

УДК 577.1:577.41

© *Истомина А.А., Довженко Н.В., Челомин В.П.*

РЕАКЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ НА АНОКСИЮ И РЕОКСИГЕНАЦИЮ У МОРСКОГО ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *SCAPHARCA BROUGHTONI*

Аннотация. В работе рассматриваются особенности биохимической организации и реакции антиоксидантной (АО) защитной системы в тканях пищеварительной железы и жабр моллюска *Scapharca broughtoni* в условиях экспериментальной аноксии/гипоксии с последующей реоксигенацией. Полученные результаты выявили, что аноксия вызвала общее подавление АО активности, снижение уровня глутатиона и сопровождалась интенсивным накоплением продуктов перекисного окисления липидов.

Ключевые слова: аноксия, реоксигенация, антиоксидантная система, интегральная антирадикальная активность, окислительный стресс, глутатион, МДА.

© *A. Istomina, N. Dovzhenko, V. Chelomin*

ANTIOXIDANT DEFENSES DURING ANOXIA AND AEROBIC RECOVERY IN MARINE BIVALVIA *SCAPHARCA BROUGHTONI*

Abstract. The aim of this work is to study the biochemical organization and response of defense system in digestive gland and gills of marine bivalve *Scapharca broughtoni* during anoxia/hypoxia and recovery. The results obtained show that anoxia exposure caused decreasing of total antioxidant activity, level of glutathione and intensive increasing of lipid peroxidation product.

Key words: anoxia, aerobic recovery, antioxidant system, total oxyradical scavenging capacity, oxidative stress, glutathione, lipid peroxidation.

В последнее время, в результате климатических изменений и деятельности человека, в различных акваториях высокопродуктивного шельфа Мирового океана все чаще возникают зоны устойчивой гипоксии, приводя к массовой гибели отдельных видов гидробионтов и качественной трансформации существующих экосистем.

Чрезвычайная важность кислорода в жизнедеятельности гидробионтов обуславливает повышенный интерес к изучению биохимических механизмов резистентности различных видов к изменениям кислородного режима.

В последние годы накопились данные, свидетельствующие о том, что изменения кислородного режима организма приводят к активации свободно-радикальных процессов: при гипоксии/аноксии – вследствие избытка электронов, при реоксигенации – в результате избытка их акцепторов (O₂). По сути, при действии аноксии и последующей реоксигенации возникает одно и то же явление – окислительный стресс.

Уникальная устойчивость *Scapharca (Anadara) broughtoni* к дефициту кислорода (аноксии) хорошо известна [5, 343; 7, 299] и обусловлена не только биохимическими особенностями анаэробного пути обмена [5, 343; 6, 27], но и, очевидно, наличием эффективных систем защиты от окислительного повреждения.

Это позволяет рассматривать данного представителя морских двустворчатых моллюсков в качестве уникальной модели для изучения роли про- и антиоксидантных систем в реализации устойчивости к неблагоприятным условиям обитания.

В данной работе для создания аноксических условий для моллюска *S. broughtoni* был применен метод “выдерживания на воздухе [10, 269; 7, 299]. Основная цель этого подхода состоит в том, чтобы прояснить участие антиоксидантной системы в механизмах, ответственных за выживание в период аноксии/гипоксии с последующей реоксигенацией.

Материалы и методы. В работе использовали половозрелых особей (8-10 см) *Scapharca broughtoni*, собранных в апреле в прибрежной зоне Амурского залива (Японское море). Перед экспериментом моллюсков выдерживали в 140-л аквариумах не менее 7 дней. Экспериментальную аноксию создавали при выдерживании моллюсков *S. broughtoni* “на воздухе” (+4°C) с принудительно сомкнутыми створками раковин [9, 179] в течение 168 ч. После окончания эксперимента животных переносили в аэрируемый аквариум на 72 ч. (реоксигенация).

Через определенные промежутки времени (24, 72 и 168 часов) из экспериментальных групп отбирали по 7 экз. моллюсков для определения биохимических параметров: уровень интегральной антирадикальной активности (ИАА), содержание восстановленного глутатиона – ГСН и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (малонового диальдегида – МДА). В образцах каждой ткани (жабры и пищеварительная железа) проводили определение биохимических показателей в 4-х параллельных пробах.

