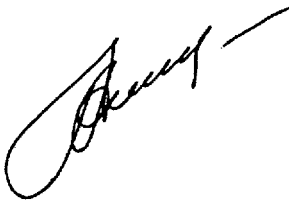


На правах рукописи

ДОВЖЕНКО Надежда Владимировна

РЕАКЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ДВУСТВОРЧАТЫХ
МОЛЛЮСКОВ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ПОВРЕЖДАЮЩИХ ФАКТОРОВ
СРЕДЫ



03.00.16 – экология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток

2006

Работа выполнена в лаборатории морской экотоксикологии Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Челомин Виктор Павлович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Лукьянова Ольга Николаевна
кандидат биологических наук
Спрыгин Владимир Геннадьевич

Ведущая организация: Институт биологии внутренних вод
им. И.Д. Папанина РАН

Защита состоится « 8 » декабря 2006 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.056.02 при Дальневосточном государственном университете МОН РФ по адресу: 690600, г. Владивосток, Океанский пр-т, 37, научный музей ДВГУ.
Факс: (4232) 268543

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Дальневосточного государственного университета МОН РФ

Автореферат разослан «3» ноября 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Ю.А. Галышева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время масштабы загрязнения морских экосистем все сильнее опережают возможности научно-обоснованных оценок и прогнозирования последствий антропогенного воздействия. Поэтому до сих пор остается актуальной проблема по разработке и усовершенствованию экспресс-методов контроля, диагностики и прогнозирования влияния загрязняющих веществ на состояние биоты. Наиболее перспективным направлением в этой области является подход на биохимическом уровне.

На сегодняшний день общепринятым универсальным механизмом патогенеза в организме является теория окислительного стресса. Однако для морских организмов, в частности беспозвоночных, основные положения этой теории развиты очень слабо. В связи с этим предлагается использовать ряд биохимических показателей развития свободно-радикальных процессов в биологической системе в комплексе с интегральным маркером, которые указывают не только на степень деструкции отдельных органов и тканей, но и на общее состояние организма, что позволяет объективно оценить уровень воздействия разнообразных факторов среды на живые организмы. В качестве объектов исследований выбраны наиболее массовые и широко распространенные в заливе Петра Великого представители двустворчатых моллюсков, которые обладают не только высоким коэффициентом концентрирования металлов и слабо развитыми системами детоксикации, но и являются объектами промысла, марикультуры и широко используются человеком в качестве ценного деликатесного пищевого продукта.

Цель и задачи работы. Выявить степень участия антиоксидантной системы в защитной реакции морских организмов, испытывающих воздействие комплексного загрязнения водной среды, исходя из представлений о ведущей роли окислительного стресса в развитии различных патологических изменений.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать метод для оценки общего антиоксидантного потенциала биологической системы;
2. Провести сравнительный анализ содержания отдельных компонентов антиоксидантной системы в тканях массовых видов двустворчатых моллюсков;

3. В экспериментальных условиях оценить степень воздействия аноксии - реоксигнации и аккумуляции тяжелых металлов на биохимические показатели окислительного стресса и охарактеризовать роль антиоксидантной системы у двустворчатых моллюсков в экстремальных условиях;
4. На основе экспериментов по пересадке моллюсков из относительно чистых районов в загрязненную акваторию проследить динамику развития процессов окислительного стресса и оценить степень чувствительности антиоксидантной системы к комплексу тяжелых металлов, присутствующих в воде и донных отложениях;
5. Выявить взаимосвязь изменения уровня индивидуальных компонентов и антиоксидантной системы в целом с количеством продуктов перекисного окисления липидов в тканях моллюсков, обитающих в акваториях зал. Петра Великого с различной степенью загрязнения.

Научная новизна. Впервые дана комплексная характеристика антиоксидантной системы массовых видов дальневосточных двустворчатых моллюсков. Выявлена высокая чувствительность отдельных антиоксидантов к воздействию неблагоприятных факторов среды, в частности к тяжелым металлам и аноксии. Заложены теоретические и практические основы применения биохимических маркеров окислительного стресса в диагностическом и прогностическом мониторинге морской среды.

Практическое значение работы. Результаты могут быть использованы при выборе научно-обоснованных критериев рационального природопользования и оценке допустимой нагрузки для морских прибрежных экосистем.

