

РАЗДЕЛ III. НАУКИ О ЗЕМЛЕ. ГЕОГРАФИЯ

УДК 574.2

Бельчева Н.Н., Истомина А.А., Слободскова В.В., Челомин В.П.

*Тихоокеанский океанологический институт
им. В.И. Ильичева ДВО РАН (г. Владивосток)*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОМАРКЕРОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МОРСКОЙ СРЕДЫ

N. Belcheva, A. Istomina, V. Slobodskova, V. Chelomin
*V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch,
Russian Academy of Sciences, Vladivostok*

USE OF MOLECULAR BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS FOR THE EVALUATION OF MARINE POLLUTION

Аннотация. По показателям окислительного стресса и содержанию тяжелых металлов в пищеварительной железе и жабрах двусторчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* была проведена оценка качества морской среды. Для этой цели мидии были собраны из двух акваторий: в загрязненной бухте после завершения мероприятий по рекультивации полигона твердых бытовых отходов, расположенной на ее берегу, и в условно чистом районе. Показано, что наряду с комплексным анализом токсикантов (тяжелых металлов), показатели окислительного стресса могут служить чувствительными индикаторами физиологического состояния организма, отражающими условия его обитания.

Ключевые слова: загрязнение морской воды, тяжелые металлы, мидии, окислительный стресс.

Abstract. Biochemical indicators of oxidative stress and content of heavy metals in the digestive gland and gills of the bivalve *Crenomytilus grayanus* are used to assess marine pollution. For this purpose, the mussels were collected from two areas: in a polluted bay after the completion of activities of recultivation of domestic waste landfills located on the coast and in a relatively clean area. It is shown that in addition to the complex analysis of toxins (heavy metals) the indicators of oxidative stress may serve as sensitive indicators of the physiological state of the organism, which reflect the conditions of its habitat.

Key words: water pollution, heavy metals, mussels, oxidative stress.

Токсичные вещества, такие, как органические ксенобиотики и тяжелые металлы, могут проявлять свою токсичность через различные механизмы, в том числе и через усиление продукции активных форм кислорода (АФК), вызывая окислительное повреждение мембранных липидов, белков, нуклеиновых кислот. Поэтому молекулярные биомаркеры окислительного стресса, такие, как продукты окислительной дегградации биологических молекул и антиоксиданты, находят применение для выявления токсичного действия загрязняющих веществ [3, с. 588].

Настоящая работа посвящена исследованию возможности применения биохимических показателей окислительного стресса в полевых условиях для оценки комплексного влияния загрязнения на состояние морских гидробионтов. Для этого в тканях мидий *Crenomytilus grayanus* была определена активность основных антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и глутатионпероксидазы (ГП). Степень развития окислительного стресса в клетках оценивали по уровням деструкции ДНК и накопления продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА). В тканях также были определены концентрации тяжелых металлов (Fe, Zn, Cu, Cd и Pb).

Материалы и методы

Характеристика районов сбора мидий. Из двух акваторий залива Петра Великого Японского моря мидии *S. grayanus* были собраны в конце ноября 2010 г.: из бухты Алексеева (о-в Попова, Амурский залив) и бухты Горностай (Уссурийский залив), которые существенно отличались по степени антропогенной нагрузки. Бухта Алексеева характеризуется умеренным загрязнением, а бухта Горностай ранее длительно подвергалась многолетнему антропогенному воздействию. На берегу бухты Горностай с 1967 по 2010 гг. находился полигон твердых бытовых отходов (ТБО) г. Владивостока. По результатам мониторинга за 2008-2009 гг. содержание металлов в донных отложениях бухты во много раз превышало допустимые концентрации: например, содержание Hg было превышено в 1.8 раз, Pb – в 29 раз, Zn – в 25 раз, Cu – в 69 раз, Cr, Ni и Co – в 4.0, 3.3 и 1,5 раза, соответственно. Концентрация нефтепродуктов превышала ПДК в среднем в 5 раз в поверхностном и придонном слое бухты, а концентрация фенолов была превышена в среднем в 2 раза [2, с. 201]. Проведенные в 2010 г. комплексные мероприятия по рекультивации полигона позволили полностью «законсервировать» мусорную свалку к концу 2010 г.

Подготовка образцов для анализа. Для исследования были использованы жабры и пищеварительная железа моллюсков близкого размера в каждой выборке из бухт, состоящей из 20 особей. Ткани были отпрепарированы на льду и хранились при температуре -80°C. При определении металлов ткани объединяли от двух особей (три пробы), высушивали при температуре + 75°C до постоянного веса. Для определения биохимических параметров ткани от 3 мидий объединяли в одну пробу (всего 4 пробы для каждой выборки). Ткани гомогенизировали в охлажденном Трис-HCl буфере (0.05 М, pH 8.0; t = 0-4°C). Гомогенаты центрифугировали в течение 40 минут при 10800 g и температуре 4°C. В полученном супернатанте определяли содержание белка [7, с. 206] и активность антиоксидантных ферментов: СОД [9, с. 526], КАТ [13, с. 419] и ГП [8, с. 595].