Для оценки интегральной антирадикальной активности тканей использован метод, основанный на определении способности биологической системы нейтрализовать гидроксильный радикал [15, 2773; 8, 309]. Уровень восстановленного глутатиона регистрировали спектрофотометрически по реакции тиогруппы цистеина с реактивом Эллмана – дитионитробензойной кислотой [14, 67]. Содержание малонового диальдегида – продукта окислительной деградации жирных кислот, определяли непосредственно в тканях [4, 302] по цветной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Концентрацию белка в гомогенатах тканей определяли по абсорбции бромфенолового синего [11, 1725].

Все цифровые данные представляют собой среднее значение для четырех серий экспериментов \pm стандартное отклонение. 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. Установлено, что пребывание моллюсков в аноксических условиях (“на воздухе”) приводит к существенным изменениям общего потенциала антирадикального звена (ИАА) АО системы. При этом следует отметить относительно резкое падение ИАА в клетках жабр уже на ранних этапах пребывания моллюсков в неблагоприятных условиях, что свидетельствовало о высокой чувствительности этого важнейшего звена защитной системы. К завершению эксперимента уровень ИАА снизился на 70% и составил 603.3 ± 30.1 ед./мг белка ($p < 0.05$, $n=4$). В отличие от жабр, в клетках пищеварительной железы отмечена иная картина: в начале эксперимента уровень ИАА практически не менялся (2864.7 ± 143 ед./мг белка), но в последующий период проявлялась устойчивая тенденция к постепенному снижению ~ на 30% ($p < 0.05$, $n=4$). В период восстановления снабжения тканей кислородом (реоксигенации) в клетках жабр моллюска *S. broughtoni* наблюдалось частичное восстановление антиоксидантного потенциала (до 1115.2 ± 55.57 ед./мг белка), тогда как в клетках пищеварительной железы за этот период уровень ИАА достиг исходного значения (3029.41 ± 151.45 ед./мг белка).

В начальный период экспериментальной аноксии в клетках жабр было отмечено увеличение содержания восстановленного глутатиона от 7.61 ± 0.38 до 11.63 ± 0.58 мкг/мг белка ($p < 0.05$, $n=4$), но в дальнейшем уровень этого трипептида снизился до 8.93 ± 0.45 мкг/мг белка ($p < 0.05$, $n=4$). В процессе реоксигенации концентрация ГСН продолжала падать и к завершению эксперимента достигала уровня 4.78 ± 0.24 мкг/мг

белка. В клетках пищеварительной железы наблюдалась аналогичная тенденция, но в более резкой форме: в начале эксперимента содержание глутатиона увеличилось с 24.61 ± 1.23 до 53.68 ± 2.69 мкг/мг белка ($p < 0.05$, $n=4$). Но к завершению периода аноксии уровень GSH был в 4 раза ниже контрольного и составил 6.65 ± 0.33 мкг/мг белка ($p < 0.05$, $n=4$). В период реоксигенации концентрация восстановленного трипептида оставалась на низком уровне.

В аноксических условиях количество МДА в клетках жабр увеличилось с 4.86 ± 0.24 до 7.58 ± 0.38 нмоль/мг белка ($p < 0.05$, $n=4$), а в пищеварительной железе – от 2.7 ± 0.14 до 8.48 ± 0.43 нмоль/мг белка ($p < 0.05$, $n=4$). В процессе реоксигенации содержание МДА в клетках жабр снизилось до 6.24 ± 0.32 нмоль/мг белка, а в клетках пищеварительной железы осталось без изменений.