Положения, выносимые на защиту

1. В основе механизмов действия повреждающих факторов среды лежит окислительный стресс, что выражается в накоплении продуктов перекисной деструкции липидов и снижении антиоксидантного потенциала организма;
2. Для оценки воздействия неблагоприятных факторов среды на гидробионтов предлагается универсальный биохимический индикатор состояния антиоксидантной системы (интегральной антирадикальной активности), отражающий предрасположенность организма к окислительному стрессу.

Апробация работы. Результаты и основные положения диссертации были представлены и обсуждены на Международных конференциях: «Прибрежное рыболовство – XXI век, 2001» (Южно-Сахалинск, 2001), «Современные проблемы океанологии шельфовых морей России» (Ростов-на-Дону, 2002), Ocean 2003. Marine Technology and Ocean Science Conference (San-Diego, 2003), PRIMO 12 (Florida, 2003), «Биотехнология – охране окружающей среды» (Москва, 2004), «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2004), Sixth IOC/ WESTPAC International Scientific Symposium Challenges for Marine Science in the Western Pacific (Hangzhou, China, 2004), «Mollusks of the Northeastern Asia and Northern Pacific: Biodiversity, Ecology, Biogeography and Faunal History» (Vladivostok, 2004), «Current problems of aquatic toxicology» (Vorok, Russia, 2005), «Проблемы устойчивого функционирования водных и наземных экосистем» (Ростов-на-Дону, 2006); Международный симпозиум: «Экология 2006» (Солнечный Берег, Болгария, 2006).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 работ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 196 страницах, включает 8 таблиц и 50 рисунков, состоит из введения, 6 глав, выводов, списка литературы. Список литературы включает 247 источников, из которых 188 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает сердечную благодарность своему научному руководителю, д.б.н., ст.н.с. В.П. Челомину за всестороннюю помощь в процессе работы над рукописью, искреннюю признательность коллективу Лаборатории морской экотоксикологии, а также к.б.н. Н.Н. Бельчевой и д.б.л. В.А. Ракову за ценные рекомендации и консультации. Особые слова благодарности автор приносит сотруднику лаборатории физиологии ИБМ к.б.н. В.Я. Кавуну за профессиональный сбор материала, многолетнюю поддержку и постоянную помощь. Также автор выражает признательность за ценные советы, консультации по статистической обработке материала сотруднику ИБМ ДВО РАН к.б.н. В.В. Касьян.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Представлена краткая характеристика современной экологической ситуации в шельфовой зоне Мирового океана и состояния отдельных морских акваторий. Подробно освещена проблема антропогенного загрязнения и его негативного последствия на состояние залива Петра Великого. Рассмотрены современные методы контроля и оценки качества морской среды в биомониторинге. Особое внимание уделено механизмам развития окислительного стресса и роли антиоксидантной системы в живом организме.

Глава 2. РАЙОН РАБОТ. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В основу работы положены результаты, полученные автором с 2001 по 2005 г.

В главе дана краткая физико-географическая характеристика зал. Петра Великого. В работе использованы широко распространенные в зал. Петра Великого массовые виды двустворчатых моллюсков (*Crenomytilus grayanus*, *Modiolus kurilensis**, *Anadara broughtonii*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Crassostrea gigas*, *Arca boucardi*, *Glycymeris yessoensis*, *Mercenaria stimpsoni*). Данную группу беспозвоночных объединяет некоторые общие черты физиолого-биохимической организации, но существенно отличается особенность их обитания. Объекты исследований собраны водолазным способом в разных по антропогенной нагрузке акваториях Амурского и Уссурийского заливов (рис. 1).

В сериях аквариумных экспериментов по оценке состояния антиоксидантной системы под воздействием неблагоприятных факторов (аккумуляция тяжелых металлов (Cd и Cu), аноксия и реоксигенация) были использованы *Modiolus kurilensis* и кровьсодержащий моллюск *Anadara broughtonii*. Нагрузка Cd – 100 мкг/л (CdSO₄) в течение 408 ч, и Cu – 25 мкг/л (CuSO₄) в течение 240 ч. Условия аноксии создавали при содержании моллюсков на воздухе с принудительно сомкнутыми створками раковин (Eertman et al., 1993). Эксперименты с пересадкой мидии Грея из условно чистого района (о-в Рейнеке) и зоны сезонного апвеллинга (о-в Большой Пелис) в антропогенно загрязненную б. Десантная проводили с

* Вид *M. kurilensis* (* Ю. Коан с соавторами (Coan et al., 2000) синонимизировали этот вид с широко распространенным в boreальных водах Тихого и Атлантического океанов *Modiolus (Modiolus) modiolus* (L., 1758).

