УДК 574.64

ВЛИЯНИЕ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ ГОЛОДАНИЯ И МЕДИ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ *CRENOMYTILUS GRAYANUS (DUNKER, 1853)*

© 2018 А.А. Истомина, В.П. Челомин

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

Статья поступила в редакцию 26.04.2018

Исследована реакция антиоксидантной системы в пищеварительной железе двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* в условиях голодания и действия меди. Отсутствие пищи вызвало снижение активности каталазы (КАТ), уровня интегральной антирадикальной активности низкомолекулярных антиоксидантов (ИАА) и малонового диальдегида (МДА), в то время как активность супероксиддисмутазы (СОД), глутатионредуктазы (ГР) и глутатиона (GSH) остались неизменными. Воздействие меди на фоне голодания привело к более значительному ингибированию активности СОД, КАТ, ГР и снижению уровня GSH, а также слабому увеличению уровня ИАА по сравнению с голодными мидиями. В целом, эксперименты показали, что при обеих формах воздействия в пищеварительной железе мидии, несмотря на подавление параметров антиоксидантной системы, не происходило развития окислительного стресса, что подтверждается отсутствием накопления малонового диальдегида (МДА).

Ключевые слова: Голодание, воздействие меди, антиоксидантная система, мидия Грея.

ВВЕДЕНИЕ

Растущее загрязнение морской среды отходами производства, нефтепродуктами, пестицидами и тяжелыми металлами влияет на жизнедеятельность гидробионтов и тем самым нарушает сложившееся природное равновесие в экосистеме моря. Одним из таких повреждающих агентов является медь, которая относится к эссенциальным элементам и необходима для метаболизма, роста и развития всех живых организмов, однако в повышенных концентрациях медь может оказывать сильное токсическое действие, особенно увеличивающееся в условиях недостатка кислорода [15, 31].

Известно, что в норме в клетках и тканях аэробных организмов всегда образуются активные формы кислорода (АФК) - $O_2^{-\bullet}$, H_2O_2, $OH^\bullet$ и др. Эти соединения высокореактивны и вызывают окислительное повреждение биологически важных молекул, таких как ДНК, белков, липидов. У всех организмов присутствует антиоксидантная система, представленная специфическими ферментами и низкомолекулярными компонентами (антиоксидантами), которая сдерживает разрушительное действие АФК. Разнообразные факторы, например экстремальные абиотические факторы среды, такие как гипоксия или чужеродные химические вещества органической и неорганической природы (поллютанты) усиливают генерацию АФК, в результате чего нарушаются механизмы функционирования биохимических систем, что неизбежно ведет к развитию окислительного стресса.

Показано, что одним из патогенетических механизмов действия меди является окислительный стресс [17]. Так ионы Cu^{2+}, восстанавливаясь в клетке до Cu^+ в присутствии биологических восстановителей таких как аскорбиновая кислота и глутатион, могут способствовать образованию супероксидного анион радикала $O_2^{\bullet-}$ [16] и/или через реакцию Фентона генерировать один из самых реакционных свободных радикалов - гидроксильный радикал ($OH^\bullet$) [39]. Усиление образования радикалов кислорода приводит к окислительному повреждению всех биологических молекул, в том числе липидов, белков и нуклеиновых кислот [21]. Кроме того, ионы меди способны непосредственно взаимодействовать с тиоловыми группами глутатиона и клеточных белков и влиять на окислительно-восстановительное состояние в клетках [9; 16].

Поэтому выживаемость организма в условиях возникновения окислительного стресса зависит от потенциалаего антиоксидантной системы.

Воздействие химических веществ различной природы на морские организмы происходит в условиях периодического колебания биотических и абиотических факторов, таких как доступность пищи, температура, соленость, доступность кислорода. Воздействие такого комплекса факторов среды может оказывать значительное влияние на физиологическое состояние морских организмов и должно учитываться при

Истомина Александра Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории морской экотоксикологии.
E-mail: s-istomina1@mail.ru
Челомин Виктор Павлович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией морской экотоксикологии. E-mail: chelomin@poi.dvo.ru

использовании их в качестве мониторов при оценке качества окружающей среды [18]. В ряде работ показано, что повреждающий эффект некоторых токсичных веществ, в частности тяжелых металлов, усиливается на фоне изменений естественных факторов среды [13, 19, 22, 26, 35].

