

Н. В. Довженко, Н. Н. Бельчева, В. Я. Кавун, В. П. Челомин

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В АКТИВНОМ МОНИТОРИНГЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МОРСКОЙ СРЕДЫ

В последние годы резко вырос интерес к изучению особенностей функционирования отдельных компонентов антиоксидантной (АО) системы, повреждение которых неизбежно ведет к нарушению работы защитных механизмов и, как следствие, развитию окислительного стресса в организме. В состав АО-системы входят разнообразные низкомолекулярные вещества (глутатион, токоферол, аскорбиновая кислота, каротиноиды, полифенольные соединения и др.) и антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и т. д. [1, 2]. Данные показатели широко используются в экотоксикологии в качестве биомаркеров загрязнения водной среды.

Особенно высока роль защитной АО-системы у бентосных гидробионтов, в частности, двустворчатых моллюсков, обитающих в литоральной зоне и периодически испытывающих влияние неблагоприятных факторов среды различной интенсивности. Обитание в специфической зоне с флуктуирующими абиотическими параметрами среды, а также циклические изменения физиологического статуса приводят к резким колебаниям активности АО-системы и уровня продуцирования оксидрадикалов у этих животных [3–6]. Кроме этого, АО-система двустворчатых моллюсков, способных концентрировать металлы, испытывает мощное давление со стороны усиливающегося загрязнения водной среды. Поскольку уровень аккумулированного металла в биологической системе относится к категории интегральных маркеров, этот показатель является отражением сложной совокупности многих процессов (термодинамических, биохимических, химических) и факторов (биогенных и абиогенных). Учитывая эксплуатативный характер систем детоксикации, уровень аккумуляции указывает на степень дисбаланса биохимических механизмов регуляции металла и степень нагрузки на метаболическую систему в целом [7]. Однако в большинстве случаев не представляется возможным проследить всю совокупность последовательных реакций, закономерно развивающихся в биологической системе, в ответ на повреждающее действие химического фактора. Но тем не менее имеются узловые биохимические системы, повреждения которых можно рассматривать как наиболее чувствительные индикаторы неизбежности развития необратимых деструктивных процессов в организме (окислительного стресса) [1, 2, 8–12]. Широко используемыми индикаторами развития окислительного стресса являются: изменение активности АО-ферментов, изменение концентрации низкомолекулярных антиоксидантов, накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Поэтому, учитывая важную роль антиоксидантов в устойчивости организма к окислительному стрессу [4, 10, 13], мы применили «Активный биомониторинг» (Active Biomonitoring) [14, 15], т.е. перенесли животных из относительно чистого биотопа в загрязненный. Данный подход исключает либо сводит к минимуму неиз-

бежное влияние варьирующих факторов биотического и абиотического характера на интенсивность обменных процессов у исследуемых моллюсков, искажающих общую картину ответной реакции отдельных компонентов защитной системы животных непосредственно на загрязнение, характерное для исследуемых акваторий. Для оценки состояния АО-системы и ее значения в формировании резистентности у моллюсков к загрязнению были выбраны две группы мидий Грея (*Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853)) из акваторий, в значительной степени различающихся по уровню обогащения тяжелыми металлами (ТМ).

Основная задача работы заключалась в наглядной иллюстрации степени участия отдельных звеньев многокомпонентной антиоксидантной системы в защитной реакции моллюсков, испытывающих воздействие комплексного загрязнения (в большей степени ТМ). В работе исследована реакция АО-системы и образование продуктов окисления мембранных липидов в тканях организма-монитора мидии *S. grayanus* в ответ на аккумуляцию тяжелых металлов в природных условиях. Для более полной и объективной оценки состояния АО-системы и степени развития окислительного стресса у этих моллюсков был применен сравнительный анализ.

Материалы и методы исследования

В работе использовали взрослых мидий Грея *S. grayanus* (Dunker, 1853), собранных в июле в двух акваториях залива Петра Великого (Японское море). Станция 1 — акватория о-ва Большой Пелис (бухта Восточная). Бухта Восточная находится в южной части залива Петра Великого вдали от промышленных и сельскохозяйственных объектов и, практически, не испытывает антропогенного воздействия. По содержанию поллютантов, в частности ТМ, этот район отнесен к условно чистому. Станция 2 — бухта Десантная (Уссурийский залив) расположена в зоне влияния свалки промышленных и бытовых отходов г. Владивостока и является одним из самых мощных центров полиметаллического загрязнения (рис. 1).



Рис. 1. Карта-схема сбора материала и проведения эксперимента:

1 — бухта Восточная; 2 — бухта Десантная.

В воде и донных осадках бухты Десантной обнаружены высокие концентрации тяжелых металлов (Fe, Zn, Cd), и особенно Cu и Pb [16]. В местах отбора мидий тип грунта — твердый, галечный. Всего отобрано 50 мидий: средняя высота раковин моллюсков станции 1 составляла $12,62 \pm 0,9$ см (40 экз.), а станции 2 — $9,75 \pm 1,02$ см (10 экз.).