Обсуждение. *Scapharca broughtoni* – факультативный анаэроб, отличающийся от других видов двустворчатых моллюсков наличием в крови эритроцитов и большого количества гемоглобина (Hb) [23, 29]. Очевидно благодаря этому он проявляет очень высокую устойчивость к резким колебаниям концентрации кислорода, вплоть до аноксии. Как показали исследования [13, 6960; 1, 63], в период гипоксии усиливается автоокисление Hb, сопровождающееся генерацией активных форм кислорода (АФК). При длительной гипоксии/аноксии этот процесс может усиливаться за счет высвобождения ионов железа ($Fe^{2+/3+}$), которые через реакции Фентона приводят к образованию самого реакционного оксирадикала – гидроксильного радикала [·OH]. Нельзя исключить и еще один источник лабильных ионов железа при аноксии. Анаэробное брожение сопровождается накоплением конечных продуктов, способствующих “закислению” внутриклеточной среды. В свою очередь, снижение pH приводит к высвобождению ионов железа из белков, участвующих в транспорте и депонировании этого металла (ферритин, трансферрин и др.).

Учитывая, что антиоксидантные (АО) ферменты не принимают непосредственного участия в детоксикации гидроксильного радикала [·OH], следует ожидать, что у Hb-содержащего моллюска *S. broughtoni* в условиях аноксии-реоксигенации особое значение принадлежит низкомолекулярному антирадикальному звену АО системы. Это подтверждается результатами определения ИАА, уровень которого у этого вида моллюсков в несколько раз выше (в 2-4 раза), чем у исследованных двустворчатых моллюсков [16, 13; 2, 354], губок [18, 453; 19, 637], полихет [3, 353; 21, 1337], крабов [22, 67] и наземной улитки [20, 63]. У *S. broughtoni* выявлена общая закономерность в распределении АО потенциала (ИАА) в тканях и органах, свойственная другим видам моллюсков: уровни ИАА в пищеварительной железе, как правило, выше, чем в жабрах. Следует отметить, что у скафарки в начальный период аноксии ИАА сохранялся на высоком уровне и только к концу эксперимента постепенно снижался. При реоксигенации ИАА быстро восстанавливался в пищеварительной железе, практически до исходного уровня. В жабрах также отмечалась тенденция к восстановлению, но этот процесс проходил существенно медленнее. Эти результаты служат основанием для вывода, что в числе биохимических особенностей, увеличивающих адаптационные способности *S. broughtoni* к существованию в условиях гипоксии/аноксии, можно рассматривать и высокий антиоксидантный потенциал – ИАА.

Глутатион обладает способностью нейтрализовать супероксидный радикал [O_2^-] и таким образом заменять СОД [12, 219]. В случае *S. broughtoni* увеличение содержания GSH наблюдалось только в начальный период аноксии (особенно в пищеварительной железе), которое в дальнейшем сопровождалось устойчивым падением концентрации этого низкомолекулярного АО в обеих тканях. Примечательно также, что в период реоксигенации GSH оставался на низком уровне. Очевидно, у *S. Broughtoni* в период аноксии усиливается генерация АФК, в нейтрализации которых основная роль принадлежит глутатиону.

S. broughtoni, несмотря на высокий ОА потенциал, при аноксии испытывает окислительный стресс, о чем свидетельствует возросший уровень МДА. Интересно, что при восстановлении кислородного режима (реоксигенации) уровень МДА в пищеварительной железе оставался без изменений, а в жабрах даже несколько падал, хотя и сохранялся на более высоком уровне по сравнению с аноксией. Такое поведение деструкции липидов указывает на то, что моллюски, несмотря на окислительный стресс в период аноксии, способны противостоять такому своеобразному “инсульту”.