Сублиторальный двустворчатый моллюск *Crenomytilus grayanus* в последнее время широко используется в качестве организма индикатора в полевых исследованиях, связанных с биоаккумуляцией таких токсикантов как тяжелые металлы, хлорорганические пестициды, радионуклиды [2, 25, 38]. Мидия Грея способна аккумулировать повышенные концентрации меди в зависимости от содержания металла в морской среде [24]. Кроме того, процессы сезонной флуктуации биомассы первичной продукции, а также интенсивное взмучивание осадков морского дна во время штормов и терригенных стоков могут приводить к периодам недостатка кислорода или пищи при закрытии створок раковины моллюска.

Цель данной работы состояла в том, чтобы оценить антиоксидантный потенциал мидии при аккумуляции ионов меди в условиях голодания.

Для оценки состояния антиоксидантной системы была определена активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы. Для более полной характеристики антиоксидантной системы в тканях также были исследованы уровень интегральной антирадикальной активности низкомолекулярных антиоксидантов и концентрация восстановленного глутатиона, одного из важнейших низкомолекулярных антиоксидантов. Степень развития окислительного стресса в клетках оценивали по уровню накопления продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Половозрелые особи мидии Грея (с длиной раковины 10–11 см) были собраны в б. Алексеева (о-в Попова, залив Петра Великого Японского моря) в июле. Моллюсков для акклимации предварительно выдерживали в аэрируемых 140-литровых аквариумах с морской водой в течение недели. В аквариумах поддерживалась относительно стабильная температура (12^{0}C) и соленость (32%). Животных не кормили, воду меняли ежедневно.

Эксперимент 1. Влияние голодания

Мидий после акклимации выдерживали 2 недели без пищи при тех же условиях.

Эксперимент 2. Воздействие меди на фоне голодания

Животных после акклимации выдерживали в воде с $CuSO_4$ (25 мкгCu/л) в течение 2-х недель без пищи при тех же условиях.

После проведения акклимации и экспериментов из каждого моллюска (всего было использовано 21 мидия) на льду извлекали пищеварительную железу. Для определения биохимических параметров большую часть ткани сразу гомогенизировали в охлажденном Трис-HCl буфере в соотношении 1:10 г/мл (0.05 М, pH 8.0, 4^{0}C), содержащем 0.1 мМ фенилметансульфонилфторид (ингибитор протеаз). Часть полученного гомогената использовали для определения содержания малонового диальдегида (МДА) [8] и уровня интегрального антиоксидантного потенциала низкомолекулярного звена антиоксидантной системы (ИАА) [6]. Остальную часть гомогенатов центрифугировали в течение 40 минут при 11000 об/мин и температуре 4^{0}C. Полученные супернатанты замораживали при температуре –80°C (не более двух суток), затем определяли содержание белка [27] и активность антиоксидантных ферментов [32, 33].

Оставшуюся часть ткани, извлеченной из мидий, замораживали при температуре –80°C, для дальнейшего определения содержания глутатиона (GSH) [30].

Все измерения проводили при 20^{0}C на спектрофотометре Shimadzu UV-2550 с термостатированной ячейкой. Полученные в ходе экспериментов данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (M±n), где n=5 (пищеварительная железа от одной мидии - одна проба).

Содержание меди в пищеварительной железе мидий определяли атомно-абсорбционным методом после минерализации тканей смесью концентрированных азотной и хлорной кислот в соотношении 1:3 по объему. Измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu AA-6800 в воздушно-ацетиленовом пламени в трех параллельных пробах (1 проба – объединение тканей от 2-х животных) (M±n, где n=3).

