

УДК 594.1

Гханнам Хала Ельшахат Абделькадер
Астраханский государственный университет

**РЕАКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ПРОЦЕССЕ
АДАПТАЦИИ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ *UNIO PICTORUM***

Ghannam Xala Elshahat Abdelkader
Astrakhan State University

**REACTIONS OF OXIDATIVE STRESS IN THE PROCESS OF
ADAPTING MOLLUSK *UNIO PICTORUM***

Аннотация. В работе анализируются реакции окислительного стресса мышечной ткани двустворчатых моллюсков *Unio pictorum*. Установлено, что результатом техногенного загрязнения является увеличение процесса самоокисления и, как следствие, – формирование реактогенных соединений (ТБК-активных продуктов). Показано, что одним из ферментов, имеющих большое значение для детоксикации свободных радикалов, является каталаза, разрушающая перекись водорода. Зависимость активности фермента в мышечной ткани моллюсков от концентрации нефти в воде носит синусоидный характер. Причем минимальное и максимальное значения (до внесения и после внесения сорбента в среду обитания) относятся к пробам с концентрацией нефти 1 мг/л. Добавление сорбента в аквариумы уменьшало каталазную активность ($p < 0,01$), что может трактоваться как снижение окислительного стресса у моллюсков.

Ключевые слова: окислительный стресс, ТБК-активные продукты, каталазная активность, техногенное загрязнение, моллюски *Unio pictorum*.

Abstract. This article analyzes the response to oxidative stress, muscle tissue mollusks *Unio pictorum*. It is found that the result of man-made pollution is the increase of the oxidative stress and, as a result the formation of active compounds (TBA-active products). It is shown that one of the enzymes for detoxication of free radicals is katalaza which is destructive for hydrogen peroxide. The dependence of enzyme activity in the muscle tissue of mollusks from the concentration of oil in water is sinusoidly, and minimum and maximum values (before and after making a sorbent in habitats) are samples of oil concentration 1 mg/l. Adding sorbent in aquariums reduces katalaza activity ($p < 0.01$) that is interpreted as reducing oxidative stress in clams.

Key words: oxidative stress, TBA-active products, katalaza activity, technogenic pollution, mollusk *Unio pictorum*.

Проблема устойчивости организма, его адаптация к изменяющимся условиям среды обитания остается одной из центральных проблем биологии. Адаптация обеспечивается деятельностью целого комплекса механизмов, среди которых важную роль играют физиологические механизмы, лежащие в основе развития компенсаторных реакций клетки в ответ на действие неблагоприятных факторов среды. Благодаря прикрепленному образу жизни, моллюски обладают широким спектром адаптаций на молекулярном, биохимическом, клеточном, физиологическом, поведенческом, популяционном и других уровнях организации к воздействию различных неблагоприятных факторов [1; 4; 7]. В настоящее время, наряду с абиотическими факторами среды, значительное влияние на водные организмы оказывают антропогенные воздействия, в том числе загрязнения водных акваторий нефтепродуктами. *Unio pictorum*, как и большинство двустворчатых моллюсков, выработали комплекс адаптаций на различных уровнях организации, позволяющий им выживать в условиях загрязнения нефтью и ее продуктами. Несмотря на то, что нефть по степени токсичности определена как

менее опасная для гидробионтов по сравнению с тяжелыми металлами и некоторыми другими органическими загрязнителями, воздействие её на обитателей моря нельзя недооценивать [3; 8].

Нефть представляет собой сложную смесь углеводородов и их производных, при этом в нефтяной пленке нередко аккумулируются тяжелые металлы, которые накапливаясь в организме гидробионтов, могут вызывать нарушения клеточного метаболизма. В последнее время их принято рассматривать как фоновый уровень загрязнения при мониторинге нефтегазовых разработок на шельфе. Цитотоксичность металлов обусловлена, главным образом, тремя взаимосвязанными механизмами: усилением перекисного окисления липидов, угнетением митохондриального дыхания и нарушением кальциевого гомеостаза клетки. Содержащиеся в водных системах ионы тяжелых металлов поглощаются организмами главным образом непосредственно из воды, а загрязнение организмов соответствует их способности адсорбировать ионы из воды, а не их положению в цепи питания. Особое место в ряду тяжелых металлов занимает медь, которая, с одной стороны, встречается в большом количестве ферментов, например, в цитохромоксидазе, супероксиддисмутазе и в переносящем кислород белке – гемоцианине. В крови большинства моллюсков и членистоногих медь используется вместо железа для транспорта кислорода. С другой стороны, при определенных концентрациях медь может оказывать токсическое воздействие [7].