Условия экспериментов по пересадке мидий из акватории о-ва Большой Пелис (бухта Восточная) в бухту Десантную были описаны ранее [12, 17]. Через определенные промежутки времени (10, 20 и 30 сут) из экспериментальной группы отбирали по 5 экз. мидий для выявления в жабрах и пищеварительной железе: активности АО-ферментов (СОД, каталаза и глутатион-редуктаза), уровня интегральной антирадикальной активности (ИАА) и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (диеновые конъюгаты — ДК, малоновый диальдегид — МДА и липофусцин). Определение биохимических показателей каждой ткани от пяти моллюсков проводили в четырех параллельных пробах.

Концентрация белка в гомогенатах тканей была определена на основе адсорбции бромфенолового синего [18]. Калибровочные кривые строили по растворам бычьего сывороточного альбумина, концентрации которого рассчитывали по коэффициенту молярной экстинкции.

Определение активности АО-ферментов. Кусочки тканей (приблизительно по 1 г) от каждого моллюска гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 0,05 М трис-НСl, рН 8,0 буфере, содержащем ингибитор протеаз — фенолметилсульфонил-фторид (PMSP). Гомогенат центрифугировали 40 мин при 10 000 g ($+4^\circ\text{C}$) и надосадочную фракцию (цитозоль) использовали для определения активности СОД, каталазы и глутатионредуктазы (GSH-редуктазы). Инкубация проб и регистрация активности ферментов проводились при температуре $+20^\circ\text{C}$ [12].

Супероксиддисмутаза (EC 1.15.1.1). В основе метода [19] лежит определение способности тканевых гомогенатов ингибировать реакцию окисления НАДФН, вызванную супероксид анион радикалом. Для определения активности СОД полученные гомогенаты тканей предварительно пропускали через колонку с сефадексом G-25 для удаления низкомолекулярных ингибиторов фермента [12]. Окисление НАДФН регистрировали при λ 340 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1650PC. В контрольный образец вместо гомогената вносили соответствующий объем 100 мМ фосфатного буфера (рН 7,4). Одной (1) единице активности (ЕА) фермента соответствует 50%-ное ингибирование реакции окисления. Активность СОД выражали в ЕА в расчете на миллиграмм белка (ЕА/мг белка).

Глутатионредуктаза (EC 1.6.4.2). Метод определения активности GSH-редуктазы [1] основан на способности фермента восстанавливать окисленную форму глутатиона с использованием НАДФН. Активность фермента рассчитывали по изменению экстинкции при λ 340 нм в течение начального этапа реакции на линейном участке кривой и выражали в наномолях окисленного НАДФ⁺/мин/мг белка.

Каталаза (EC 1.11.1.6). Метод определения активности фермента каталазы основан на его способности разлагать перекись водорода [1]. Кинетику распада перекиси водорода с участием гомогенатов тканей регистрировали при λ 240 нм в течение 1 мин и выражали в микромолях H_2O_2 /мин/мг белка.

По полученным данным рассчитывали среднее значение активности фермента в тканях моллюсков, соответствующих каждой станции и периоду вылова.

Определение ИАА. Для определения интегральной антирадикальной активности

(ИАА) тканей мидии в работе использован подход, предложенный Уинстоном и соавторами [20], и собственные модификации [10]. Индекс интегральной антирадикальной активности рассчитывался по формуле:

$$ИАА = 100 - (C_i/C_c \cdot 100),$$

где C_i и C_c — количество продукта окисления салициловой кислоты (2,4-гидроксibenзойная кислота) в исследуемом и контрольном образцах соответственно. Все значения ИАА нормировались на 1 мг белка биологического препарата.

Определение глутатиона. Метод определения глутатиона основан на реакции тиогруппы цистеина с реактивом Элмана — дитионитробензойной кислотой [21].

Определение продуктов ПОЛ. Первичные и вторичные продукты перекисного окисления липидов (ДК, МДА) определяли согласно методике, предложенной авторами работы [22]. Уровень флуоресцирующих продуктов (липофусцин), составляющих основную массу липофусциновых гранул, определяли спектрофлуориметрически [23]. Относительное содержание этих соединений выражали в условных единицах (УЕ) в расчете на 1 г сырого веса ткани (относительно флуоресценции раствора 1 мкмоль/мл хинин-сульфата в 0,1 Н H_2SO_4).

Все численные данные представляют собой среднее значение для четырех серий экспериментов \pm стандартное отклонение.

Сравнительный анализ исследованных параметров проводили по методу Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

На первом этапе нашего эксперимента были проведены сравнительные исследования биохимических показателей в тканях моллюсков из разных биотопов (таблица).

Содержание основных продуктов перекисного окисления липидов (ДК, МДА и липофусцина) в тканях мидий со станции 2 было существенно выше, чем у моллюсков со станции 1. Наиболее интенсивные процессы ПОЛ наблюдались в клетках пищеварительной железы, в которых не только в 4–5 раз увеличилось содержание первичных (ДК) и вторичных (МДА) продуктов, но и в 6 раз общее содержание конечного продукта — липофусцина.

Результаты определения активности антиоксидантных ферментов в тканях моллюсков представлены в таблице. Высокая активность АО-ферментов с выраженной тканевой специфичностью обнаружена у мидий со станции 1 (таблица). Так, активность СОД и GSH-редуктазы была выше в 2,5 и 1,5 раза соответственно в клетках жабр по сравнению с клетками пищеварительной железы. И, наоборот, в клетках жабр активность каталазы составляла около 15,3 мкмоль H_2O_2 /мин/мг белка, тогда как в пищеварительной железе — более 120,9 мкмоль H_2O_2 /мин/мг белка (см. таблицу).