Статистическая обработка полученных результатов 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

Эксперимент 1. Влияние голодания

При выдерживании моллюсков в условиях отсутствия пищи в течение двух недель произошло значительное снижение активности КАТ (в 2.2 раза), показателя общей антирадикальной активности – ИАА (в 1.7 раза) и уровня продуктов перекисного окисления липидов - МДА (в 2.5 раза), по сравнению с контролем (см. рис.),

в то время как активность СОД и ГР осталась неизменной при этих условиях (см. рис.). Уровень низкомолекулярного антиоксиданта – глутатиона (GSH) также остался неизменным (см. рис.).

Эксперимент 2. Воздействие меди на фоне голодания

При аккумуляции меди в течение 2-х недель содержание металла в пищеварительной железе *C. grayanus* увеличилось в 2 раза (с 32±1.3 до 66±15.4 мкг/г сухой массы). По сравнению с контролем аккумуляция меди на фоне отсутствия пищи в течение 2-х недель привела к снижению активности СОД, КАТ и ГР в 1.8, 3 и 1.6 раза, соответственно (см. рис.) и небольшому увеличению ИАА (в 1.3 раза) по сравнению с голодными мидиями. Наблюдалось сильное снижение уровня GSH (в 2.8 раза) и МДА почти в 2 раза (см. рис.).

ОБСУЖДЕНИЕ

В полярных и умеренных климатических зонах из-за сезонной флуктуации биомассы первичных продуцентов морские беспозвоночные могут испытывать периоды низкой доступности пищи [43].

Так как большинство низкомолекулярных антиоксидантов и их предшественников в водных экосистемах продуцируются фотоавтотрофами (например, каротиноиды и витамины) и являются важными в диете гетеротрофов, в частности моллюсков – фильтраторов, то ограничение в питании может существенно повлиять на состояние антиоксидантной системы и снизить защитный потенциал этих животных [29].

Вероятно поэтому в наших экспериментах по голоданию (эксперимент 1) происходит значительное снижение уровня ИАА, отражающего потенциал низкомолекулярного звена антиоксидантной системы [6]. Несмотря на то, что отсутствие пищи замедляет процессы анаболизма, в экспериментах по голоданию наблюдается достоверное снижение только активности КАТ. Активность первичного фермента антиоксидантной защиты – СОД, нейтрализующего супероксидный анион радикал, и уровень глутатиона (GSH) у голодающих мидий остались неизменными. Вероятно, в метаболизме мидии GSH настолько важен в поддержании окислительно-восстановительного баланса, отвечающего за метаболическое состояние клетки, что