Имеющиеся в литературе сведения о модификациях липидного состава и некоторых других физиологических показателей моллюсков в присутствии нефтепродуктов не достаточны для создания полной картины, описывающей ответную реакцию организма на такое антропогенное воздействие [5; 10]. В связи с тем, что одним из первичных звеньев реакции организма на стрессорное воздействие считается усиление процессов перекисного окисления липидов и истощение физиологической антиоксидантной

защиты организма, целью нашего исследования явилось изучение уровня ТБК-активных продуктов и каталазной активности в мышечной ткани двустворчатых моллюсков в присутствии токсиканта. Кроме того, нами также рассматривалось изменение этих показателей после внесения в аквариумы сорбента.

Материалы и методы

В качестве тест-объектов были использованы моллюски *Unio pictorum*, которые являются высокочувствительным объектом для гидробиологических исследований. Моллюски содержались в 70-литровых аквариумах с грунтом – песок при одинаковых условиях освещения, температуры и аэрации. Концентрация нефти в емкостях составляла 0,5; 1 и 1,5 мг/л соответственно, что в 10, 20 и 30 раз превышает ПДК для рыбохозяйственных водоемов. Контролем служили особи в аналогичных емкостях с отстоянной и аэрированной водой без добавления нефти. Параллельно мы определили фоновую концентрацию иона меди в воде аквариумов атомно-абсорбционным методом по ГОСТ Р52180-03. Используемые в исследованиях в качестве сорбента опоки Каменоярского месторождения Черноярского района Астраханской области имеют следующий состав (%) SiO_2 -86.2 Al_2O_3 -4.15; Fe_2O_3 -1.56; TiO_2 -0.2; K_2O -1.2; CaO -1; Na_2O до 0.5; MgO до 1; SiO_3 до 0.72. Другие элементы присутствуют в незначительных количествах. В эксперименте были использованы опоки, размолотые промышленным способом.

Для проведения наших исследований раковину моллюсков отделяли от мягких тканей. В экспериментах использовалась мышечная ткань (нога моллюсков), из которой предварительно готовили экстракт. Для каждого исследования отбирали не менее десяти моллюсков из каждого аквариума. Гомогенаты получали, объединяя органы трех особей, что существенно снижало коэффициент вариации показателей ферментативной активности. Содержание ТБК-активных

продуктов в моллюсках проводили по методу Uchiyama et al., 1980, который заключается в том, что продукты перекисного окисления липидов образуют с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) окрашенный комплекс, экстрагируемый бутанолом [6]. Принцип метода спектрофотометрического измерения активности каталазы основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс [2]. Интенсивность окраски измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм против контрольной пробы, в которую вместо перекиси водорода вносили 2 мл дистиллированной воды.

Активность каталазы рассчитывали по формуле:

$$E = (A_{хол} - A_{оп}) * V * t * K \text{ (мкат/л)}, \text{ где:}$$

E – активность каталазы в мкат/л

$A_{хол}$ и $A_{оп}$ – экстинция холостой и опытной проб,

V – объем вносимой пробы, t – время индукции,

K – коэффициент миллимолярной экстинции перекиси водорода, равный $22,2 * 10^3 \text{ mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}$.

Результаты и обсуждение

Проведенные эксперименты показали, что концентрация 0,5 мг/л нефти в среде не приводила к существенному увеличению количества ТБК-активных продуктов. Пробы до и после внесения опок различаются несущественно ($15,71 \pm 0,1$ мкг/кг против $14,35 \pm 0,08$ мкг/мл), и каждая, в свою очередь, мало отличается от контрольных ($15,89 \pm 0,12$ мкг/кг до внесения сорбента и $15,83 \pm 0,11$ после внесения опок в аквариумы). Увеличение количества ТБК-активных продуктов в пробах мышечной ткани моллюсков без добавления опок резко возрастает при увеличении концентрации нефти в воде (1 мг/л) до $27,69 \pm 0,28$ мкг/кг ($p < 0,05$) и далее увеличивается, но уже менее существенно при доведении концентрации нефти в среде до 1,5 мг/л (концентрация ТБК-активных продуктов составила $28,51 \pm 0,3$ мкг/кг). В том случае, если

в воду были внесены опок, концентрация ТБК-активных продуктов при концентрации нефти в среде 1 мг/мл также существенно повышалась, до $20,41 \pm 0,2$ мкг/кг, однако потом наступало резкое их снижение вплоть до $13,33 \pm 0,07$ мкг/кг, при концентрации нефти 1,5 мг/л.