При сравнительном анализе было установлено, что неблагоприятные условия обитания существенно повлияли на состояние АО защитной системы моллюсков: активность ферментов как в пищеварительной железе, так и в жабрах мидий со станции 2 была значительно выше, чем у моллюсков со станции 1 (см. таблицу). Наиболее заметно это отразилось на активности СОД в клетках пищеварительной железы, которая в 2,5 раза превысила активность СОД у мидий из незагрязненного района (станция 1). Активность СОД в клетках жабр мидий из обеих акваторий была почти одинаковой (см. таблицу).

Сравнительные характеристики биохимических показателей в тканях *S. glaucaus* из двух акваторий (станции 1 и 2)

№ станции	Ткань	АО ферменты				Продукты ПОЛ			
		СОД, ЕА/мг белка	Кат, мкмоль/мг/мин	ГSH-редуктаза нмоль/мг/мин	ИАА, %	ГSH, мкг/мг белка	ДК, мкмоль/г ткани	МДА, мкмоль/г ткани	ЛФ, УЕ/г ткани
1	Ж	228,3 ± 2,1	15,3 ± 2,1	51,3 ± 2,9	34 ± 2,1	25 ± 0,5	1,37 ± 0,1	3,81 ± 0,25	24,4 ± 1,22
	ПЖ	86 ± 5,3	120,9 ± 7,3	35,9 ± 2,7	34,3 ± 1,7	24 ± 0,9	2,07 ± 0,24	1,48 ± 0,06	117,7 ± 5,8
2	Ж	232,5 ± 16,5	27,7 ± 4,7	44 ± 5,9	25,4 ± 2,4	30 ± 1,5	3,44 ± 0,38	2,49 ± 0,46	84,4 ± 15,2
	ПЖ	213 ± 7,2	180 ± 13,9	25,9 ± 2,2	40,8 ± 3,7	40 ± 0,7	8,76 ± 0,51	6,74 ± 0,71	613 ± 42

Примечание: Ж — жабры; ПЖ — пищеварительная железа; АО — антиоксидантные ферменты; СОД — супероксиддисмутаза; Кат — каталаза; ГSH-редуктаза — глутатион-редуктаза; ИАА — индекс интегральной антирадикальной активности; ГSH — глутатион; ДК — диеновые конъюгаты; МДА — малоновый диальдегид; ЛФ — липофусцин.

Активность GSH-редуктазы в жабрах мидий со станции 2 была незначительно ниже, чем у моллюсков со станции 1; в пищеварительной железе эти различия более существенны (25,9 и 35,9 нмоль GSSG/мин/мг белка соответственно) (см. таблицу). Последнее указывает на то, что процесс регенерации глутатиона в клетках пищеварительной железы моллюсков со станции 2 находится в подавленном состоянии.

Для характеристики антирадикального звена АО-системы были использованы два показателя: ИАА — индекс, отражающий интегральный потенциал биологической системы в инактивации высокотоксичных оксидантов и уровень одного из основных водорастворимых антиоксидантов — глутатиона.

У моллюсков со станции 2 наблюдался более высокий индекс антирадикальной активности в пищеварительной железе (~20%) и сниженный в клетках жабр (~25%) по сравнению с мидиями со станции 1. Концентрации глутатиона в жабрах мидий из обоих биотопов слабо различались, тогда как в пищеварительной железе моллюсков со станции 2 уровень антиоксиданта был 1,7 раза выше, чем у мидий со станции 1 (см. таблицу).

На втором этапе эксперимента нами были проведены серии пересадок мидий из акватории станции 1 в сильно загрязненную бухту Десантную (станция 2). Цель этих пересадок — оценить степень чувствительности и характер реакции ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной системы к поллютантам в динамике.

В период пребывания в загрязненных водах станции 2 в основном в пищеварительной железе пересаженных моллюсков наблюдалось интенсивное накопление продуктов ПОЛ (рис. 2 А, В).

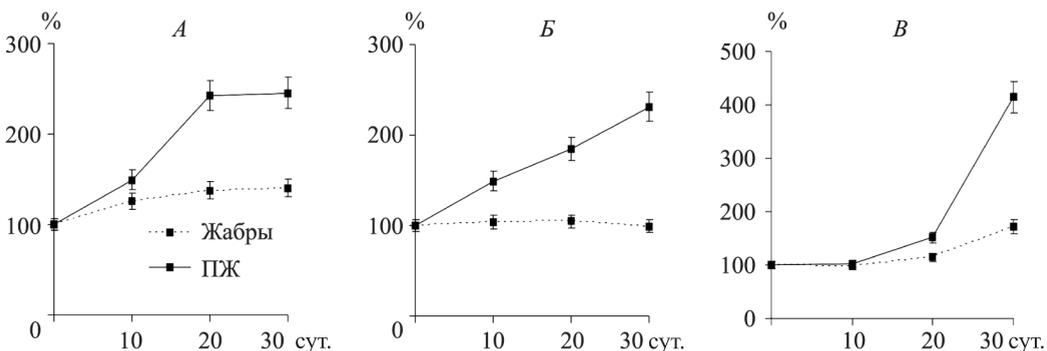


Рис. 2. Изменение содержания продуктов ПОЛ в тканях мидий, перенесенных со станции 1 на станцию 2:

А — диеновые конъюгаты; Б — малоновый диальдегид и В — липофусцин.