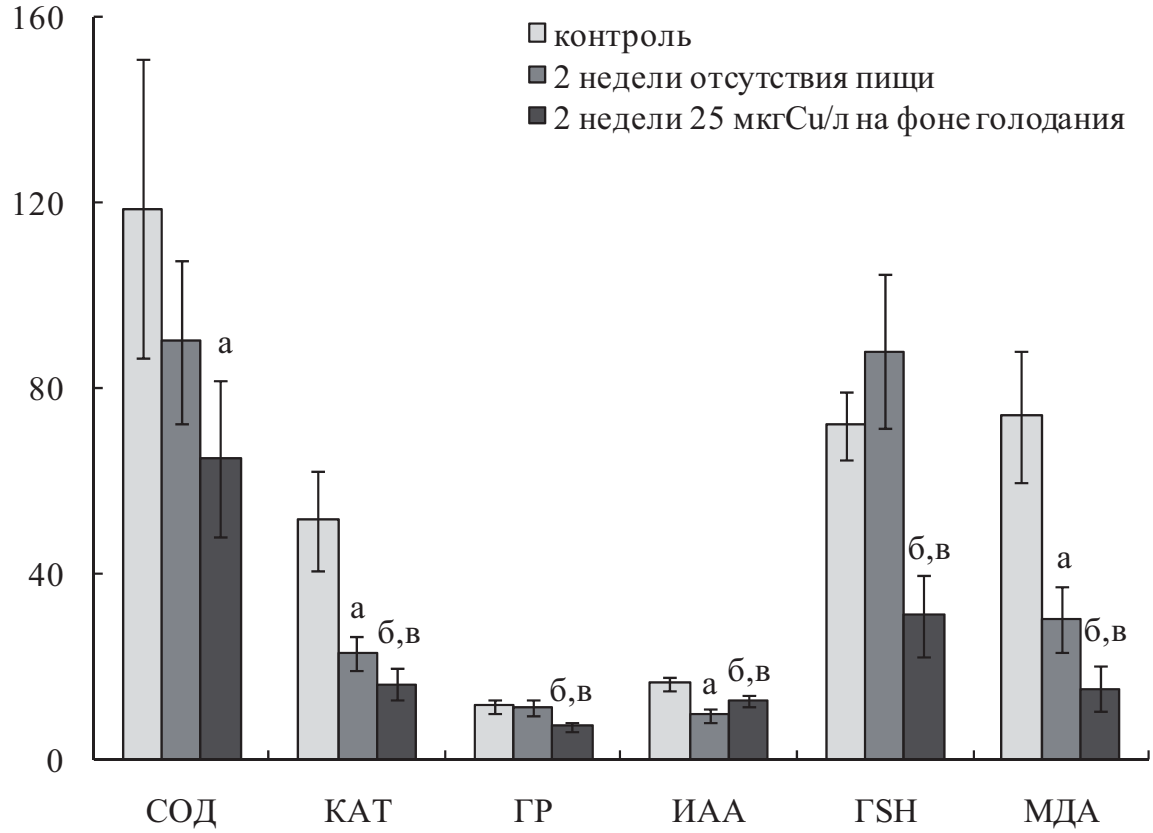

Рис. Активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутаза (СОД, ед.акт/мг белка); каталаза (КАТ, мкмоль/мин/мг белка); глутатионредуктаза (ГР, нмоль/мг белка); уровень интегральной антирадикальной активности низкомолекулярных антиоксидантов (ИАА, мкмоль/мг белка), содержание глутатиона (GSH, нмоль/г сыр. веса) и малонового диальдегида (МДА, нмоль/мг белка) в пищеварительной железе *Crenomytilus grayanus* в условиях голодания и действия меди на фоне голодания.
Примечание: а – достоверные различия относительно контрольных мидий,
б – достоверные различия относительно голодных мидий,
в – достоверные различия относительно контрольных и голодных мидий (n=5, p<0,05)

его содержание поддерживается на уровне контроля даже через 2 недели голодания. При этом важно подчеркнуть, что активность ГР, фермента восстанавливающего окисленный глутатион (GSSH), в этих условиях поддерживался на уровне контроля. Таким образом, есть все основания полагать, что при голодании, несмотря на ограниченность субстратных и энергетических ресурсов, двустворчатый моллюск *C. grayanus* проявляет способность поддерживать высокий уровень ряда ключевых компонентов антиоксидантной системы.

Снижение активности КАТ также было обнаружено Абели и коллегами [3] в жабрах моллюска *Nacella concinna* после одного месяца голодания. Также Ансалдо и соавторы сообщили, что отсутствие пищи во время недели акклимации антарктического моллюска *N. concinna* вызывало достоверное снижение активности СОД и КАТ в пищеварительной железе [4].

Снижение уровня продуктов перекисного окисления липидов (МДА) в пищеварительной железе голодающих мидий в наших экспериментах, очевидно, является результатом замедления метаболических процессов и, соответственно, реакций свободнорадикального окисления. Низкое содержание МДА в нервных ганглиях также было обнаружено у голодающих легочных моллюсков *Lymnaea stagnalis* по сравнению с сытыми [36]. В работе Ансалдо и его коллег [5] также показано снижение уровня продуктов перекисного окисления липидов в пищеварительной железе *N. concinna* после недели голодания. Таким образом, голодание является важным естественным фактором, влияющим на различные показатели окислительного стресса.

Присутствие в морской среде загрязняющих веществ увеличивает продукцию АФК и влияет на защитные механизмы [7, 34]. Воздействие меди (эксперимент 2) на фоне голодания оказало гораздо более сильное ингибирующее влияние на антиоксидантные ферменты по сравнению с действием только голодания (эксперимент 1). Подавление активности антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ и ГР) медью может быть связано как с влиянием этого металла на процессы синтеза ферментов, так и с изменением конформации ферментов под действием ионов меди [1, 10].

