

УДК 577.1:577.41

## АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ У РАЗНЫХ ВИДОВ МОЛЛЮСКОВ В УСЛОВИИ ГИПОКСИИ/АНОКСИИ

© 2011 А.А. Истомина, Н.В. Довженко, Н.Н. Бельчева, В.П. Челомин

Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, г. Владивосток

Поступила в редакцию 11.05.2011

В экспериментальных условиях было исследовано действие гипоксии/аноксии на активность антиоксидантных ферментов в тканях пищеварительной железы *Spisula sachalinensis*, *Crenomytilus grayanus*, *Patinopecten yessoensis*, *Littorina mandschurica*, *Tegula rustica*. Обнаружены видовые различия в реактивности антиоксидантных ферментов на условия недостатка кислорода, что, вероятно, определяется особенностями условий существования видов.

Ключевые слова: гипоксия/аноксия, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионредуктаза

Растворенный кислород является одним из важнейших экологических факторов, влияющим на распространение и жизнедеятельность морских организмов. Многие водные беспозвоночные сталкиваются с условиями недостатка кислорода, вследствие чего им свойственны определенные адаптационные механизмы, позволяющие выжить в этих условиях [11]. В результате интенсивной хозяйственной деятельности происходят изменения в гидрохимическом режиме прибрежных вод, что приводит к возникновению таких нежелательных явлений как гипоксия или аноксия (недостаточного для большинства организмов содержания кислорода или его отсутствия) [3]. Вследствие этого определенный интерес вызывают биохимические механизмы адаптации морских организмов к бескислородным условиям. Имеются убедительные данные, свидетельствующие о том, что изменение кислородного режима организма (гипоксия, гипероксия) приводит к активации свободно-радикальных процессов (увеличению продукции активных форм кислорода (АФК)) и развитию окислительного стресса [1, 2, 5, 9]. Поэтому при исследовании устойчивости к гипоксии особое внимание уделяется антиоксидантной (АО) защитной системе, представленной ферментами и низкомолекулярными компонентами. Изменение активности АО ферментов, уровня низкомолекулярных антиоксидантов при недостатке кислорода является следствием нарушения прооксидантно-антиоксидантного равновесия. И компоненты АО системы принято рассматривать в качестве

биомаркеров стресса, вызванного гипоксией/аноксией [10].

В данной работе на 5 видах моллюсков, характеризующихся различной устойчивостью к недостатку кислорода, исследовалась активность 3 антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза (СОД), каталазы (КАТ), глутатионредуктаза (ГР)) в условии гипоксии/аноксии. Цель данного исследования состояла в выявлении особенностей изменения активности антиоксидантных ферментов у моллюсков при недостатке кислорода.

**Материалы и методы.** В работе были использованы двустворчатые моллюски – мактра сахалинская (*Spisula sachalinensis*), мидия Грея (*Crenomytilus grayanus*), приморский гребешок (*Patinopecten yessoensis*) и брюхоногие моллюски – литторина маньчжурская (*Littorina mandschurica*), тегула простая (*Tegula rustica*). Экспериментальную аноксию создавали при выдерживании моллюсков *S. sachalinensis* и *C. grayanus* на воздухе с принудительно сомкнутыми створками раковин [4] в течение 24 часов, *P. yessoensis* выдерживали на воздухе в течение 20 часов, *L. mandschurica* и *T. rustica* выдерживали на воздухе в течение 30 часов. Моллюсков выдерживали на воздухе при температуре равной температуре морской воды на момент отбора. Ткань пищеварительной железы гомогенизировали в 0.05 М Трис-НСl буфере, рН 8.0, содержащем 0,1 мМ фенолметансульфонилфторид, и центрифугировали в течение 40 мин при 10 000 об/мин. при + 4°C. Активность СОД определяли по ингибированию реакции окисления НАДН, вызванного супероксидным радикалом [7]. Активность КАТ определяли по реакции разложения перекиси водорода [8]. Активность ГР определяли по реакции восстановления окисленной формы глутатиона. В качестве восстановителя использовали НАДФН [8].

Все цифровые данные представляют собой среднее значение для четырех проб  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm m$ ). Для двустворчатых моллюсков каждая проба – отдельная особь, для

Истомина Александра Анатольевна, младший научный сотрудник лаборатории морской экотоксикологии. E-mail: s-istomina1@mail.ru

Довженко Надежда Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории морской экотоксикологии. E-mail: nadezhda@ocean.poi.dvo.ru

Бельчева Нина Николаевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории морской экотоксикологии. E-mail: belcheva@poi.dvo.ru

Челомин Виктор Павлович, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории морской экотоксикологии. E-mail: chelomin@poi.dvo.ru

брюхоногих – объединение ткани от 10 особей. Статистическая обработка материалов выполнена с использованием статистических средств приложения MS Office Excel. О достоверности изменений исследуемых параметров судили по различиям средних значений, используя критерий Стьюдента. В расчетах принят 5% уровень значимости.

