

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ЗАЩИТЫ В ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЕ (ПЕЧЕНИ) МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ЗАКИСЛЕНИЯ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

М. Шахрани, А.В. Сидоров

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

e-mail: sidorov@bsu.by

Введение

Мониторинг состояния пресных вод является непреходящей задачей исследований экологической направленности, принимая во внимание нарастания дефицита чистой пресной воды во многих регионах мира. Антропогенное загрязнение является основным источником появления в водоёмах веществ, токсичных для большинства гидробионтов [1]. Одним из экологических факторов, в частности определяющих плотность популяции моллюсков, является величина рН воды [2]. С учетом практически полного отсутствия буферной емкости у воды, понятно, что даже незначительные сдвиги баланса H^+ и OH^- , вызываемые внешними факторами, способны оказать решающее влияние на кислотно-основное состояние пресных вод. Для моллюсков, так же как для других беспозвоночных и ряда позвоночных (рыбы, амфибии), характерны значительные колебания рН внутренней среды [3]: гемолимфы или крови, в том числе опосредуемые сдвигом кислотно-основного равновесия во внешней среде. Очевидно, что изменение ионного состава интерстиция незамедлительно сказывается на скорости протекания ферментативных реакций, что приводит к установлению нового, относительно стабильного функционального уровня. Вода с низким рН способна вымывать из грунта минералы, содержащие ртуть и кадмий, токсические эффекты которых хорошо известны [4], а также создавать оптимальные условия для восстановления нитратов, основным источником поступления которых в водоёмы являются широко используемые в сельскохозяйственной практике минеральные азотные удобрения, до нитритов [5], токсичность которых для водных беспозвоночных уже на порядок выше [5, 6].

Моллюск *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) является типичным обитателем пресных вод Беларуси, зачастую предпочитая мелкие мелиоративные каналы, окружающие сельскохозяйственные угодья. Его физиолого-экологические особенности делают указанный вид идеальным для биомониторинга [7]. В отличие от данных по поведению прудовика, сведения о состоянии биохимических систем его организма, и в первую очередь антиокислительной, являющейся ведущей в детоксикации различных загрязнителей, относительно редки в научной литературе [8]. Недостаточно изучены и механизмы, определяющие характер чувствительности моллюсков к концентрации протонов во внешней среде. В этой связи нами предпринята попытка охарактеризовать антиоксидантный статус в пищеварительной железе (печени) *Lymnaea stagnalis* в условиях длительного нахождения в воде с пониженным рН, в том числе и при действии солей азотистой кислоты (нитритов).

Методы исследования

Моллюсков (*Lymnaea stagnalis*) собирали в мелких проточных водоемах (мелиоративные и водоотводные каналы) в осенний период года. В лаборатории их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 0,5 л воды) при температуре 20 ± 1 °С. Смену воды проводили каждые три дня. Пищей служили листья одуванчика (питание *ad libitum*). Во всех экспериментальных сериях использовали животных одинакового размера (длина раковины от 4 до 4,5 см) и массы (от 5 до 6 г).

Экспериментальные группы. Животные были разделены на 4 условные группы. В состав контрольной входили моллюски, содержащиеся в аквариумах с рН воды $7,3 \pm 0,1$. Опытные группы (всего 3) были представлены особями, находящимися в аквариумах с рН воды $6,3 \pm 0,1$. В качестве буфера использовали N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-

этансульфоновою кислоту (HEPES) в конечной концентрации 10 мМ. Требуемое значение pH довели при помощи 1 М раствора NaOH. Контроль за уровнем pH аквариумной воды (каждые сутки) осуществляли при помощи pH-метра PerpHecT, Model 310 (ATI Orion, USA) при 20 °С. Одна из опытных групп оставалась интактной, а две других были подвергнуты действию нитритов натрия или калия в конечной концентрации 1 мМ. Для всех рассмотренных групп длительность экспозиции в аквариумах составила одну неделю.