С первых суток эксперимента отмечено увеличение содержания ДК и МДА в пищеварительной железе. По окончании наблюдений уровень первичных и вторичных продуктов ПОЛ вырос почти в 2–2,5 раза (см. рис. 2 А, Б). В то же время резкое увеличение концентрации липофусцина в органах пересаженных моллюсков было отмечено только во второй половине эксперимента. Общее содержание липофусцина в клетках пищеварительной железы увеличилось почти в 4 раза (см. рис. 2 В). Следует заметить, что усиленное накопление ПОЛ в клетках пищеварительной железы протекало при относительно слабом изменении содержания этих компонентов в клетках жабр. Особенно

отчетливо это проявилось на примере МДА в жабрах моллюсков, уровень которого не изменился на протяжении всего эксперимента (см. рис. 2 Б).

Высокую чувствительность к воздействию экстремальных условий среды на станции 2 проявили ферменты АО-системы мидии Грея, ответ которых также носил тканеспецифичный характер (рис. 3 А–В).

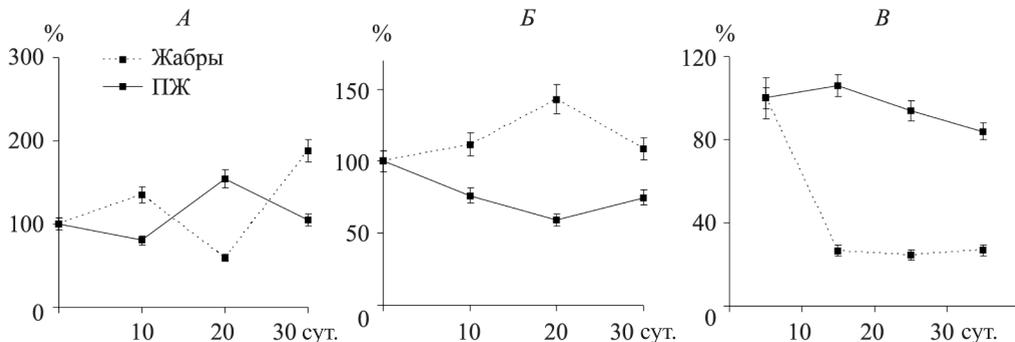


Рис. 3. Изменение активности АО-ферментов в тканях мидий, перенесенных со станции 1 на станцию 2:

А — СОД; Б — каталаза; В — глутатионредуктаза.

В клетках жабр и пищеварительной железы наблюдались хаотичные и разнонаправленные сдвиги в активности СОД (см. рис. 3 А). К концу эксперимента активность СОД в жабрах увеличилась почти в 2 раза, а в пищеварительной железе вернулась к исходному уровню. Были отмечены существенные различия в динамике изменений активности каталазы: в клетках пищеварительной железы наблюдалось снижение активности более чем на 40%; в жабрах к 20-м суткам эксперимента ее активность увеличилась почти на 50%, а к 30-м вернулась к исходному уровню (рис. 3 Б). В первой декаде активность ГSH-редуктазы в жабрах резко снизилась (~ в 4 раза), и оставалась на низком уровне до конца эксперимента (рис. 3 В). Изменение активности ГSH-редуктазы в пищеварительной железе было слабовыраженным с некоторой тенденцией к снижению.

На протяжении всего эксперимента в жабрах пересаженных моллюсков индекс интегральной антирадикальной активности снижался постепенно (рис. 4 А).

В первые 10 суток индекс ИАА в пищеварительной железе увеличился почти на 40%, а в последующие сутки резко снизился на 50% от исходного уровня. Концентрация глутатиона в клетках пищеварительной железы увеличилась более чем на 50%, а в жабрах снизилась только к 30-м суткам эксперимента (рис. 4 Б).

Полученные нами результаты свидетельствовали о высокой чувствительности исследованных компонентов АО-системы мидий Грея к воздействию экстремальных условий на станции 2. Наиболее заметны изменения в активности АО-ферментов: в клетках пищеварительной железы они более ярко выражены, чем в жабрах. Ранние исследования [17] показали, что воды и донные осадки бухты Десантной обогащены такими металлами, как Cu и Pb и, в меньшей степени, Zn и Fe. Различия в содержании ТМ в воде и осадках этих двух акваторий нашли свое закономерное отражение и в микроэлементном составе отдельных органов «аборигенных» моллюсков. В тканях мидий со станции 2 отмечено существенное увеличение (в 1,5–3 раза) концентраций Zn, Cd и Fe [17].

