

УДК 577.1:577.41

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

Учреждение Российской академии наук Тихоокеанский
океанологический институт им. В.И. Ильичева
Дальневосточного отделения РАН (Владивосток)

**РАЗДЕЛЬНОЕ И СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ
НЕДОСТАТКА КИСЛОРОДА И МЕДИ
НА АНТИОКСИДАНТНУЮ
СИСТЕМУ *LITTORINA MANDSCHURICA****

A. Istomina, N. Dovzhenko, N. Belcheva, V. Chelomin

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

**SINGLE AND COMBINED EFFECTS OF HYPOXIA/ANOXIA AND COPPER
ON ANTIOXIDANT SYSTEM OF *LITTORINA MANDSCHURICA***

Аннотация. В лабораторных условиях было исследовано раздельное и совместное действие гипоксии/аноксии и меди на антиоксидантную систему брюхоного моллюска *Littorina mandschurica*. В гепатопанкреасе моллюска определены активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы, уровень глутатиона, интегральная антирадикальная активность. Степень окислительного повреждения оценена по уровню малонового диальдегида. Показано, что совместное действие гипоксии/аноксии и меди усилило развитие окислительного стресса в организме моллюска.

Ключевые слова: гипоксия/аноксия, медь, антиоксидантная система, окислительный стресс.

Abstract. The single and combined effects of hypoxia/anoxia and copper on antioxidant system of *Littorina mandschurica* were evaluated under laboratory conditions. Activities superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, the levels of glutathione, total antioxidant activity (ABTS method) were assayed in hepatopancreas. Peroxidative damage level was assessed by determining malondialdehyde. The results showed that combined effects of hypoxia/anoxia and copper increase oxidative stress in molluscs.

Key words: hypoxia/anoxia, copper, antioxidant system, oxidative stress.

Интенсивная хозяйственная деятельность в прибрежной зоне и вдоль рек, впадающих в закрытые заливы, приводит к изменениям в гидрохимическом режиме вод, способствует таким нежелательным явлениям, как эвтрофикация и гипоксия. Эти явления в свою очередь могут приводить к серьезным нарушениям в водных экосистемах [17, 35]. Кроме того, на жизнедеятельность морских организмов влияет присутствие в морской воде различных токсичных веществ, таких, как тяжелые металлы, полициклические ароматические углеводороды, поверхностно-активные вещества, пестициды и др. Среди тяжелых металлов медь отличается высокой токсичностью в отношении живых организмов. С одной стороны, медь является физиологически важным элементом и входит в состав ряда белков и ферментов, играя при этом важную роль в метаболизме. С другой стороны, медь может способствовать образованию активных форм кислорода в клетках (АФК), а также вызывать окисление сульфгидрильных групп ферментов, инактивируя их [4, 319].

В ряде работ показано, что повреждающий эффект некоторых токсичных веществ, в том

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

числе и тяжелых металлов, усиливается на фоне изменений естественных факторов среды. Так, например, выживаемость *Mytilus edulis* в аноксичных условиях заметно сокращается при аккумуляции Cd в мягких тканях моллюска [19, 259]. Одновременное воздействие гипоксии и аммонийного азота вызывает нарушение лизосомальной целостности гемоцитов у *Perna viridis* на 70%, что почти в 2 раза больше, по сравнению с отдельным действием этих факторов [7, 2052].

Вследствие этого при нарастающем поступлении загрязняющих веществ в морскую среду необходимо обращать особое внимание на степень изменения естественных факторов среды, таких, как содержание кислорода, соленость, температура и др.

В норме в клетках и тканях аэробных организмов всегда образуются АФК ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} и др). Эти соединения высокореактивны и вызывают окислительное повреждение биологически важных молекул, таких, как ДНК, белков, липидов. У всех организмов присутствует антиоксидантная (АО) система, представленная специфическими ферментами и низкомолекулярными компонентами (антиоксидантами), которая сдерживает разрушительное действие АФК. Разнообразные факторы, например экстремальные абиотические факторы среды, такие, как гипоксия [6, 52] или чужеродные химические вещества органической и неорганической природы (поллютанты), усиливают генерацию АФК [3, 617], в результате чего нарушаются механизмы функционирования биохимических систем, что неизбежно ведет к развитию окислительного стресса.

В данной работе мы исследовали отдельное и совместное действие гипоксии/аноксии и меди на компоненты антиоксидантной системы у брюхоногого моллюска *Littorina mandschurica*. Литторина обитает на литорали и подвержена постоянному ежедневному изменению условий обитания, что связано с приливно-отливными циклами.