Система антиокислительной защиты. По окончании эксперимента осуществляли забор материала пищеварительной железы (печени) индивидуально от каждого моллюска. Пробы замораживали и хранили при минус 20 °С, используя для последующего анализа по мере необходимости. Для этого, при помощи стеклянного гомогенизатора взвешенные части печени измельчали в холодной (4 °С) дистиллированной воде, получая 5% гомогенат. Уровень восстановленного глутатиона (Г-SH) определяли спектрофотометрически (412 нм) по реакции с 5,5'-дитиобис-нитробензойной кислотой (ДТНБ, реактив Элмана) используя коэффициент молярной экстинкции $(13600 \text{ (моль/л)}^{-1} \times \text{см}^{-1})$ согласно [9]. Активность Se-зависимой глутатионпероксидазы (Se-ГП, КФ 1.11.1.9) определяли по [10], используя в качестве инициатора реакции трет-бутил перекись (конечная концентрация 2 мМ). Интенсивность процессов перекисного окисления липидов определяли по образованию в гомогенатах печени ТБК - (тиобарбитуровая кислота) активных продуктов [11]. Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1.) определяли спектрофотометрическим методом, основанным на оценке скорости аутоокисления флавоноида кверцетина [12]. Определение количества белка проводили по методу Бредфорд [13]. Для оценки оптической плотности анализируемых растворов использовали спектрофотометр Cary 50 (Variant Inc., Австралия).

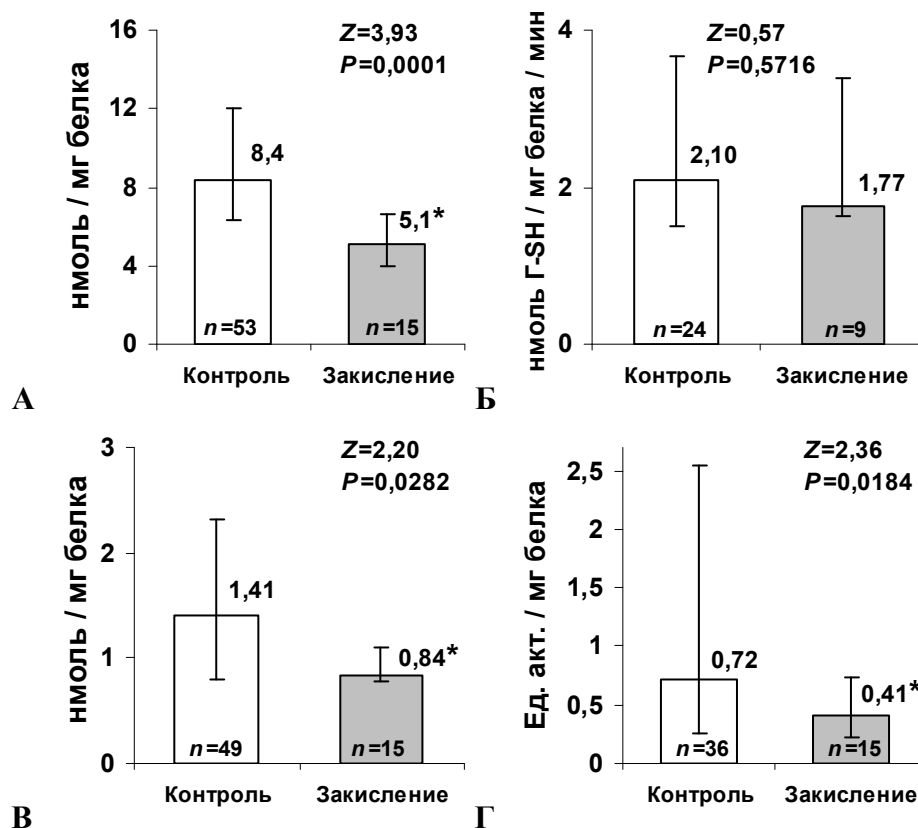
Статистика. Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами медико-биологической статистики [14]. Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали при помощи *W*-теста Шапиро–Уилка. За исключением данных по концентрации общего белка все они носили непараметрический характер. Исходя из этого, данные представлены в виде медиана (25 и 75 процентиля). Число проб (*n*) указано для каждой серии опытов отдельно. Достоверность различий оценивали при помощи *U*-критерия Манна–Уитни (сравнение двух выборок) или *H*-критерия Крускала–Уоллиса (сравнение нескольких групп). При оценке выживаемости в группах использовали метод Гехана или его обобщённый аналог, рассчитывая *z*-критерий (сравнение двух выборок) или критерий χ^2 (сравнение нескольких групп). Данные обрабатывали посредством программы Statistica 6.0. Достоверными считались результаты при уровне значимости (*P*) меньше 0,05.