Содержание МДА определяли по общепринятому методу [4, с. 302]. Количество ДК определяли спектрофотометрически (абсорбция при $\lambda = 232$ nm) после растворения липидных экстрактов в системе метанол-пентан (5:1, об/об). Изучение повреждений структуры молекулы ДНК проводили на клетках жабр. Для этого использовали метод Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE or Comet Assay) [5, с. 51], известный в отечественной литературе как «метод ДНК-комет» [1, с. 303]. Классификацию комет осуществляли визуально [6, с. 69], индекс генетического повреждения рассчитывали по методу Каваша и Конена [5, с. 154]. Тяжелые металлы анализировали методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии после минерализации тканей смесью концентрированных азотной и хлорной кислот (1:3, об/об).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Statistica.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ содержания металлов в тканях мидий показал, что содержание Mn и Zn значительно не различалось в тка-

Таблица 1

Содержание тяжелых металлов (мкг/г сухой массы) в тканях *S. grayanus**

Место сбора	Fe	Zn	Cu	Cd	Pb
		Пищеварительная железа			
б.Горностай	183.8±5.2****	147.1 ± 9.8	102.6 ± 5.1**	6.5 ± 0.2	86.8 ± 1.6
б.Алексеева	102.9±15.1	132.3 ± 9.5	14.1 ± 0.1	10.9 ± 1.2**	н.о.
		Жабры			
б.Горностай	78.9 ± 7.9	70.4 ± 16.2	28.9 ± 4.7**	0.7 ± 0.2	67.4 ± 17.1
б.Алексеева	71.5 ± 10.0	75.0 ± 5.8	4.5 ± 0.9	16.7 ± 4.3**	н.о.

* - среднее значение ± стандартное отклонение, n=3.

** - достоверные различия: n=3, p<0.05

нях мидий из двух биотопов (табл. 1). В тоже время, свинец был обнаружен только в тканях мидий из бухты Горностай – 86.8 и 67.4 мкг/г сухой массы в пищеварительной железе и жабрах, соответственно. Содержание Cu у мидий из бухты Горностай в пищеварительной железе было выше в 7 раз, а в жабрах – в 6,4 раза по сравнению с моллюсками из бухты Алексеева. Концентрация Fe в пищеварительной железе также была выше в 1,8 раза у мидий из бухты Горностай.

Необходимо отметить, что содержание Cd, наоборот, было выше в органах мидий из бухты Алексеева по сравнению с мидиями из бухты Горностай (табл. 1). Так как донные осадки бухты Горностай особенно сильно загрязнены Cu, Zn и Pb [2, с. 201], то высокое содержание металлов в осадке и, соответственно, в фильтруемой воде и взвеси, вероятно, создает конкуренцию при абсорции Cd клетками жабр и пищеварительной железы мидий.

Как показали биохимические исследования, у мидий из бухты Горностай наблюдалось повышение антиоксидантного потенциала в тканях, за счет увеличения активности КАТ на 40-60% и ГП на 80% в пищеварительной железе и жабрах соответственно (рис. 1). Согласно гипотезе Реголи с коллегами [10, с. 419] активация КАТ, которая разлагает H₂O₂,

предотвращает образование реакционного ОН радикала в реакции Фентона. Несмотря на то, что ГП также принимает участие в удалении H₂O₂, ее основная функция состоит в разрушении органических гидропероксидов и предотвращении продукции цитотоксичных ненасыщенных альдегидов и кетонов в процессах ПОЛ. Таким образом, увеличение активности КАТ и ГП в тканях мидий из бухты Горностай указывало на стимулирование процессов образования гидропероксидов в тканях под воздействием комплексного загрязнения морской среды, в том числе и тяжелых металлов.

Наряду с изменением активности антиоксидантных ферментов, неспецифическими показателями усиленного образования АФК являются также продукты окислительной дегградации компонентов клетки, в частности липидов и ДНК [11, с. 350]. Это положение подтверждают наши результаты определения продуктов перекисного окисления липидов в тканях моллюска *S. grayanus* из двух биотопов (рис. 1). При сравнительном анализе видно, что в исследованных тканях мидий из загрязненной акватории содержание первичных продуктов ПОЛ выше более чем на 30%, что свидетельствует об активации свободно-радикальных процессов. ПОЛ в мембранах инициируется в основном ОН радикалами,