Для оценки воздействия повреждающих факторов были выбраны следующие показатели АО системы клетки: активность антиокси-

дантных ферментов – супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), глутатион-S-трансфераза (GST) и глутатионредуктаза (ГР); уровень интегральной антирадикальной активности (ИАА) и содержание низкомолекулярного антиоксиданта – глутатиона. О степени развития окислительного стресса в клетках судили по накоплению продукта перекисного окисления липидов (малонового диальдегида – МДА).

Материалы и методы

В работе использовали особей *L. mandschurica*, собранных в сентябре 2008 г. в б. Прибойная залива Восток (Японское море). Перед экспериментом моллюсков выдерживали в аквариуме в течение суток. Эксперимент состоял из трех серий опытов: 1-я серия – гипоксия/аноксия – выдерживание моллюсков на воздухе при комнатной температуре в течение 30 часов; 2-я серия – выдерживание в воде с $CuSO_4$ (25 мкг/л воды) в течение 2-х недель; 3-я серия – выдерживание в воде с $CuSO_4$ (25 мкг/л воды) в течение 2-х недель с последующей гипоксией/аноксией 30 часов. После каждой серии эксперимента гепатопанкреас от 10 моллюсков объединяли (1 проба) и проводили определение биохимических показателей в 4-х параллельных пробах.

Оценка ИАА антиоксидантов проводилась по их способности ингибировать (восстанавливать) радикал-катион АВТС⁺ (2, 2'-азинобис (3-этилбензотиазолин 6-сульфонат). ИАА выражали в единицах тролокса [16, 1231]. Активность СОД определяли по способности ингибировать реакцию окисления НАДФН, вызванную супероксидным радикалом [14, 526]. Активность КАТ определяли по способности разлагать перекись водорода [15, 143]. Активность ГР определяли по способности восстанавливать окисленную форму глутатиона с использованием НАДФН в качестве восстановителя [15, 143]. Активность GST определяли по методу, описанному Хабигом с соавторами [9, 398]. Концентрацию восстановленного глутатиона определяли спектрофотометрически по

реакции тиогруппы цистеина с реактивом Элмана – дитионитробензойной кислотой [13, 67]. Содержание МДА определяли непосредственно в тканях [5, 302] по цветной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой. Для определения содержания белка в гомогенатах тканей был использован метод Лоури [12, 266]. Калибровочные кривые строили по растворам бычьего сывороточного альбумина, концентрации которого рассчитывали на основе коэффициента молярной экстинкции.

Все цифровые данные представляют собой среднее значение для четырех серий экспериментов \pm стандартное отклонение ($M \pm m$). 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

Результаты проведенных экспериментов показали, что при экспериментальной гипоксии/аноксии из исследованных антиоксидантных ферментов у *L. mandschurica* увеличилась активность СОД (от $93 \pm 3,3$ до 196 ± 22 ед. ак/мг белка) и ГР (от $3,95 \pm 0,4$ до $5,97 \pm 0,3$ нмоль/мин/мг белка), в то время как активность GST осталась неизменной и составила 890 ± 220 нмоль/мин/мг ($p < 0,05$, $n=4$). При анализе данных по антирадикальному звену АО системы было показано, что в период пребывания моллюска в анаэробных условиях увеличился не только уровень глутатиона (от 122 ± 32 до 276 ± 46 нмоль/г сырого веса), но и уровень ИАА вырос практически в 2 раза (от 312 ± 56 до 635 ± 24 ед.т./мг белка). Вместе с тем концентрация МДА увеличилась почти на 60 % и составила $19,3 \pm 0,4$ нмоль/г сырого веса ($p < 0,05$, $n=4$).

В условиях воздействия меди активность СОД увеличилась от $93 \pm 3,3$ до 188 ± 35 ед. ак/мг белка ($p < 0,05$, $n=4$), но неизменной при этом оставалась активность КАТ (290 ± 76 мкмоль/мин/мг белка), ГР ($4 \pm 0,5$ нмоль/мин/мг белка) и GST (834 ± 94 нмоль/мин/мг белка).

Воздействие меди не оказало заметного влияния на уровень ИАА (288 ± 26 ед.т./мг белка) и содержание глутатиона (124 ± 32 нмоль/г сырого веса) у литторины. Наряду с этим уровень МДА увеличился на 50% и составил $18,0 \pm 0,2$ нмоль/г сырого веса ($p < 0,05$, $n=4$).