Снижение активности КАТ и ГР при воздействии меди также было обнаружено в пищеварительной железе *Mytilus galloprovincialis* [33] и в печени пресноводной рыбы *Piaractus mesopotamicus* [35].

Воздействие ионов меди вызвало значительное снижение уровня глутатиона (в 2.8 раза) в пищеварительной железе моллюска. Восстановленный глутатион, как известно, является одним из ключевых низкомолекулярных антиоксидантов, вовлеченных в защиту клеточных биоструктур от окислительного повреждения. Наблюдаемое в этом исследовании снижение концентрации GSH при аккумуляции меди может происходить из-за окисления GSH до GSSG этим металлом [10, 16].

Возможно также, что уменьшение уровня GSH при воздействии меди объясняется снижением активности ГР у *C. grayanus*. Снижение концентрации GSH и активности ГР при воздействии меди также было найдено в пищеварительной железе и жабрах *Mytilus galloprovincialis* [33, 41]. Аналогичная реакция на медь была обнаружена в тканях пищеварительной железы и жабр пресноводного моллюска *Unio tumidus* [14].

Однако, несмотря на снижение активности антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ, ГР) в клетках пищеварительной железы мидий *C. grayanus* при воздействии меди, уровень МДА также понизился. Известно, что низкомолекулярные белки металлотионеины, которые участвуют в детоксикации металлов, синтезируются в ответ не только на действие металлов [23], но и в ответ на стресс, такой как голодание [37]. В то же время показано, что эти белки участвуют в детоксикации оксирадикалов [40]. Вероятно, что наблюдаемое нами повышение показателя интегральной антирадикальной активности низкомолекулярных антиоксидантов (ИАА) и снижение уровня МДА при воздействии меди на фоне голодания можно объяснить синтезом этих защитных белков в пищеварительной железе моллюска.

Возможно также, что продукты анаэробного обмена играют определенную роль в антиоксидантной защите этих моллюсков при окислительном стрессе. Известно, например, что антиоксидантные свойства проявляет сукцинат - основной продукт анаэробиоза у мидий [20]. Кроме того, было показано, что воздействие ионов меди на молодых особей мидии *Perna viridis* приводит к увеличению содержания свободных аминокислот (гистидина, глутамата, глутамина, гипотаурина, диметилглицина, аргинина) в мягких тканях тела [42]. Вероятно, что повышенное содержание аминокислот в этих условиях поддерживает не только осморегуляцию, но и участвует в антиоксидантной защите клеток организма.

Снижение уровня продуктов перекисного окисления липидов (МДА и 4-гидроксиноненаля) также было обнаружено в жабрах мидии *Bathymodiolus azoricus* при воздействии меди 25 мкг/л (24 ч) [11]. Однако, у устрицы *Crassostrea virginica* при воздействии меди (20 и 80 мкг/л в течение 7 дней) уровень МДА не изменился, что, по мнению авторов, является следствием адаптации этих моллюсков к характерным для них высоким уровням меди и цинка [12]. В то

же время, воздействие меди 40 мкг/л (6 дней) приводит к увеличению содержания МДА в пищеварительной железе мидии *M. galloprovincialis* [41]. Было показано, что лизосомальная аутофагия поврежденных частей клеток и резервных продуктов в пищеварительной железе мидии *M. galloprovincialis*, вызванная отсутствием пищи, дает некоторую устойчивость к токсичности, вызванной воздействием меди [28]. Так авторы обнаружили, что при голодании дестабилизирующий эффект воздействия меди на мембраны лизосом был значительно меньше, чем в присутствии пищи.

