

Истомина А.А., Довженко Н.В., Челомин В.П.
Тихоокеанский океанологический институт
им. В.И. Ильичева (Владивосток)

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

V. I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute Far Eastern Branch Russian Academy of Sciences (Vladivostok)

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.

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

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 – GSH 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 Элмана – дитионитробензойной кислотой [14, 67]. Содержание малонового диальдегида – продукта окислительной дегградации 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 ± 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 ГСН 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 [$\cdot OH$]. 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 рН 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 [$\cdot OH$], 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 [$O_2^{\cdot -}$] и таким образом заменять СОД [12, 219]. В случае *S. broughtoni* увеличение содержания ГСН 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. – P. 63-80.
2. Bebianno M.J., Company R., Serafim A., Camus L., Cosson R.P., Fiala-M'edoni A. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields // *Aquat. Toxicol.* – 2005. – V. 75. – P. 354-373.
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. – P. 353-361.
4. 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.
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. – P. 343-351.
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. – P. 27-37.
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). – P. 299-312.
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. – P. 309-313.
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. – P. 179-195.
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. – P. 269-284.
11. Greenberg C.S., Gaddock P.R. Rapid single-step membrane protein assay. *Clin. Chem.* – 1982. – V. 28 (7). – P. 1725-1726.
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). – P. 219-226.
13. Misra H.P., Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of haemoglobin // *J. Biol. Chem.* – 1972. – V. 247. – P. 6960-6962.
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. – P. 67-78.
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. – P. 2773-2783.

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. – P. 13-25.
17. Regoli F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress // *Aquatic Toxicol.* – 2000. – V. 50. – P. 351-361.
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. – P. 453-461.
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. – P. 637-640.
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. – P. 63-69.
21. Sandrini J. Z., Regoli F., Fattorini D., Notti A., Inacio A.F., Linde-Arias A.R., Laurino J., Bainy 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. – P. 1337-1344.
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 inaequalvis* // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* – 1990. – V. 144. – P. 29-38.