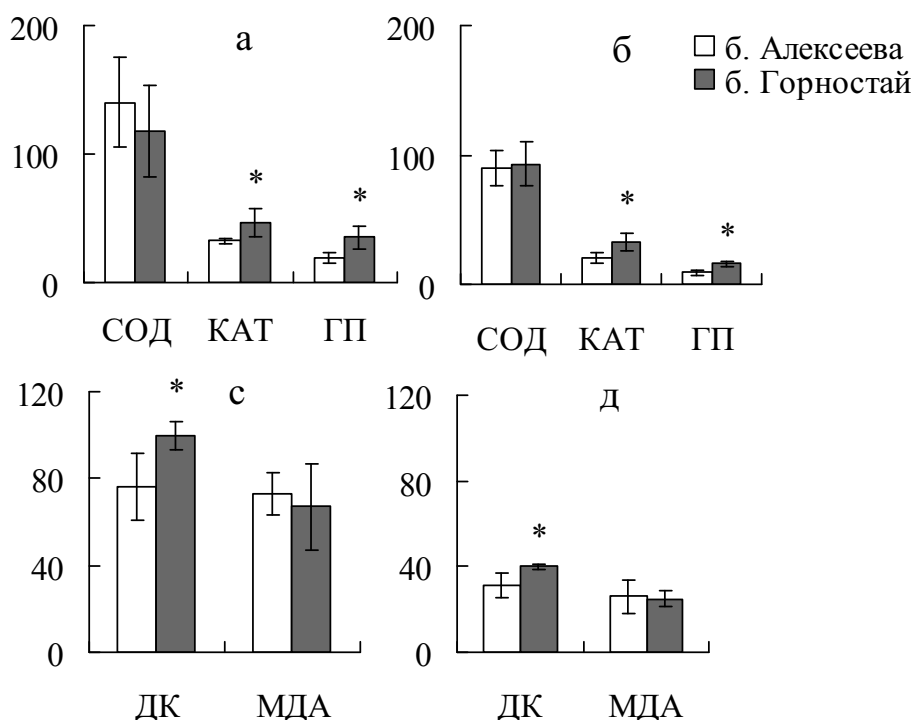


Рис. 1. Активность антиоксидантных ферментов и содержание продуктов перекисного окисления липидов в пищеварительной железе (а, в) и жабрах (б, д) *S. grauanus* из двух биотопов.

Обозначения: СОД (супероксиддисмутаза, ед. акт/мг белка), КАТ (каталаза, мкмоль/мин/мг белка), ГП (глутатионпероксидаза, нмоль/мин/мг белка*10), ДК (диеновые конъюгаты, мкмоль/г сырой массы*10), МДА (малоновый диальдегид, нмоль/мг белка*100); * - достоверные различия биохимических параметров в тканях мидий б. Алексеева и б. Горностай (n=4, p<0.05)

поэтому повышенный уровень ДК (продуктов ПОЛ, содержащих сопряженные двойные связи) в тканях мидий из бухты Горностай может быть обусловлен следующими причинами. Во-первых, степень активации КАТ не соответствует уровню продукции H_2O_2 ; во-вторых, эффективность системы детоксикации металлов недостаточна для полного связывания ионов металлов переменной валентности. Близкие уровни МДА в тканях мидий из обеих бухт, по-видимому, связаны с тем, что в пищеварительной железе и жабрах мидий из бухты Горностай повышена активность ГП.

Анализ изображений ДНК-комет клеток жабр мидий, собранных в разных биотопах, показал, что у моллюсков из бухты Горностай доминируют кометы, относящиеся к клас-

сам С3 и С4 (табл. 2), что указывает на значительные повреждения в молекуле ДНК. В тоже время, у моллюсков из бухты Алексеева, сформировались преимущественно кометы классов С0, С1 и С2, что характеризует клетки как жизнеспособные со слабо выраженными повреждениями ДНК. Рассчитанный на основе данной классификации индекс генетического повреждения (ИГП) [5, с. 154] также свидетельствует о том, что мидии из исследуемых акваторий испытывают разную степень негативной нагрузки. При этом значения ИГП у моллюсков, обитающих в акватории, непосредственно прилегающей к полигону ТБО, выше в 1,3 раза (табл. 2). Из приведенных данных видно, что количество мигрированной ДНК в «хвост», а также длина самого «хвоста» комет в клетках жабр *S.*

Таблица 2

Основные параметры ДНК-комет клеток жабр *S. grayanus*, обитающих в разных районах зал. Петра Великого*

Место обитания	Класс комет (%)					Индекс генетического повреждения (ИГП)	Повреждение ДНК	
	C0	C1	C2	C3	C4		Длина «хвоста» кометы (px)	% ДНК в «хвосте» кометы
б. Алексеева	11	16	45	19	0	1.99	7.7±	
б. Горностай	0	7	14	28	51	3.23	102.0±	

* - среднее значение ± стандартное отклонение, n – 15 животных по 50 комет; C0-C4 – классы повреждения комет; px – длина хвоста в пикселях.