Вероятно, и в случае с *C. grayanus* аутофагия, индуцированная как голоданием, так и действием меди на фоне голодания, способствовала формированию некоторой стресс-устойчивости моллюска к действию этих факторов. Видимо, поэтому, в наших экспериментах не происходит накопления продуктов перекисного окисления липидов (МДА).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные эксперименты показали, что при голодании, несмотря на ограниченность энергетических ресурсов, мидия Грея тратит внутриклеточные запасные вещества на поддержание высокого уровня ряда компонентов антиоксидантной системы (ферментов СОД и ГР, глутатиона). И, тем не менее, ограничение в доступности пищи приводит к снижению защитного антиоксидатного потенциала у данного вида моллюска (снижение активности КАТ, уровня ИАА), что необходимо учитывать при интерпретации результатов исследования влияния различных токсичных веществ на морских беспозвоночных в экспериментальных условиях.

Воздействие меди на фоне голодания приводит к значительному подавлению активности ферментов (СОД, КАТ, ГР) и снижению уровня GSH. Слабое увеличение ИАА и отсутствие накопления МДА при действии меди в условиях голодания свидетельствует о присутствии у мидии Грея других достаточно развитых механизмов антиоксидантной защиты против повреждающих факторов среды, обладающих проокислительным потенциалом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Агарков А.А., Попова Т.Н.* Глутатионредуктаза и окислительный стресс. Очистка, каталитические свойства и регуляция активности. Lap Lambert Academic Publishing, 2010. 176 с.
2. *Боярова, М.Д., Лукьянова, О.Н.* ДДТ и ГХЦГ в моллюсках зал. Петра Великого (Японское море) // Тезисы докладов III Международной научно-практической конференции «Морские прибрежные экосистемы. Водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки». Владивосток, 2008. С. 181-182.
3. *Abele D.* Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna* / *D. Abele, B. Burlando, A. Viarengo, H. Pörtner* // Comp. Biochem. Physiol. 1998. Part B. V. 120. P. 425-435.
4. *Ansaldo M., Najle R, Luquet C.M.* Oxidative stress generated by diesel seawater contamination in the digestive gland of the Antarctic limpet *Nacella concinna* // Mar. Environ. Res. 2005. V. 59. P. 381–390.
5. *Ansaldo M., Sacristán H, Wider E.* Does starvation influence the antioxidant status of the digestive gland of *Nacella concinna* in experimental conditions? // Comp. Biochem. Physiol. 2007. Part C. V. 146. P. 118–123.
6. *Bartosz G.* Simple determination of peroxyl radical-trapping capacity / *G. Bartosz, A. Janaszewska, D. Ertel, M. Bartosz* // Biochem. Mol. Biol. Int. 1998. V. 46. No. 3. P. 519-528.
7. *Box A.* Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis* / *A. Box, A. Sureda, F. Galgani, A. Pons, S. Deudero* // Comp. Biochem. Physiol. 2007. V. 146. Part C. P. 531-539.
8. *Buege J.A., Aust S.D.* Microsomal lipid peroxidation // Methods in Enzymology. Eds. by Fleischer S., Packer L., N.Y.: Academic Press. 1978. P. 302-310.
9. *Chelomin V.P., Belcheva N.N., Zakhartsev M.V.* Biochemical mechanisms of adaptation to cadmium and copper ions in the mussel *Mytilus trossulus* // Biologya Morya. 1998. V. 24. No. 5. P. 319-325.
10. *Christie N.T., Costa M.* Review: in vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV. Disposition of metals in cells: interactions with membranes, glutathione, metallothionein, and DNA // Biol. Trace Elem. Res. 1984. V. 6. P. 139-158.
11. *Company R.* Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* / *R. Company, A. Serafim, M.J. Bebianno, R. Cosson, B. Shillito, A. Fiala-M-edioni* // Mar. Environ. Res. 2004. V. 58. P. 377-381.
12. *Conners R., Ringwood A.H.* Effects of glutathione depletion on copper cytotoxicity in oysters *Crassostrea virginica* // Aquat. Toxicol. 2000. V. 50. P. 341-349.
13. *Dangre A.J., Manning S., Brouwer M.* Effects of cadmium on hypoxia-induced expression of hemoglobin and erythropoietin in larval sheepshead minnow, *Cyprinodon variegates* // Aquat. Toxicol. 2010. V. 99. P. 168-175.
14. *Doyotte A.* Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus* / *A. Doyotte, C. Cossu, M. Jacquin, M. Babut, P. Vasseur* // Aquat. Toxicol. 1997. V. 39. P. 93-110.