При гипоксийно-аноксийных условиях у моллюска, испытывавшего воздействие меди, активность СОД снизилась на 25% и составила 70 ± 10 ед. ак/мг белка ($p < 0,05$, $n=4$). В то же время, активность ГР увеличилась в 2,5 раза и составила $9,97 \pm 1,0$ нмоль/мин/мг белка. Активность GST осталась практически без изменений и составила 886 ± 130 нмоль/мин/мг белка.

В этой серии экспериментов у моллюска изменялись как индекс суммарной активности антирадикального звена АО системы (ИАА), так и уровень одного из основных низкомолекулярных антиоксидантов – глутатиона. К концу эксперимента показатель ИАА увеличился более чем на 80% и составил 575 ± 53 ед.т./мг белка ($p < 0,05$, $n=4$), тогда как уровень глутатиона, напротив, снизился почти на 50% и составил 63 ± 07 нмоль/г сырого веса ($p < 0,05$, $n=4$). Уровень МДА увеличился почти на 70% и составил $20,0 \pm 0,9$ нмоль/г сырого веса.

Обсуждение

Супероксиддисмутаза и каталаза являются основными ферментами антиоксидантной системы, обезвреживающими супероксидный анион радикал ($O_2^{\cdot-}$) и перекись водорода (H_2O_2), которые образуются при восстановлении молекулярного кислорода в процессе аэробного метаболизма. Поскольку *L. mandschurica* эволюционно адаптирована к условиям периодической смены прилива и отлива, сопровождающихся возникновением дефицита кислорода, то вполне вероятно, что обнаруженное нами увеличение в активности СОД и ГР при экспериментальной гипоксии/аноксии подтверждает гипотезу Hermes-Lima с коллегами [11, 437]. Согласно этой гипотезе, повышение активности антиоксидантных ферментов у таких организмов

связано с “предподготовкой”, направленной на минимизацию повреждающего действия окислительного стресса, который неизбежно наступает в период реоксигенации, в фазе прилива.

В окислительно-восстановительном метаболизме существенное значение принадлежит трипептиду глутатиону, проявляющему антиоксидантные свойства [8, 5598] и поддерживающему сульфгидрильные группы функционально важных белков в восстановленном состоянии. В гипоксийно-аноксийных условиях уровень глутатиона достоверно возрастал в гепатопанкреасе моллюска. Возможно, это связано не только с его антиоксидантными свойствами, но и с участием восстановленной формы глутатиона в процессах связывания кислорода с тканевым гемоглобином, что в определенной мере способствует удержанию кислорода в тканях [1, 192]. Увеличение в активности глутатионредуктазы дает нам основания полагать, что в условиях недостатка кислорода метаболизм этого моллюска направлен на поддержание глутатиона в восстановленном состоянии, что, в определенной мере, свидетельствует о возрастающей роли сульфгидрильных групп в этот период. Интересно отметить, что, несмотря на увеличение активности антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных компонентов АО системы, уровень МДА у *L. mandschurica* также увеличился.

Медь является необходимым кофактором ряда ферментов, катализирующих разнообразные окислительно-восстановительные реакции. Считается, что токсическое действие меди состоит в ее способности окислять сульфгидрильные группы ферментов, инактивируя их. Предполагают также, что медь может взаимодействовать с АФК (O_2^- , H_2O_2) и катализировать через реакции Фентона и Хабера-Вайса образование гидроксильного радикала [18, 1161]. Высокая реакционная способность этого радикала, в свою очередь, вызывает окислительную деградацию нуклеиновых кислот, белков и инициирует перекисное окисление липидов, что приводит к нарушению целостности биологических

мембран [8, 5598].

В наших экспериментах при действии меди наблюдалось значимое увеличение уровня СОД в клетках гепатопанкреаса *L. mandschurica*, что свидетельствует об усиленной генерации оксирадикалов, в частности супероксидного радикала. Это подтверждается исследованием Уилсона и МакМахона [20, 139], которые выявили прямую зависимость между интенсивностью потребления кислорода и концентрацией меди в тканях *Littorina rudis*. Кроме того, ионы меди могут усиливать окисление гемоглобина и миоглобина, что приводит к образованию супероксидного радикала O_2^- , субстрата для СОД [10, 851]. Несмотря на увеличение активности СОД, у *L. mandschurica* наблюдалось увеличение окислительной деградации липидов (повышение уровня МДА), как и при гипоксийно/аноксийных условиях. Значимых изменений в других показателях у литторины мы не наблюдали.