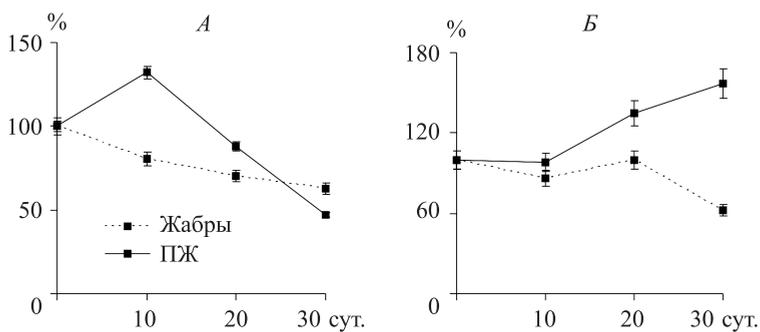


Рис. 4. Изменение уровня ИАА и содержания глутатиона в тканях мидий, перенесенных со станции 1 на станцию 2:

А — ИАА; Б — глутатион.

В жабрах мидий со станции 2 содержание этих высокотоксичных металлов в несколько десятков раз выше (90 и 50 раз соответственно), чем у мидий со станции 1. В пищеварительной железе данные различия составляют 15 и 13 раз соответственно [17].

Высокая активность АО-ферментов в пищеварительной железе мидий «аборигенов» станции 2, очевидно, указывала на компенсаторную реакцию организма, направленную на нейтрализацию возросшего уровня АФК и преодоление стрессовых условий. Подобная реакция СОД и каталазы наблюдалась у *Mytilus edulis* [24, 25], *Ruditapes decussatus* [26], *Macoma balthica* [27], *Mytella guyanensis* [28], обитающих в загрязненных районах. В лабораторных экспериментах с *Perna perna*, воздействие Pb, Fe, Cd и Cu вызывало увеличение активности каталазы [29]. Однако в ряде работ было показано, что действие различных ТМ (Cd, Zn, Cu и Hg) вызывало снижение активности СОД и каталазы [26, 30]. Кроме того, в ответной реакции отдельных АО-ферментов на фоне тканеспецифичности проявляется и специфичность к различным ТМ [27].

В отличие от СОД и каталазы, реакция GSH-редуктазы на загрязнение изучена в меньшей степени. В наших экспериментах активность этого фермента в пищеварительной железе мидий из загрязненного района была ниже, чем у моллюсков из чистого района. Такая же тенденция наблюдалась при воздействии меди на *Mytilus galloprovincialis* [1], однако в пищеварительной железе мангрового моллюска *M. guyanensis* из загрязненных районов выявлено увеличение активности [28].

По литературным данным, изменение активности АО-ферментов при пересадке моллюсков, как и в нашем случае, носило тканеспецифичный характер. У *M. galloprovincialis*, перенесенной в загрязненное место, активность каталазы в пищеварительной железе снижалась на 75%, тогда как в жабрах — наоборот, возрастала [1].

У пересаженных нами моллюсков чувствительность к загрязнению проявлялась в изменении активности всех исследованных ферментов, но особенно отчетливо каталазы и GSH-редуктазы. В ответной реакции активности каталазы в клетках жабр и GSH-редуктазы в пищеварительной железе наблюдался двухфазный характер (см. рис. 3 Б, В). Аналогичные результаты были получены в случае GSH-редуктазы в 4-недельных экспериментах с *M. galloprovincialis* [31]. Подобное поведение ферментов свидетельствовало о том, что адаптационно-компенсаторный характер первичной реакции на загрязнение может быстро перейти в устойчивую тенденцию подавления. В то же время с первых же дней пребывания моллюсков в условиях станции 2 активность

каталазы в клетках пищеварительной железы и GSH-редуктазы в клетках жабр резко снизилась (у GSH-редуктазы — более чем на 70%) и не восстанавливалась до конца эксперимента. Поведение GSH-редуктазы хорошо согласуется с данными, полученными в экспериментах по переносу моллюсков из чистых в загрязненные акватории и при воздействии тяжелых металлов (Cu) [1, 32]. Очевидно, такая реакция ферментов является следствием прямого ингибирующего действия со стороны химических загрязнителей (главным образом, ТМ), присутствующих в воде и донных осадках станции 2.

Обращает на себя внимание некоторое несоответствие в поведении каталазы у «аборигенных» мидий со станции 2 и у моллюсков, пересаженных в эту акваторию. По мнению Ф.Реголи и Дж.Принципато [1], подобные изменения активности АО-ферментов (особенно каталазы) связаны с тем, что за короткий экспериментальный период у пересаженных моллюсков в отличие от «аборигенных» адаптационно-компенсаторные механизмы не успевают реализоваться в полной мере. Поэтому, несмотря на чувствительность активности ферментов, полученные результаты не могут полностью отражать степень окислительного повреждения всей системы клетки. Наглядным примером служит работа [14], в которой авторы показали, что у моллюсков *Mercenaria mercenaria*, перенесенных в загрязненное место, при резком увеличении активности каталазы (в 3 раза при неизменной активности СОД) наблюдалось значительное снижение стабильности мембран лизосом, что свидетельствовало о развитии окислительного стресса. Также у *P. perna* [29] и глубоководного моллюска *R. decussatus* [26] при воздействии ТМ на фоне различных сдвигов в активности отдельных АО-ферментов наблюдалась мощная активация процессов ПОЛ. Это связано с тем, что живые организмы представляют собой сложноорганизованную систему, поддерживающую и регулирующую оптимальный уровень эндогенных функционально различных антиоксидантов — ферментов и низкомолекулярных антиоксидантов. Нет сомнения, что процессы активации одних компонентов и ингибирования других протекают в организме в условиях интоксикации, однако их роль в формировании общего потенциала АО-системы различна и во многом определяется комплексом факторов — от общего уровня и характера загрязнения до биохимических особенностей организма. При этом справедливо допустить, что изменение в уровне одного из компонентов единой АО-системы не всегда отражает степень окислительного повреждения в клетке, поскольку оно может быть скомпенсировано индукцией другого защитного компонента (или компонентов) этой системы. Более того, считается, что антиоксиданты могут функционировать кооперативно, обеспечивая клетке защитный потенциал большей силы, чем это следует из простой суммы вклада каждого антиоксиданта в отдельности.

