ін. Интегральный показатель антиоксидантно-прооксидантного стану організму як інструмент біомолекулярного моніторингу // Мед. хімія. — 2004. — Т. 6, № 3. — С. 66—68.
11. Фальфушинская Г.И., Базан О.Г., Столяр О.Б. Система антиоксидантной защиты в тканях пресноводного двустворчатого моллюска *Colletopterum pictinale* (Unionidae) в условиях естественного водоема и переселения // Гидробиол. журн. — 2008. — Т. 44, № 3. — С. 56—68.
12. Birmelin C., Pipe R.K., Goldfarb P.S. et al. Primary cell-culture of the digestive gland of the marine mussel *Mytilus edulis*: a time-course study of antioxidant- and biotransformation-enzyme activity and ultrastructural changes // Mar. Biol. — 1999. — Vol. 135, N 1. — P. 65—75.
13. Gamble S.C., Goldfarb P.S., Porte C., Livingstone D.R. Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*) // Mar. Environ. Res. — 1995. — Vol. 39, N 1—4. — P. 191—195.
14. Hourdez St., Weber R.E. Molecular and functional adaptations in deep-sea hemoglobins // J. Inorganic Biochem. — 2005 — Vol. 99. — P. 130—141.
15. Lemaire P., Livingstone D.R. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis* // Trends in Comp. Biochem. and Physiol. — 1993. — Vol. 1. — P. 1119—1150.

16. *Livingstone D.R., Lips F., Garcia Martinez P. et al.* Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis* // *Mar. Biol.* — 1992. — Vol. 112, N 2. — P. 265—276.
17. *Livingstone D.R.* Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms // *Mar. Pollut. Bull.* — 2001. — Vol. 42, N 8. — P. 656—666.
18. *Moore M.N., Pipe R.K., Farrar S.V.* Induction of lysosomal lipid accumulation and fatty degeneration by polycyclic aromatic hydrocarbons in molluscan digestive cells // *Mar. Environ. Res.* — 1988. — Vol. 24, N 1—4. — P. 352—353.
19. *Ribera D., Narbonne J.F., Daubeze M. et al.* Characterization, tissue distribution and sexual differences of some parameters related to lipid peroxidation in mussels // *Ibid.* — 1989. — Vol. 28, N 1—4. — P. 279—283.
20. *Winston G.W., Livingstone D.R., Lips F.* Oxygen reduction metabolism by the digestive gland of the common marine mussel, *Mytilus edulis* L. // *J. Exp. Zool.* — 1990. — Vol. 255. — P. 296—308.

Институт биологии южных
морей НАН Украины, Севастополь

Поступила 26.04.11