15. *Eriksson S.P., Weeks J.M.* Effects of copper and hypoxia on two populations of the benthic amphipod *Corophium volutator* (Pallas) // Aquat. Toxicol. 1994. V. 29. P. 73-81.
16. *Freedman J.H., Ciriolo M.R, Peisach J.* The role of glutathione in copper metabolism and toxicity // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. No.10. P. 5598-5605.
17. *Gaetke L.M., Chow C.K.* Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients // Toxicology. 2003. V. 189. P. 147-163.
18. *Gonzalez-Fernandez C.* Effect of mussel reproductive status on biomarker responses to PAHs: Implications for large-scale monitoring programs / *C. Gonzalez-Fernandez, M. Albentosa, J.A. Campillo, L. Vinas, A. Franco, J. Bellas* // Aquat. Toxicol. 2016. V. 177. P. 380-394.
19. *Gorokhova E.* Single and combined effects of hypoxia and contaminated sediments on the amphipod *Monoporeiaaffinis* in laboratory toxicity bioassays based on multiple biomarkers / *E. Gorokhova, M. Löf, H.P. Halldórsson, U. Tjärnlung, M. Lindström, T. Elfwing, B. Sundelin* // Aquat. Toxicol. 2010. V. 99. P. 263-274.
20. *Grieshaber M.K.* Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates / *M.K. Grieshaber, I. Hardewig, U. Kreutzer, H. Pörtner* // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. V. 125. 1994. P. 43-147.
21. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford Univ. press. 2007. 851 p.
22. *Ivanina A., Cherkasov A.S., Socolova I.M.* Effect of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, *Crassostrea virginica* // J. Exp. Biol. 2010. V. 211. P. 577-586.
23. *Kägi J.H.R., Schaffer A.* Biochemistry of metallothionein // Biochemistry. 1988. V. 27 (3). P. 8509-8515.
24 *Kavun V. Y., Shulkin V.M., Khristoforova N.K.* Metal accumulation in mussels of the Kuril Islands, northwest Pacific Ocean // Mar. Environ. Res. 2002. V. 53. P. 219-226.
25. *Kavun V.Ya., Shulkin, V.M.,* Changes in the microelement composition in organs and tissues of the bivalve *Crenomytilus grayanus* acclimatized in a biotope with long-term heavy metal contamination // Russ. J. Mar. Biol. 2005. V. 31. P. 109-114.
26. *Legeay A.* Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* / *A. Legeay, M. Achard-Joris, M. Baudrimont, J. Massabuau, J. Bourdineaud* // Aquat. Toxicol. 2005. V. 74. P. 242-253.
27. *Markwell M.* A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples / *M. Markwell, S. Haas, L. Bieber, N. Tolbert* // Analyt. Biochem. 1978. V. 87. P. 206-210.
28. *Moore M.N.* Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels / *M.N. Moore, A. Viarengo, P. Donkin, A.J.S. Hawkins* // Aquat. Toxicol. 2007. V. 84. P. 80-91.
29. *Morales A.E.* Starvation, energetics, and antioxidant defenses / *A.E. Morales, A. Peter-Jimenez, M. Furne, H. Guderley* // Oxidative stress in aquatic ecosystems. In: D. Abele, J.P. Vázquez-Medina, T. Zenteno-Savín, editors. 1 st ed. Blackwell Publising, Oxford; 2012. P. 281-294.
30. *Moron M.S., Depierre J.W., Mannervik B.* Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione s-transferase activities in rat lung and liver // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 582. P. 67-78.
31. *Neuhoff H., Theede H.* Long-term effects of low copper concentrations at normal and reduced oxygen tensions // Limnologica. 1984. V. 15. P. 513-521.
32. *Paoletti F.* A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase in tissue extracts / *F. Paoletti, D. Aldinuccio, A. Mocali, A. Carparrini* // Anal. Biochem. 1986. V. 154. P. 526-541.
33. *Regoli F., Principato G.* Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilis galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers // Aquat. Toxicol. 1995. V. 31. P. 143-164.
34. *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* // Comp. Biochem. Physiol. 2001. V. 130. P. 289-303.
35. *Sampaio F.G.* Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure / *F.G. Sampaio, C.L. Boijink, E.T. Oba, L.R.B. Santos, A.L. Kalinin, F.T. Rantin* // Comp. Biochem. Physiol. 2008. V. 147. Part C. P. 43-51.
36. *Sidorov A.V., Maslova G.T.* Antioxidant defense in the central nervous ganglions of mollusk *Lymnaea stagnalis* // Proceedings of the national academy of Sciences of Belarus. Biological series. 2009. No. 2. P. 90-94.
37. *Sogawa N.* The changes of hepatic matallothionein synthesis and the hepatic damage induced by starvation in mice / *N. Sogawa, C.A. Sogawa, H. Fukuoka, Y. Mukubo, T. Yoneyama, Y. Okano, H. Furuta, K. Onodera* // Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 2003. V. 25(8). P. 601-606.
38. *Tkalin A.V., Lishavskaya T.S., Shulkin V.M.* Radionuclides and trace metals in mussels and bottom sediments around Vladivostok // Russia. Mar. Pollut. Bull. 1998. V. 36. P. 511-554.
39. *Valko M., Morris H., Cronin M.T.D.* Metals, toxicity and oxidative stress // Curr. Med. Chem. 2005. V. 12. P. 1161-1208.
40. *Viarengo A.* Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) / *A. Viarengo, B. Burlando, M. Cavaletto, B. Marchi, E. Ponzano, J. Blasco* // Am. J. Physiol. 1999a. V. 277. P. 1612-1619.
41. *Viarengo A.* Heavy metal effects on the tissues of