**Результаты и обсуждение.** Результаты экспериментов показали, что при гипоксии/аноксии не наблюдалось однотипного изменения активности антиоксидантных ферментов для всех видов моллюсков (табл. 1). Можно выделить 3 способа изменения активности (реагирования) антиоксидантных ферментов при гипоксии/аноксии: 1) увеличение, 2) снижение, 3) поддержание активности на прежнем уровне (табл. 2).

Первый способ реагирования (увеличение активности АО ферментов) наблюдался у *S. sachalinensis* и *L. mandshurica*. Данные виды отличались от остальных повышением активности СОД (в 3 и 2 раза, соответственно) и ГР (в 2 и 1.5 раза, соответственно). Известно, что супероксиддисмутаза является одним из главных ферментов

антиоксидантной защиты, обезвреживающий супероксидный анион радикал ( $O_2^-$ ), который образуется при восстановлении молекулярного кислорода в процессе аэробного метаболизма. А глутатионредуктаза является ферментом, восстанавливающим дисульфидную связь окисленного глутатиона (важного внутриклеточного антиоксиданта). По-видимому, особые условия существования этих видов являются причиной периодичного усиления продукции АФК в тканях пищеварительной железы. Так, мактра сахалинская временно закапывается в грунт и, таким образом, оказывается в условиях гипоксии/аноксии. А литторина маньчжурская подвержена постоянному ежедневному изменению условий обитания на литорали, что связано с фазами прилива и отлива. Вероятно, процесс повышения активности данных антиоксидантных ферментов при гипоксии/аноксии в экспериментальных условиях у данных видов протекает на основе их способности быстро реагировать на повышенную индукцию АФК. Эти моллюски адаптированы к постоянной смене условий существования и адаптация, возможно, заключается в изменении активности антиоксидантных ферментов.

**Таблица 1.** Изменения в активности АО ферментов при гипоксии/аноксии в тканях пищеварительной железы моллюсков ( $M \pm m$ )

Вид	Время, час	СОД, ед.ак/мг белка		КАТ, мкмоль/мин/мг белка		ГР, нмоль/мин/мг белка	
		К	Г/А	К	Г/А	К	Г/А
<i>Spisula sachalinensis</i>	24	308±93	925±196*	492±10	345±39*	58±4	112±5*
<i>Crenomytilus grayanus</i>	24	270±115	362±109	61±19	66±11	78±10	58±12
<i>Patinopecten yessoensis</i>	20	88±13	64±29*	57±9	54±10	21±1	15±2*
<i>Littorina mandshurica</i>	30	93±3	196±22*	260±60	219±82	3±0.4	5±0.3*
<i>Tegula rustica</i>	30	56±4	49±4	44±3	53±7	8±0.4	9±1*

*Примечание:* СОД – супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, ГР – глутатионредуктаза; К – контроль, Г/А – гипоксия/аноксия; \* – достоверные различия относительно контроля (n=4, p<0.05).

Второй способ реагирования (снижение активности АО ферментов) наблюдался у *P. yessoensis* – активность ферментов СОД и ГР была подавлена на 25% и 30%, соответственно. Приморский гребешок является стенооксифильным, чувствительным к недостатку кислорода видом, обитающим в относительно стабильных условиях сублиторали, и благодаря активному передвижению может уходить в более благоприятные места при гипоксии/аноксии. Вероятно, поэтому гребешок не был способен ни к усилению, ни к поддержанию активности АО ферментов на обычном уровне в стрессовых условиях гипоксии/аноксии. Возможно также, что у приморского гребешка по сравнению с другими исследованными нами видами антиоксидантные ферменты оказались менее устойчивыми к изменению внутриклеточной среды при недостатке кислорода.

**Таблица 2.** Направленность реагирования АО ферментов пищеварительной железы моллюсков на условия гипоксии/аноксии

Вид	Время, часы	СОД	КАТ	ГР
<i>Spisula sachalinensis</i>	24	↑	↓	↑
<i>Littorina mandshurica</i>	30	↑	↔	↑
<i>Crenomytilus grayanus</i>	24	↔	↔	↔
<i>Tegula rustica</i>	30	↔	↔	↑
<i>Patinopecten yessoensis</i>	20	↓	↔	↓

*Примечание:* ↑ - достоверное увеличение активности фермента, ↓ - достоверное снижение активности фермента, ↔ - поддержание активности фермента на прежнем уровне