Результаты и обсуждение

Содержание животных в аквариумах с pH воды 6,3 (закисление) приводило к выраженному изменению показателей системы антиокислительной защиты в печени (рисунок 1). В частности, отмечено снижение (в 1,8 раза) количества восстановленного глутатиона по сравнению с особями контрольной группы. При этом различия в активности Se-зависимой глутатионпероксидазы не носили статистически значимый характер. В тоже время, в опытной группе дополнительно отмечено 2-х кратное снижение уровня ТБК-активных продуктов, а также равновеликое, в 1,9 раза, падение активности СОД. Статистически достоверных различий ($Z=1,09$, $P=0,2770$) по количеству общего белка выявлено не было: 91,3 (82,2; 103,9) мг/мл – контрольная ($n=53$) и 78,5 (74,5; 98,5) мг/мл – опытная ($n=53$) группы.

В условиях закисления среды обитания, действие нитритов натрия (1 мМ) и калия (1 мМ) не приводит к статистически достоверным, основанным на анализе значений критерия Крускала–Уоллиса, изменениям показателей системы антиокислительной защиты в печени моллюсков (таблица 1). Анализ выживаемости моллюсков в группах, также, не выявил статистически значимых различий ни для одной из экспериментальных серий (рисунок 2).

Кожные покровы беспозвоночных, в том числе и моллюсков, достаточно свободно проницаемы для небольших ионов [3, 15], в том числе и протонов. Тем не менее, нахождение животных в условиях ацидофикации не сказывается на выживании особей, т.е. не влияет на численный состав популяции *Lymnaea stagnalis*, в том числе и при нитритной нагрузке.

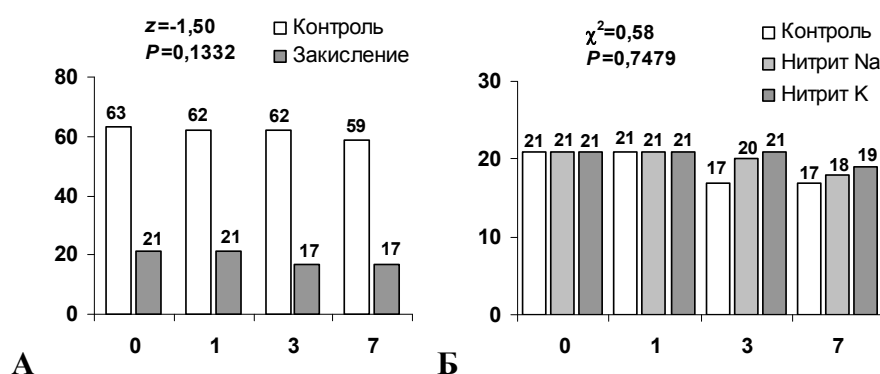


Представлено значение медианы для исследуемого показателя (числа над столбиками диаграммы) и число экспериментальных проб (n). Разброс представлен 25-м (нижний) и 75-м (верхний) процентилем. Указано значение Z (U -критерий Манна-Уитни) и уровня значимости P . Статистически достоверные различия ($P < 0,05$) отмечены звёздочкой (*).