Считаем, что для решения проблемы надежного прогнозирования последствий этих изменений, целесообразно руководствоваться интегральными подходами в оценке АО потенциала клетки [10, 33]. Поэтому в данной работе мы использовали интегральный подход к оценке состояния антиоксидантной системы организма — индекс ИАА [27, 33, 34]. Этот показатель был успешно применен в экотоксикологических исследованиях в качестве биомаркера окислительного стресса у дальневосточной *S. grayanus* [10, 35] и средиземноморской *M. galloprovincialis* мидий, обитающих в загрязненных бухтах и сильно эвтрофированных лагунах [36], а также мидий, перенесенных из чистых акваторий в загрязненные [12, 31, 34, 37].

Результатом накопления ТМ в мягких тканях моллюсков со станции 2 [17] было увеличение уровня ИАА в клетках пищеварительной железы и его снижение в жабрах

(см. таблицу). Эти процессы сопровождались существенным увеличением содержания глутатиона, главным образом, в пищеварительной железе моллюсков со станции 2 (см. таблицу). Известно, что глутатион способен хелатировать различные металлы и даже переносить их к металлотионеинам [38]. Поэтому увеличение содержания глутатиона можно рассматривать как адаптационно-компенсаторную реакцию на возросший поток ТМ в тканях мидии. Между тем результаты исследований влияния аккумуляции металлов на уровень глутатиона других видов моллюсков весьма противоречивы. Так, у *P. viridis* по мере накопления Hg^{+2} и Pb^{+2} наблюдалось увеличение уровня глутатиона в пищеварительной железе и жабрах [39], но в лабораторных условиях воздействие Pb^{+2} на *M. mercenaria* приводило к его снижению. Также происходило снижение глутатиона в пищеварительной железе и жабрах у *M. galloprovincialis*. Подобная тенденция проявлялась у моллюсков из загрязненного района и у моллюсков, пересаженных из чистого района в загрязненный [1]. Увеличение уровня ИАА и глутатиона в клетках пищеварительной железы на начальных этапах эксперимента (см. рис. 4) не вызывало особого удивления, поскольку, кроме существенного увеличения уровня глутатиона, именно в клетках этого органа в данный период времени у моллюсков наблюдается интенсивный синтез специфических металл-связывающих белков [7]. Постепенное снижение уровня ИАА в жабрах пересаженных мидий уже на ранних этапах пребывания на станции 2 свидетельствовало о высокой чувствительности этого звена защитной системы. Логично предположить, что общий уровень загрязнения данной бухты стал причиной интенсивной генерации АФК в организме моллюсков, приведшей к «выгоранию» низкомолекулярных компонентов АО-системы в жабрах. Правомочность этого предположения подтверждается кинетикой изменения уровня ИАА в тканях пересаженных мидий (см. рис. 4А).

Подавление отдельных компонентов АО-системы само по себе является общеизвестным признаком окислительного стресса. Однако наиболее распространенным индикатором стресса является накопление продуктов ПОЛ [8, 10, 28, 35]. Среди продуктов свободнорадикального окисления липидов, кроме МДА, зарегистрированы также 4-гидроксиалкеналь [40] и липофусцин [10]. В результате бифункциональной реакции МДА с донорами аминогрупп (липиды, белки, нуклеотиды и др.) образуются стабильные «конечные» продукты ПОЛ (типа оснований Шиффа) которые, обладают флуоресценцией в «синей» области спектра и составляют основную массу хорошо известных внутриклеточных образований — липофусциновых гранул [10, 23]. Ранее нами были зарегистрированы флуоресцирующие продукты в липидных экстрактах пищеварительной железы экспериментальных моллюсков, содержание которых увеличивалось по мере аккумуляции ТМ [10]. Результаты определения продуктов ПОЛ в тканях «аборигенных» мидий (станция 2) свидетельствовали об усилении «зарождения» цепей свободнорадикального окисления (ДК) и накоплении высокотоксичных продуктов деградации (МДА, липофусцин), которые являются причиной развития множественных патологических процессов в клетке.