Мы полагаем, что у скафарки ключевая роль в детоксикации АФК принадлежит низкомолекулярному звену АО системы (т. е. неферментативному), так как в меньшей степени зависит от интенсивности метаболизма и источников энергии. По сути, использование низкомолекулярного звена АО – это типичный пример энергосберегающей стратегии адаптации к среде с варьирующими параметрами.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Abele-Oeschger D., Oeschger R. Hypoxia-induced autoxidation of haemoglobin of the benthic invertebrates *Arenicola marina* (Polychaeta) and *Astarte borealis* (Bivalvia) and the possible effects of sulfide // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1995. V. 187.
2. Bebianno M.J., Company R., Serafim A., Camus L., Cosson R.P., Fiala-Mredoni A. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields // *Aquat. Toxicol.* 2005. V. 75.
3. Bocchetti R., Fattorini D., Gambi M. C., Regoli F. Trace Metal Concentrations and Susceptibility to Oxidative Stress in the Polychaete *Sabella spallanzanii* (Gmelin) (Sabellidae): Potential Role of Antioxidants in Revealing Stressful Environmental Conditions in the Mediterranean // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2004. V. 46.
4. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, Eds. by Fleischer S., Packer L., N.Y.: Academic Press. 1978.
5. de Zwaan A., Cortesi P., van den Thillart G., Roos J., Storey K.B. Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia-tolerant marine molluscs: a biochemical analysis // *Mar. Biol.* 1991. V. 111.
6. de Zwaan A., Isani G., Cottani O., Cortesi P. Long-term metabolism of erythrocytes of the arcid clam *Scapharca inaequivalvis* // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1995. V. 187.
7. de Zwaan A., Eertman R.H.M. Anoxic or air survival of bivalves and other euroxic invertebrates as useful response to environmental stress a comprehensive review // *Comp. Biochem. Physiol.* 1996. V. 113 (C).
8. Dovzhenko N.V., Kurilenko A.V., Belcheva N.N., Chelomin V.P. Cadmium-induced oxidative stress in the bivalve mollusk *Modiolus modiolus* // *Russian J. Mar. Biol.* 2005. V. 31.
9. Eertman R.H.M., Wagenvoort A.J., Hummel H. and Smaal A.C. “Survival in air” of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1993. V. 170.
10. Eertman R.H.M., de Zwaan A. Survival of the fittest: resistance of mussels to aerial exposure. In: *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. Eds. by Kramer K.J.M // CRC Press, Boca Raton. 1994.
11. Greenberg C.S., Gaddock P.R. Rapid single-step membrane protein assay. *Clin. Chem.* 1982. V. 28 (7).
12. Hassoun E.A., Stohs S.J. Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A. 1 cell cultures // *Toxicology.* 1996. V. 112 (2-3).
13. Misra H.P., Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of haemoglobin // *J. Biol. Chem.* 1972. V. 247.

14. 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.

15. Regoli F., Winston G.W., Mastrangelo V. et al. Total oxyradical scavenging capacity in mussel *Mytilus* sp. as a new index of biological resistance to oxidative stress. *Chemosphere.* 1998. V. 37.

16. Regoli F., Nigro M., Bompadre S. Winston G.W. Total oxidant scavenging capacity (TOSC) of microsomal and cytosolic fraction from Antarctic, Arctic and Mediterranean scallops: differentiation between three potent oxidants // *Aquat. Toxicol.* 2000. V. 49.

17. Regoli F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress // *Aquatic Toxicol.* 2000. V. 50.

18. Regoli F., Cerrano C., Chierici E., Bompadre S., Bavestrello G. Susceptibility to oxidative stress of the Mediterranean demosponge *Petrosia ficiformis*: role of endosymbionts and solar irradiance // *Mar. Biol.* 2000. V. 137.

19. Regoli F., Nigro M., Chierici E., Cerrano C., Schiapparelli S., Totti C., Bavestrello G. Variations of antioxidant efficiency and presence of endosymbiotic diatoms in the Antarctic porifera *Haliclona dancoi* // *Mar. Environ. Res.* 2004. V. 58.

20. Regoli F., Gorbi S., Fattorini D., Tedesco S., Notti A., Machella N., Bocchetti R., Benedetti M., Piva F. Use of the Land Snail *Helix aspersa* as Sentinel Organism for Monitoring Ecotoxicologic Effects of Urban Pollution: An Integrated Approach // *Environ. Health Perspect.* 2006. V. 114.

21. Sandrini J. Z., Regoli F., Fattorini D., Notti A., Inacio A.F., Linde-Arias A.R., Laurino J., Bairy A.C.D., Marins L.F.F., Monserrat J.M. Short-term responses to cadmium exposure in the estuarine polychaete *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): subcellular distribution and oxidative stress generation // *Environ. Toxicol. Chem.* 2006. V. 25.

22. Weber R.E., Lykke-Madsen M., Bang A., de Zwaan A., Cortesi P. Effects of cadmium on anoxic survival, haematology, erythrocytic volume regulation and haemoglobin-oxygen affinity in the marine bivalve *Scapharca inaequivalvis* // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1990. V. 144.