А – уровень восстановленного глутатиона (Г-SH), Б – активность Se-зависимой глутатионпероксидазы, В – количество ТБК-активных продуктов, Г – активность СОД
Рисунок 1 – Показатели системы антиокислительной защиты в печени у моллюсков длительно содержавшихся в условиях закисления аквариумной воды

Таблица 1 – Показатели системы антиокислительной защиты в печени у моллюсков, длительно содержавшихся в условиях закисления аквариумной воды, в условиях хронического действия нитритов натрия и калия.

Экспериментальная группа / Статистика для исследованных показателей	Показатель системы антиоксидантной защиты				
	Г-SH, нмоль / мг белка	Se-ГП, нмоль Г-SH / мг белка / мин	ТБК-продукты, нмоль / мг белка	СОД, Ед. акт. / мг белка	Общий белок, мг / мл
Контроль, рН 6,3 (n – см. рисунок)	5,08 (3,94;6,59)	1,77 (1,62;3,38)	0,84 (0,77;1,11)	0,41 (0,22;0,73)	78,5 (74,5;98,5)
Нитрит Na (1 мМ), рН 6,3 ($n=18$)	6,22 (4,38;7,57)	1,34 (0,53;1,99)	0,61 (0,40;1,89)	0,47 (0,32;0,84)	97,2 (59,6;115,2)
Нитрит К (1 мМ), рН 6,3 ($n=15$)	5,82 (4,29;7,60)	2,02 (1,27;5,27)	0,98 (0,70;1,55)	0,46 (0,37;0,74)	74,4 (44,8;103,0)
Критерий Крускала-Уоллиса	$H=2,41$ $P=0,3002$	$H=3,26$ $P=0,1963$	$H=0,78$ $P=0,6784$	$H=2,68$ $P=0,2614$	$H=1,73$ $P=0,4202$



Ось абсцисс – время (дни), прошедшее с момента помещения (принят за 0) улиток в аквариумы с новыми условиями содержания. Ось ординат – число живых особей (точное значение представлено над столбиками диаграммы).

Указано значение z или χ^2 (тест Гехана) и уровня значимости P .

А – при защелении аквариумной воды, Б – при действии нитритов натрия (Na) и калия (K) в условиях ацидофикации (контроль)

Рисунок 2 – Выживаемость моллюсков в зависимости от условий содержания

Отчасти это может быть связано с тем, что прудовик обладает достаточно эффективным механизмом поддержания постоянства кислотно-основного равновесия внутренней среды организма, что позволяет свести к минимуму колебания pH гемолимфы, возникающие под действием внешних факторов [16]. При этом основным источником щелочи для нейтрализации кислот служит содержащая кальций раковина. Вместе с тем, защеление воды приводит к нарушению редокс равновесия, что позволяет рассматривать его действие на организм в качестве стрессового. Антиокислительная система защиты является ведущим образованием в процессе детоксикации и биотрансформации ксенобиотиков, а её состояние коррелирует с наличием загрязнителей в окружающей среде. Одним из типичных эффектов является снижение уровня восстановленного глутатиона (до 80%), связанное с изменением глутатионпероксидазной и глутатионредуктазной активностей, как это отмечено для пресноводного двустворчатого моллюска *Unio tumidus* [17], и что вполне согласуется с полученными данными.

В отношении других ключевых ферментов антиокислительной защиты ситуация может быть диаметрально противоположной. В частности, у *Mytilus galloprovincialis* отмечен повышенный уровень СОД у животных постоянно обитающих в загрязненных водах, по сравнению с особями, живущими в условиях меньшего органического загрязнения [18], а действие кадмия ассоциируется с падением активности цитозольной СОД [19]. В целом справедливо, что распределение ферментов антиокислительной защиты и их активность зависит от вида ткани и места обитания животного и не зависит от линейных размеров особи, как это было отмечено для мидии *Perna viridis* [20]. В этой связи наблюдаемое в наших экспериментах падение супероксиддисмутазной активности хорошо согласуется со снижением уровня перекисного окисления липидов, определяемого по падению концентрации ТБК-активных продуктов, хотя окислительный стресс у моллюсков, как правило, приводит к возрастанию уровня последних [21, 22].