У пересаженных моллюсков уже на начальном этапе эксперимента было отмечено устойчивое развитие процессов ПОЛ, индикатором которого служило увеличение содержания диеновых конъюгатов (см. рис. 2 А). Вероятно, дальнейшее пребывание мидий на станции 2, а следовательно, и активное накопление ТМ в тканях, приведет к комплексу сложных необратимых биохимических и физико-химических сдвигов в клетке, одним из проявлений которых станет усиление реакций разложения гидроперекисей

до МДА (см. рис. 2 Б) и липофусцина (см. рис. 2 В). Этому процессу могут способствовать физиологически важные металлы с переменной валентностью (Fe и Cu). Ранее было установлено, что на первых этапах аккумуляции ТМ [7, 41] в тканях приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* возникают серьезные изменения метаболизма железа, в результате которых может возрастать «транзитный пул» и провоцироваться образование комплексов Fe²⁺ с низкомолекулярными компонентами клетки, легко диффундирующих в глубинные липидные области мембран. Полученные нами результаты указывают на то, что в тканях «аборигенов» и перенесенных мидий наблюдалось нарушение стационарности процессов свободнорадикального окисления липидов мембран. Изменение стационарности этих процессов следует рассматривать как результат активного вмешательства загрязнения (в первую очередь ТМ) в соотношение между процессами активации ПОЛ (совокупность реакций индукции ПОЛ) и процессами, препятствующими его развитию (совокупность реакций АО-системы).

Заключение

Изменения приведенных показателей стали отражением развития прооксидантных процессов, протекающих в условиях интоксикации в тканях мидии на станции 2. Анализ экспериментальных данных свидетельствовал о том, что экологическая ситуация отразилась на состоянии АО защитной системы экспериментальных моллюсков, которые испытали выраженный окислительный стресс. Считаем, что сдвиги в любом звене АО-системы могут служить ранними и чувствительными индикаторами не только физиологического состояния организма, отражающими условия его обитания, но и сигналами возникновения угрозы развития патологических процессов в организме, т. е. носить как предупредительный, так и прогностический характер. В связи с этим комплексная оценка изменений активности ферментов антиоксидантной системы и низкомолекулярных антиоксидантов (индекс интегральной антирадикальной активности) может широко использоваться в качестве биохимических индикаторов в программах мониторинга морской среды.

Литература

1. 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.
2. Livingstone D. R. Contaminant — stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms // *Mar. Pollution.* 2001. Vol. 42, N 8. P. 656–666.
3. Abele D., Philipp E., Gonzalez P. M., Puntarulo S. Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress // *Frontiers in Bioscience.* 2007. Vol. 12. P. 933–946.
4. Storey K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature // *Brasil. J. Med. Biol. Res.* 1996. Vol. 29. P. 1715–1733.
5. Lipid peroxidation and level of antioxidant compounds (GSH, vitamin E) in the digestive gland of mussels of three different age groups exposed to anaerobic and aerobic conditions / Viarengo A., Pertica M., Canesi L., Accomando R., Mancinelli G., Orunesu M. // *Mar. Environ. Res.* 1989. Vol. 28. P. 291–295.
6. Истомина А. А., Довженко Н. В., Челомин В. П. Реакция антиоксидантной системы на аноксию и реоксигенацию у морского двустворчатого моллюска *Scapharca broughtonii* // *Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки».* 2010. № 4. С. 39–43.

7. Челомин В. П. Экотоксикологические аспекты биоаккумуляции кадмия (на примере двустворчатых моллюсков): автореф дис. ... д-ра биол. наук. Владивосток. 1998. 23 с.
8. *Chelomin V. P., Belcheva N. N.* The effect of heavy metals on processes of lipid peroxidation in microsomal membranes from the hepatopancreas of the bivalve mollusc *Mizuhopecten yessoensis* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1992. Vol. 103C, N 2. P. 419–422.
9. *Stohs S. J., Bagchi D.* Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions // *Free Rad. Biol. Medic.* 1995. Vol. 18, N 2. P. 312–336.
10. *Довженко Н. В., Куриленко А. В., Бельчева Н. Н., Челомин В. П.* Окислительный стресс, индуцируемый кадмием, в тканях двустворчатого моллюска *Modiolus modiolus* // *Биол. моря.* 2005. Т. 31, № 5. С. 358–362.
11. *Истомина А. А., Довженко Н. В., Бельчева Н. Н., Челомин В. П.* Раздельное и совместное действие недостатка кислорода и меди на антиоксидантную систему *Littorina mandschurica* // *Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки».* 2011. № 1. С. 17–21.
12. Anthropogenic pollution stimulates oxidative stress in soft tissues of mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) / N. N. Belcheva, M. V. Zakhartsev, N. V. Dovzhenko, A. F. Zhukovskaya, V. Ya. Kavun, V. P. Chelomin // *Ocean Sci. J.* 2011. N 46(2). P. 85–94.
13. *Sies H.* Oxidative stress: oxidants and antioxidants. London: Academic Press Limited, 1991. 650 p.
14. Clam transplantation and stress-related biomarkers as useful tools for assessing water quality in coastal environments / Nasci C., Da Ros L., Campesan G., Van Vleet E. S., Salizzato M., Sperti L., Pavoni B. // *Mar. Poll. Bull.* 1999. Vol. 39, N 1–12. P. 255–260.
15. *Nasci C., Nesto N., Monteduro R. A., Da Ros L.* Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in lagoon of Venice (NE Italy) // *Mar. Environ. Res.* 2002. Vol. 54. P. 811–816.
16. *Шулькин В. М., Кавун В. Я., Ткалин А. В., Пресли Б. Дж.* Влияние концентрации металлов в донных отложениях на их накопление митидами *Crenomytilus grayanus* и *Modiolus kurilensis* // *Биол. моря.* 2002. Т. 28, № 1. С. 53–60.
17. *Кавун В. Я., Шулькин В. М.* Изменение микроэлементарного состава органов и тканей двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* при акклиматизации в биотопе, хронически загрязненном тяжелыми металлами // *Биол. моря.* 2005. Т. 31, № 2. С. 123–128.
18. *Greenberg C. S., Gaddock P. R.* Rapid single-step membrane protein assay // *Clin. Chem.* 1982. Vol. P. 1725–1726.
19. *Paoletti F., Aldinuccio D., Mocali A., Carparrini A.* A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase in tissue extracts // *Anal. Biochem.* 1986. Vol. 154. P. 526–541.
20. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids / Winston G. W., Regoli F., Dugas A. J., Fong J. H., Blanchard K. A. // *Free Radical Biology and Medicine.* 1998. Vol. 24, N 3. P. 480–493.
21. *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. Vol. 582. P. 67–78.
22. *Buege J. A., Aust S. D.* Microsomal lipid peroxidation: methods in enzymology. New York: Academic Press, 1978. Vol. 52. P. 302–310.
23. *Shimasaki H., Hirai N., Ueta N.* Comparison of fluorescence characteristics of products of peroxidation of membrane phospholipids with those of products derived from reaction of malonaldehyde with glycine as a model of lipofuscin fluorescent substances // *J. Biochem.* 1988. Vol. 104. P. 761–766.
24. *Porte C., Sol M., Albaigs J., Livingstone D. R.* Responses of mixed-function oxygenase and anti-oxidase enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution // *Comp. Biochem. Physiol.* 1991. Vol. 100C. P. 183–186.
25. Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel *Mytilus edulis* / Manduzio H., Monsinjon T., Rocher B., Leboulienger F., Galap C. // *Aquat. Toxicol.* 2003. Vol. 64. P. 73–83.