Mytilus galloprovincialis Lam / *A. Viarengo, L. Canesi, M. Pertea, G. Poli, M.N. Moore, M. Orunesu* // Comp. Biochem. Physiol. 1990. V. 97. Part. C. No. 1. P. 37-42.

42. *Wu H., Wang W.* NMR-based metabolomic studies on the toxicological effects of cadmium and copper on green mussels *Perna viridis* // Aquat. Toxicol. 2010. V. 100. P. 339-345.

43. *Zvalinsky V.I.* Production and hydrochemical characteristics of ice, under-ice water and sediments in the Razdolnaya River estuary (Amursky Bay, Sea of Japan) during the ice cover period / *V.I. Zvalinsky, A.A. Maryash, I.V. Stonik, M.G. Shvetsova, S.G. Sagalaev, A.A. Begun, P.Ya. Tishchenko* // Russ. J. Mar. Biol. 2010. V. 36. No. 4. P. 270-281.

COMBINED EFFECTS OF STARVATION AND COPPER ON THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF *CRENOMYTILUS GRAYANUS (DUNKER, 1853)*

© 2018 A.A. Istomina, V.P. Chelomin

Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok

The effect of combined-factors (exposure to starvation and copper) on the antioxidant defenses were studied in the digestive gland of the bivalve *Crenomytilus grayanus*. The lack of food caused a decrease in the activity of catalase (CAT), the level of integral antiradical activity of low molecular weight antioxidants (IAA) and malondialdehyde (MDA), while the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR) and glutathione (GSH) remained unchanged. The effect of combined-factors (exposure to starvation and copper) lead to more significant inhibition of the activity of SOD, CAT, GR and reduce glutathione, as well as a weak increase in the level of IAA in comparison with starving mussels. The experiments have shown that the digestive gland of mussel do not accumulate lipid peroxidation products (MDA) at any forms of the impact despite suppression of the antioxidant system.
Keywords: Starvation, exposure to copper, antioxidant system, mussel Gray.

Alexandra Istomina, Research Fellow at the Laboratory of Marine Ecotoxicology. E-mail: s-istomina1@mail.ru
Viktor Chelomin, Doctor of Biology, Head of the Laboratory of Marine Ecotoxicology.
E-mail: chelomin@poi.dvo.ru