Несмотря на высокую токсичность нитритов для гидробионтов, *Lymnaea stagnalis* демонстрируют высокую устойчивость к действию данного загрязнителя, как и целый ряд других пресноводных моллюсков (*Anodonta anatina*, *Megaloniais nervosa*, *Potamopyrgus antipodarum*, *Unio crassus*, *Pomacea paludosa*) для которых полудетальные дозы нитрит-аниона превышают 10 мМ уровень [23].

Более того, нитрит-анион в миллимолярных концентрациях отмечен в цитоплазме отдельных нейронов моллюска, хотя его содержание в гемолимфе может быть на несколько порядков меньше, что является следствием быстрого окисления белками крови, – оксигемоглобином или гемоцианином [24]. Очевидно, что в этих условиях, даже

пониженный уровень рН не приводит к возрастанию продукции монооксида азота в гемолимфе моллюска, посредством превращения нитрит-аниона [25]. Как следствие, уровень свободно-радикальной нагрузки в жидкостях интерстиция остаётся неизменным и не приводит к значимым сдвигам про-/антиоксидантного баланса в клетках пищеварительной железы. Другими словами, гемолимфа в этих условиях выступает в роли внутри организменного барьера, препятствующего реализации токсических эффектов, связанных с возрастанием концентрации нитритов и/или свободных протонов в среде обитания.

Выводы

Нарушение кислотно-основного равновесия пресных вод можно рассматривать в качестве фактора, оказывающего существенное влияние на показатели системы антиокислительной защиты в органах пищеварительной системы пресноводных моллюсков, и вероятного способного к потенцированию токсических эффектов различных органических и неорганических загрязнителей.

Список литературы

1. Ажица, Я.И. Экологические аспекты загрязнения окружающей среды нитритами и нитратами / Я.И. Ажица, В.П. Реутов, Л.П. Каюшин / Физиология человека. – 1990. – Т.16., № 3. – С.131–149.
2. Hammani, H. Ecology of *Lymnaea truncatula* Muller, intermediate host of *Fasciola hepatica* Linne in the microclimate of Tozeur (southeast of Tunisia) / H. Hammani, A. Ayadi // Bull. Soc. Pathol. Exot. – 1999. – Vol. 92. – P. 302–304.
3. Проссер, К.Л. Дыхательные функции крови / К.Л. Проссер // Сравнительная физиология животных. В 3 т. – М.: Мир, 1977. Т. 2. – С. 5–83.
4. Muller, T. H. Activation of three types of membrane currents by various divalent cations of identified molluscan pacemaker neurons / T. H. Muller, D. Swandula, H. D. Lux // J. Gen. Physiol. – 1989. – Vol. 94. – P. 997–1014.
5. Russo, R.C. Ammonia, nitrite and nitrate / R.C. Russo // Fundamentals of Aquatic Toxicology: – Washington DC: Hemisphere Publishing Corporation, 1985. – P. 455–471.
6. Carballo, M. Effects of waterborne copper, cyanide, ammonia, and nitrite on stress parameters and changes in susceptibility to saprolegniosis in rainbow trout / M. Carballo, M.J. Munoz, M. Cuellar, J.V. Tarazona // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – Vol. 61. – P. 2108–2112.
7. Elder, J.F. Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface-water systems / J.F. Elder, J.J. Collins // Rev. Environ. Contam. Toxicol. – 1991. – Vol. 122. – P. 37–79.
8. Сидоров, А.В. Состояние антиокислительной защиты в центральных нервных ганглиях моллюска *Lymnaea stagnalis* при модуляции активности NO-ергической системы / А.В. Сидоров, Г.Т. Маслова // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 2008. – Т. 44, № 5. – С. 453–458.
9. Habeeb, A.F. Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent / A.F. Habeeb // Methods Enzymol. – 1972. – Vol. 25. – P. 457–464.
10. Flohe, L. Assays of glutathione peroxidase / L. Flohe, W.A. Cuzler // Methods Enzymol. – 1984. – Vol. 105. – P. 114–126.
11. Костюк, В.А. Определение продуктов перекисного окисления липидов с помощью тиобарбитуловой кислоты в анаэробных условиях / В.А. Костюк, А.И. Потапович // Вопр. мед. химии. – 1987. – Т. 33. – С. 115–118.
12. Kostyuk, V.A. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple assay for determination of superoxide dismutase / V.A. Kostyuk, A.I. Potapovich // Biochem. Int. – 1989. – Vol. 19. – P. 1117–1124.
13. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.

14. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
15. Laverack, M.S. Tactile and chemical perception in earthworms / M.S. Laverack // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1961. – Vol. 2. – P. 22–34.
16. Сидоров, А.В. Кислотно-основное равновесие модулирует дыхательное и пищевое поведение моллюска *Lymnaea stagnalis* / А.В. Сидоров, И.П. Полянина // *Журн. эволюц. биохим. и физиол.* – 2003. – Т. 39, № 5. – С. 445–450.
17. Cossu, C. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies / C. Cossu [et al.] // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 1997. – Vol. 38. – P. 122–131.
18. Nasci, C. Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis* transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy) / C. Nasci, N. Nesto, R.A. Monteduro, L. Da Ros // *Mar. Environ. Res.* – 2002. – Vol. 54. – P. 811–816.
19. Orbea, A. Interactive effects of benzo(a)pyrene and cadmium and effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on antioxidant and peroxisomal enzymes and peroxisomal volume density in the digestive gland of mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. / A. Orbea, M. Ortiz-Zarragoitia, M.P. Cajaraville // *Biomarkers.* – 2002. – Vol. 7. – P. 33–48.
20. Lau, P.S. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis* / P.S. Lau, H.L. Wong // *Mar. Pollut. Bull.* – 2003. – Vol. 46. – P. 1563–31572.
21. Richardson, B.J. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses? / B.J. Richardson [et al.] // *Mar. Pollut. Bull.* – 2008. – Vol. 57. – P. 503–514.
22. Vidal-Liñán, L. Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain) / L. Vidal-Liñán, J. Bellas, J.A. Campillo, R. Beiras // *Chemosphere.* – 2010. – Vol. 78. – P. 265–272.
23. Camargo, J.A. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates / J.A. Camargo, A. Alonso, A. Salamanca // *Chemosphere.* – 2005. – Vol. 58. – P. 1255–1267
24. Stander, J.S. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms / J.S. Stander, D.J. Singel, J. Loscalzo // *Science.* – 1992. – Vol. 258. – P. 1898–1902.
25. Cruz, L. Nitrite and nitrate levels in individual molluscan neurons: single-cell capillary electrophoresis analysis / L. Cruz, L.L. Moroz, R. Gillette, J.V. Sweedler // *J. Neurochem.* – 1997. – Vol. 69. – P. 110–115.

**ANTIOXIDANT DEFENCE IN DIGESTIVE GLAND
OF MOLLUSC *LYMNAEA STAGNALIS* IN CONDITIONS
OF CHRONIC ACIDIFICATION OF ENVIRONMENT**

M. Shahrani, A.V. Sidorov

Belarusian State University, Minsk, Belarus

e-mail: sidorov@bsu.by

Weekly incubation of molluscs in aquariums with water pH $6,3 \pm 0,1$ results in decrease of reduced glutathione level (1,8-time), superoxide dismutase activity (1,9-time) and amount of TBA-reactive products (2,0-time) in comparison with control group maintained at aquariums with water pH $7,3 \pm 0,1$. In acidic conditions, there were no statistically significant effects of sodium and potassium nitrites (both in final 1 mM concentration) on antioxidant defence system in mollusc's digestive gland in comparison with control group at the same pH level. It is assumed that mentioned above changes are due to the redox disbalance in animal's internal environment.