Совместное действие двух факторов (гипоксия/аноксия и медь) привело к существенному подавлению защитной системы моллюска. Токсичность меди усилилась при недостатке кислорода в тканях, что подтверждается увеличением окислительной деградации липидов (до 70 %) в гепатопанкреасе литторины. В то же время инициированное этими факторами повышение уровня ИАА свидетельствует об активации низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы в защите от окислительного повреждения [2, 78]. Однако на фоне подавления активности главных антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ) наблюдаемое нами увеличение показателя ИАА не защитило ткани моллюска от окислительной деградации ее компонентов.

Несмотря на то, что GST также является важным компонентом антиоксидантной системы, инактивирующим вторичные метаболиты окислительного стресса, такие, как α -ненасыщенные альдегиды, хиноны, эпоксиды, органические гидропероксиды, однако, у исследуемого вида моллюска активность этого фермента не изменилась при всех фор-

мах воздействия (медь, гипоксия/аноксия, медь и гипоксия/аноксия).

Таким образом, наши результаты показали, что при совместном действии меди и гипоксии/аноксии были выявлены более глубокие изменения биохимических параметров, чем при раздельном действии этих факторов, что выражалось в подавлении главных антиоксидантных ферментов и развитии окислительного стресса.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Биргер Т.И. Метаболизм водных беспозвоночных в токсической среде. Киев: Наук. Думка, 1979. 192 с.
2. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях: пособие для врачей. М.: РКНПКМЗ РФ, 2001. 78 с.
3. Челомин В.П., Бельчева Н.Н., Довженко Н.В. Мониторинг загрязнения прибрежных вод на основе биохимических маркеров. В кн.: Дальневосточные моря России. Исследования морских экосистем и биоресурсов. М.: Наука, 2007. С. 617-632.
4. Челомин В.П., Бельчева Н.Н., Захарцев М.В. Биохимические механизмы адаптации мидии *Mytilus trossulus* к ионам кадмия и меди // Биология моря. 1998, №5. С. 319-325.
5. 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.
6. Chen M., Yang H., Delaporte M., Zhao S., Xing K. Immune responses of the scallop *Chlamys farreri* after air exposure to different temperatures // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2007. V. 345. P. 52-60.
7. Fang J.K.H., Wu R.S.S., Chan A.K.Y., Yip C.K.M., Shin P.K.S. Influences of ammonia-nitrogen and dissolved oxygen on lysosomal integrity in green-lipped mussel *Perna viridis*: Laboratory evaluation and field validation in Victoria Harbour, Hong Kong // *Marine Pollution Bulletin*. 2008. V. 56. P. 2052-2058.
8. Freedman J.H., Ciriolo M.R., Peisach J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity // *The journal of biological chemistry*. 1989. Vol. 264. No.10. P. 5598-5605.
9. Habig, W.H., Jakoby W.B. Assay for differentiation of glutathione S-transferases // *Meth. Enzymol*. 1981. V. 77. P. 398-405.
10. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford Univ. press, 2007. 851 p.
11. Hermes-Lima M., Storey J.M., Storey K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails // *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1998. Part B 120. P. 437-448.
12. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem*. 1951. V. 193. P. 266-275.
13. 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.
14. Paoletti F., Aldinuccio D., Mocali A., Carparrini A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase in tissue extracts // *Anal. Biochem*. 1986. V. 154. P. 526-541.
15. Regoli F., Principato G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers // *Aquat. Toxicol*. 1995. Vol. 31. P. 143-164.
16. Re Roberta, Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // *Free Radical Biology & Medicine*. 1999. Vol. 26. P. 1231-1237.
17. Rudolf S.S. Wu. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses // *Marine Pollution Bulletin*. 2002. V. 45. P. 35-45.
18. Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. Metals, Toxicity and Oxidative Stress // *Current Medicinal Chemistry*. 2005. Vol. 12. P. 1161-1208.
19. Veldhuizen-Tsoerkan M.B. Anoxic survival time and metabolic parameters as stress indices in sea mussels exposed to cadmium or polychlorinated biphenyls // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1991. V. 20. P. 259-265.
20. Wilson J.G., McMahan R.F. Effects of high environmental copper concentration on the oxygen consumption, condition and shell morphology of natural populations of *Mytilus edulis* L. and *Littorina rudis* Maton // *Comp. Biochem. Physiol*. 1981. V. 70. P. 139-147.