Показателен тот факт, что достоверными по сравнению с контролем можно считать показатели накопления ТБК-активных продуктов в тканях моллюсков из аквариумов без добавления опок при концентрации нефти в среде 1 и 1,5 мг/л, а с внесенными опоками только в среде с нефтью в концентрации 1 мг/л ($p < 0,05$). При этом между собой с достоверностью ($p < 0,05$) различаются пробы с опоками и без только в случае, если нефть взята в концентрации 1 мг/л. В то же время тенденция уменьшения содержания ТБК-активных продуктов в пробах мышечной ткани моллюсков, содержащихся с опоками, сохраняется во всех использованных в эксперименте концентрациях нефти. Возможно, это связано с колебаниями концентрации меди в воде аквариумов. Было установлено, что содержание иона меди в воде составило в контроле до сорбции 0,018 мг/л, после сорбции – 0,0055 мг/л. В аквариумах с концентрацией нефти 0,5 мг/л содержание иона меди до сорбции составляло 0,015 мг/л, после внесения сорбента – 0,0049 мг/л; при концентрации нефти в воде 1 мг/л концентрация меди составила 0,027 мг/л и 0,0041 мг/л соответственно; при концентрации нефти в воде 1,5 мг/л уровень иона меди составлял 0,019 мг/л до сорбции и 0,0049 мг/л после внесения опок. Именно до внесения сорбента при концентрации нефти в среде 1 мг/л фоновая концентрация меди в аквариуме была наивысшей и с достоверностью $p < 0,05$ отличалась от всех остальных.

Одним из ферментов, имеющих большое значение для детоксикации свободных радикалов, является каталаза, наряду с глутатионпероксидазным циклом разрушающая перекись водорода. Достоверность разности показателей между пробами тканей моллюсков, обитавших в воде с опоками и без, выявляется уже в контрольных вариантах

($p < 0,01$). Каталазная активность в контроле с опоками составляет только 37,5% от контроля без внесенного сорбента. Далее высокая достоверность различий сохраняется во всех пробах. В варианте с концентрацией 0,5 мг/л нефти в среде наличие опок в воде приводит к снижению каталазной активности на 60%. Если же концентрация нефти составляла 1,5 мг/мл, снижение каталазной активности в присутствии опок достигало 75% (табл. 1).

Снижение ферментативной активности в концентрации нефти 0,5 мг/л, по сравнению с контрольными данными, характерное для каталазной активности соответствует, на наш взгляд, первой фазе адаптивного ответа организма на стрессорное воздействие, известный как «эффект затаивания».

Вторая фаза адаптации моллюсков *Unio pictorum* в пробах с более высоким уровнем нефти в среде (1,0 мг/л), характеризуется рос-

Таблица 1

Каталазная активность (в кат/л) в мышечной ткани моллюсков

Концентрация нефти мг/л	Каталазная активность		Достоверность
	до сорбции	после сорбции	
0,5	66,6±0,19	26,64±0,14	$p < 0,05$
1	13,32±0,16	133,2±0,64	$p < 0,001$
1,5	53,28±0,18	13,32±0,16	$p < 0,01$
Контроль	106,56±0,45	39,96±0,11	$p < 0,01$

Очевидно, что «переломной» для адаптации организма моллюсков является концентрация нефти в среде 1 мг/л. Кривая изменения каталазной активности независимо от того, были внесены опоки или нет, имеет параболический характер, причем эти параболы практически зеркальны друг другу, и соответственно минимальная (без опок) и максимальная (с опоками) величина каталазной активности находится в точке, где отображены результаты проб мышечных тканей, отобранных из аквариума с концентрацией нефти 1 мг/л.