Третий способ реагирования (поддержание активности АО ферментов на прежнем уровне) наблюдался у *C. grayanus* и *T. rustica*, у которых активность ферментов оставалась неизменной при гипоксии/аноксии. Как мидия Грея, так и тегула простая являются эволюционно-адаптированными к более постоянным условиям существования (оба вида обитают на сублиторали, ведут прикрепленный и малоподвижный образ жизни соответственно) и не испытывают резкой смены кислородного режима, как это наблюдается у литоральных и закапывающихся моллюсков. Вследствие этого, вероятно, они не способны к быстрому изменению активности антиоксидантных ферментов. Однако они способны поддерживать активность АО ферментов на нормальном (прежнем) уровне. Возможно также, что в тканях этих моллюсков при временном усилении образования АФК в условиях недостатка кислорода задействованы, главным образом, низкомолекулярные компоненты антиоксидантной защиты [6].

**Выводы:** наш эксперимент показал, что видовые различия в реагировании антиоксидантных ферментов моллюсков на условия гипоксии/аноксии, вероятно, связаны с особенностями условий их существования. Данные эксперимента также подтверждают возможность использования антиоксидантных ферментов в качестве биохимических маркеров стрессового воздействия, в частности гипоксии/аноксии. Понимание всех возможных механизмов реагирования компонентов АО системы – важный шаг для дальнейших исследований в области прогноза выживаемости организмов при гипоксии/аноксии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Almeida, E.A. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed / E.A. Almeida, A.C.D. Bainy, A.L. Dafre et al. // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2005. V. 318. P. 21-30.
2. Chen, M. Immune responses of the scallop *Chlamys farreri* after air exposure to different temperatures / M. Chen, H. Yang, M. Delaporte et al. // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2007. V. 345. P. 52-60.
3. Diaz, R.J. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems // Science. 2008. V. 321. P. 926-929.
4. Eertman, R.H.M. "Survival in air" of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress / R.H.M. Eertman, A.J. Wagenvoort, H. Hummel, A.C. Smaal // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1993. V. 170. P. 179-195.
5. Irato, P. Antioxidant responses to variations in dissolved oxygen of *Scapharca inaequivalvis* and *Tapes philippinarum*, two bivalve species from the lagoon of Venice / P. Irato, E. Piccini, A. Cassini, G. Santovito // Mar. Pollut. Bull. 2007. V. 54. P. 1020-1030.
6. Pannunzio, T.M. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorae* / T.M. Pannunzio, K.B. Storey // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1998. V. 221. P. 277-292.
7. Paoletti, F. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase in tissue extracts / F. Paoletti, D. Aldinuccio, A. Mocali, A. Carparini // Anal. Biochem. 1986. V. 154. P. 526-541.
8. Regoli, F. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers / F. Regoli, G. Principato // Aquat. Toxicol. 1995. Vol. 31. P. 143-164.
9. Ross, S.W. Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen / S.W. Ross, D.A. Dalton, S. Kramer, B.L. Christensen // Comparative Biochemistry and Physiology. 2001. V. 130. P. 289-303.
10. Santovito, G. Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen / G. Santovito, E. Piccini, A. Cassini et al. // Comparative Biochemistry and Physiology. 2005. V. 140. P. 321-329.
11. Wu, R.S.S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses // Marine Pollution Bulletin. 2002. V. 45. P. 35-45.

## ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES AT DIFFERENT KINDS OF MOLLUSCUMS IN THE HYPOXIA/ANOXIA CONDITION

© 2011 A.A. Istomina, N.V. Dovzhenko, N.N. Belcheva, V.P. Chelomin  
Pacific Oceanologic institute named after V.I. Ilyichev FEB RAS, Vladivostok

In experimental conditions hypoxea/anoxia action on activity antioxidant enzymes in fabrics of digestive gland *Spisula sachalinensis*, *Crenomytilus grayanus*, *Patinopecten yessoensis*, *Littorina mandschurica*, *Tegula rustica* has been investigated. Specific distinctions in reaction of antioxidant enzymes on conditions of oxygen lack are found out that, possibly, is defined by features of living conditions of kinds.

Key words: hypoxia/anoxia, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase

Alexandra Istomina, Minor Research Fellow at the Laboratory of Marine Ecotoxicology.

E-mail: s-istomina1@mail.ru

Nadezhda Dovzhenko, Candidate of Biology, Research Fellow at the Laboratory of Marine Ecotoxicology. E-mail: nadezhda@ocean.poi.dvo.ru

Nina Belcheva, Candidate of Biology, Leading Research Fellow at the Laboratory of Marine Ecotoxicology. E-mail: belcheva@poi.dvo.ru

Viktor Chelomin, Doctor of Biology, Senior Research Fellow at the Laboratory of Marine Ecotoxicology. E-mail: chelomin@poi.dvo.ru