26. Geret F, Serafim A., Barreira L., Bebianno M. Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussates* // Mar. Environ. Res. 2002. Vol. 54. P. 413–417.
27. Regoli F, Winston G. W., Mastrangelo V. Total oxyradical scavenging capacity in mussel *Mytilus* sp. as a new index of biological resistance to oxidative stress. Chemosphere. 1998. Vol. 37. P. 2773–2783.
28. Oxidative stress in mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil / 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. // Mar. Poll. Bull. 2002. Vol. 44. P. 923–932.
29. Protective effects of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals / Almeida E. A., Miyamoto S., Baini A. C. D., Medeiros M. H. G., Di Mascio P. // Mar. Pollut. Bull. 2004. Vol. 44. P. 386–392.
30. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* / Company R., Serafim A., Bebianno M., Cosson R., Shillito B., Fiala-Medioni A. // Mar. Environ. Res. 2004. Vol. 58. P. 377–381.
31. Time-course evaluation of ROS-mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment / Frenzilli G., Bocchetti R., Pagliarecci M., Nigro M., Annarumma F., Scarcelli V., Fattorini D., Regoli F. // Mar. Environ. Res. 2004. Vol. 58. P. 609–613.
32. Antioxidant biomarkers in freshwater Bivalves, *Unio tumidus* in response to different contamination profiles of aquatic sediments / Cossu F., Doyotte A., Babut M., Exinger A., Vasseur P. // Ecotox. Environ. Safety. 2000. Vol. 45, N 2. P. 106–121.
33. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach / Regoli F., Gorbi S., Frenzilli G., Nigro M., Corsi J., Focardis S., Winston G. W. // Mar. Environ. Res. 2002. Vol. 54. P. 419–423.
34. Regoli F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress // Aquatic Toxicol. 2000. Vol. 50. P. 351–361.
35. Челомин В. П., Бельчева Н. Н., Довженко Н. В. Мониторинг загрязнения прибрежных вод на основе биохимических маркеров // Дальневосточные моря России. Исследования морских экосистем и биоресурсов. М.: Наука, 2007. С. 617–632.
36. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon / Frenzilli G., Nigro M., Scarcelli V., Gorbi S., Regoli F. // Aquatic Toxicol. 2001. Vol. 53. P. 19–32.
37. Total oxyradical scavenging capacity responses in *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the Venice lagoon (Italy) to measure the biological impact of anthropogenic activities / Camus L., Pampanin D. M., Volpato E., Delaney E., Sanni S., Nasci C. // Mar. Poll. Bull. 2004. Vol. 49. P. 801–808.
38. Freedman J., Ciriolo M. R., Peisach J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264, N 10. P. 5598–5605.
39. Yan T., Teo L. H., Sin Y. M. Effects of mercury and lead on tissue glutathione of the green mussel, *Perna viridis* L. // Bull. Environ. Contam. And Toxicol. 1997. Vol. 58. P. 845–850.
40. Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussel tissues / Viarengo A., Pertica M., Canesi L., Biasi F., Cecchini G., Orunesu M. // Mar. Environ. Res. 1988. Vol. 24. P. 355–359.
41. Cadmium-induced alterations in essential trace element homeostasis in the tissues of scallop *Mizuhopecten yessoensis* / Chelomin V. P., Bobkova E. A., Lukyanova O. N., Chekmasova N. M. // Comp. Biochem. Physiol. 1995. Vol. 110, N 3. P. 329–335.

Статья поступила в редакцию 15 марта 2012 г.