** – достоверное отличие ($P \leq 0.05$, $n=750$) по сравнению с мидиями из б. Алексеева, достоверность различий оценивалась с использованием непараметрического критерия Даннета.

grayanus из бухты Горностай были почти в 2 и 4 раза, соответственно, выше, чем у моллюсков из бухты Алексеева.

Из представленных результатов (табл. 2) обращает на себя внимание высокая гетерогенность комет, которые образуют ДНК-клетки жабр моллюсков из бухты Горностай, что также, в определенной степени, свидетельствует о негативном воздействии неблагоприятных факторов среды. Если у моллюсков из бухты Алексеева для основной массы комет доля ДНК, мигрирующей из ядра в «хвост» кометы, составляет 5–14%, то в клетках моллюсков из загрязненной акватории основная масса комет по этому показателю распределяется в диапазоне от 25 до 50%. Полученные с помощью метода ДНК-комет экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в бухте Горностай присутствуют в повышенных концентрациях химические вещества, проявляющие генотоксические свойства, вызывая резкое увеличение повреждений в геноме клеток жабр.

В целом наши результаты показали, что концентрации металлов в тканях мидий являются чувствительными индикаторами повышенного содержания металлов в морской среде. В тоже время тяжелые металлы, осо-

бенно Си и Рb, являющиеся составной частью комплексного загрязнения бухты Горностай, накапливаясь в тканях моллюсков, приводят к дезорганизации биохимических систем. Повышенный уровень продуктов окислительной деструкции ДНК и перекисного окисления липидов (ДК), а также увеличенная активность антиоксидантных ферментов (КАТ и ГП) в тканях мидий из бухты Горностай указывают на то, что токсичность этих поллютантов проявилась через стимуляцию образования АФК и развитие окислительного стресса. Негативные последствия окислительного стресса выражаются в комплексе системных перестроек мембранных структур клетки (через ПОЛ) и в дестабилизации и разрушении генома клетки. Приведенные результаты дают основания полагать, что аккумуляция ксенобиотиков привела к стимуляции деструктивных процессов, превышающих адаптационно-детоксикационные возможности биохимических систем. В связи с этим необходимо подчеркнуть, что показатели окислительного стресса могут служить чувствительными индикаторами физиологического состояния организма, отражающими условия его обитания.

Таким образом, при оценке экотоксикологической ситуации морских акваторий пред-

ставляется целесообразным использовать не только химический анализ поллютантов в различных звеньях экосистемы, но и широко применять молекулярные подходы, позволяющие получить интегральную характеристику физиологического состояния животных на основе различных параметров окислительного стресса, что существенно повысит научную обоснованность выводов в программах мониторинга морской среды.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Слободскова В.В. Оценка генотоксичности кадмия в клетках жабр двустворчатого моллюска *Corbicula japonica* с помощью метода ДНК-комет / В.В. Слободскова, Е.Е. Солодова, Е.Н. Слинько и др. // Биол. моря. – 2010. – Т. 36 (№ 4). – С. 303–308.
2. Яцук А.В. Яцук А.В. Мониторинг загрязнения акватории Уссурийского залива в зоне влияния полигона твердых бытовых отходов г. Владивостока // Проблемы экологии морского шельфа: материалы Всерос. науч. конф., 16–22 сентября 2010. – Владивосток: ДВФУ, 2010. – С. 201–203.
3. Almeida E.A. Oxidative Stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage / E.A. Almeida, A.C.D. Bairy, A.M.P. Loureiro et al. // Comp. Biochem. Physiol. – 2007. – Vol. 146A. – P. 588–600.
4. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // Methods in Enzymology / Eds. by S. Fleischer, L. Packer. – New York: Academic Press, 1978. – P. 302–310.
5. Cavas T., Konen S. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay // Aquat. Toxicol. – 2008. – Vol. 90. – P. 154–159.
6. Collins A.R., Ma A.G., Duthie S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells // Mutation Res. – 1995. – Vol. 336. – P. 69–77.
7. Markwell M., Haas S., Bieber L., Tolbert N. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples / M. Markwell, S. Haas, L. Bieber et al. // Anal. Biochem. – 1978. – Vol. 87. – P. 206–210.
8. Mates J.M., Perez-Gomez C., Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases // Clin. Biochem. – 1999. – Vol. 32. – P. 595–603.
9. Paoletti F. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase in tissue extracts / F. Paoletti, D. Aldinuccio, A. Mocali et al. // Anal. Biochem. – 1986. – Vol. 154. – P. 526–541.
10. Regoli F. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach / F. Regoli, S. Gorbi, G. Frenzilli et al. // Mar. Environ. Res. – 2002. – Vol. 54. – P. 419–423.
11. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. – London: Academic Press Limited, 1991. – 650 p.