Выводы

Проведенные исследования показали, что следствием техногенного загрязнения, увеличивающего процесс самоокисления, является формированием реактогенных соединений (ТБК-активных продуктов). Изменение этого показателя после внесения сорбента имело вид волнообразной кривой с тенденцией к повышению активности, при нарастании концентрации нефти в воде сверхнормального уровня с затухающей затем амплиту-

том ферментативной активности, которая может продолжаться разное время и характеризоваться либо стабилизацией процессов жизнедеятельности (адаптация моллюсков к изменившимся условиям), либо сопровождаться изменениями функциональных показателей с постепенно затухающей амплитудой и переходить в третью фазу реакции организма на стрессорное воздействие – фазу угнетения (при концентрации нефти 1,5 мг/л), которая сопровождается прогрессирующим уменьшением физиологических и биохимических показателей.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Алымов В.Т. Техногенный риск. Анализ и оценка / В.Т. Алымов, Н.П. Тарасова // М.: ИКЦ «Академкнига», 2004. 118 с.
2. Батян А.Н. Основы общей и экологической токсикологии / А.Н. Батян, Г.Т. Фрумин, В.Н. Базылев // СПб: Изд-во СпецЛит, 2009. 352 с.
3. Патин С.А. Нефть и экология континентального шельфа / С.А. Патин // М.: Изд-во ВНИРО, 2001. 247 с.
4. Roesijadi G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals / G. Roesijadi // Aquat. Toxicol. 1992. Vol. 22. № 2. P. 81-114.

5. Stohs S.J., Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions Free Rad. Biol. Medic. 1995. Vol. 18. 2. P. 312-320.
6. Ties Norbert W. Clinical guide to laboratory tests/ Norbert W. Ties. W.B. Saunders Company. 1995. 942 p.
7. Torres M.A., Testa C P., Gaspari C, Masutti M. B., Panitz C. M. N., Curi-Pedrosa R., De Almeida E. A., Di Mascio P., Filho D. W. Oxidative stress in mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil Mar. Poll. Bullet. 2002. Vol. 44. P. 923-926.
8. Tribble D.L., Jones D.P. Oxygen dependence of oxidative stress. Rate of NADPH supply for maintaining the GSH pool during hypoxia Biochem. Pharmac. 1990. Vol. 39. P. 729-736.
9. Winston G.W., Regoli F., Dugas A.J., Jr., Fong J.H., Blanchard K.A. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids Free Radical Biology and Medicine. 1998. Vol. 24 №.3. P. 480-493.

УДК 34.29

Джанибекова З.С.

Карачаево-Черкесский государственный университет (г. Карачаевск)

Иванов А.Л.

Ставропольский государственный университет

АНАЛИЗ ЭНДЕМИЗМА И РЕЛИКТОВОСТИ СЕМЕЙСТВА BORAGINACEAE JUSS. ФЛОРЫ РОССИЙСКОГО КAVKAZA

Z. Janibekova

Karachaevo-Cherkessk State University, Karachaevsk

A. Ivanov

Stavropol State University

ANALYSIS OF ENDEMICAL AND RELICTS SPECIES FAMILIES BORAGINACEAE JUSS. FLORAE OF THE RUSSIAN CAUCASUS

Аннотация. В статье приводятся сведения об эндемичных и реликтовых видах семейства Boraginaceae Juss. флоры Российского Кавказа, включающего 94 вида, среди которых насчитывается 5 эндемичных и 6 субэндемичных видов. Констатируется, что подавляющее большинство эндемичных и субэндемичных видов семейства в своей генетической основе имеют кавказские корни, а наличие эндемичного рода *Trigonocarum* и представителя монотипного ряда *Nonea alpestris* свидетельствует об интенсивных процессах видообразования, связанных с орографическими особенностями. Реликтовые виды делятся на две группы: гляциальные и ксеротермические, подразделяемые на комплексы разного географического происхождения, которые в основном локализованы в двух макрорефугиумах – Причерноморском и Прикаспийском.

Ключевые слова: эндемик, субэндемик, реликт, флорогенез, рефугиум.

Abstract. In the article the data concerning the endemical and relicts kinds of family Boraginaceae Juss are presented. Florae of the Russian Caucasus includes 94 kinds among which 5 are endemical and 6 are subendemical kinds. It is stated that the overwhelming majority of endemical and subendemical family kinds in the genetic basis have the Caucasian roots, and presence of endemical genus *Trigonocarum* and the representative of monotypes of *Nonea alpestris* testifies the intensive processes of speciation connected with orographical features.

Relic kinds are made by two groups: glacial and xerothermical, subdivided into complexes of a different geographical origin which basically are localized in two macrorefuges – about the Black and Caspian Sea.

Key words: endemic, subendemic, relict, florogenesis, refuge.