августа по октябрь. Экспериментальных мидий отбирали через каждые 10 суток. В начале эксперимента были отобраны экземпляры мидий из постоянных поселений. Для биохимических анализов были использованы жабры и пищеварительная железа - основные органы моллюсков, осуществляющих транспорт, биотрансформацию и депонирование всех поступающих в организм ксенобиотиков.

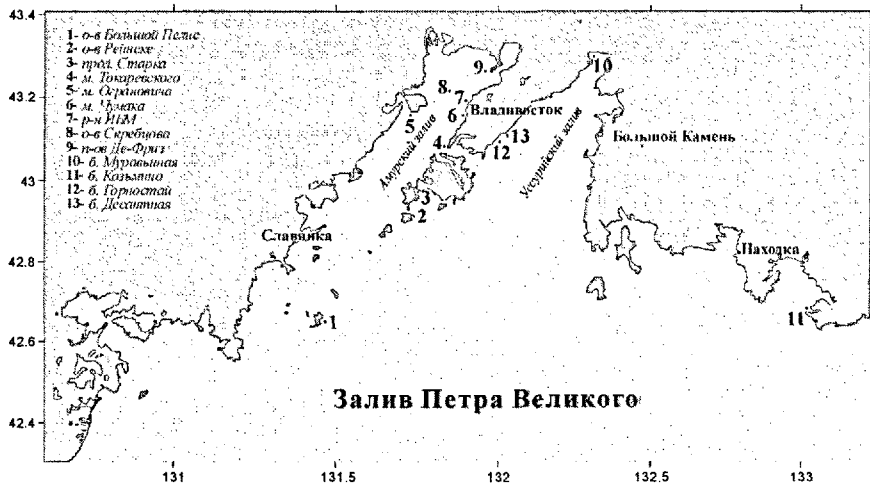


Рис. 1. Карта-схема района сбора материала в зал. Петра Великого (Японское море)

Биохимические методы исследований: концентрацию белка в биологических образцах определяли на основе адсорбции бромфенолового синего (Greenberg and Gaddock, 1982). Метод определения глутатиона основан на реакции тиогруппы цистеина с реактивом Элмана - дитионитробензойной кислотой (Moron et al., 1979). Для количественного определения каротиноидов использовали метод, предложенный С. Кэмпбеллом и В. Карнауховым (Campbell, 1969; Карнаухов, 1978). Степень развития окислительного стресса оценивали по изменению концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): диеновые конъюгаты - ДК (Владимиров, Арчаков, 1972), малоновый диальдегид - МДА (Buege and Aust, 1978) и липофусцинподобные вещества (основания Шиффа) - ЛФ (Shimasaki et al., 1988). Для оценки уровня общего антиоксидантного потенциала организма нами предложен новый показатель (индекс) интегральной

антирадикальной активности. Метод основан на определении способности биологической системы нейтрализовать гидроксильный радикал, который генерировали *in vitro* в Fe-аскорбатной системе. В качестве акцептора использовали 2-оксибензойную кислоту (салициловая кислота). Продукты окисления салициловой кислоты (2,4-дигидроксibenзойную кислоту) регистрировали с помощью обращенно-фазной ВЭЖХ. Степень подавления окисления салициловой кислоты (выраженная в процентах от контроля) эквивалентна уровню антиоксидантного потенциала биологического образца. Данный показатель, названный нами индексом интегральной антирадикальной активности (ИИА) отражает чувствительность или предрасположенность организма к окислительному стрессу. Чем выше значение индекса (в %), тем выше устойчивость антиоксидантной защиты организма к воздействию оксидантов (Довженко и др., 2005). Для количественного анализа содержания тяжелых металлов в тканях моллюсков был применен атомно-абсорбционный метод (Julshamn, Andersen, 1983).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 и Microsoft Excel 2000.

Глава 3. ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ МОРСКИХ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ

При проведении сравнительного анализа содержания компонентов антиоксидантной системы в тканях двустворчатых моллюсков, выявлены видовые и тканевые особенности в содержании отдельных антиоксидантов и уровне интегральной антирадикальной активности. У большинства исследованных моллюсков уровень глутатиона в тканях пищеварительной железы был значительно выше, чем в тканях жабр. Исключением из этого ряда моллюсков стала анадара Броутона, у которой содержание глутатиона в обеих тканях было практически одинаковым. Особенно выделялись типичные представители сублиторали - семейство Mytilidae (*M. kurilensis* и *C. grayanus*) и *C. gigas*: в пищеварительной железе этих моллюсков уровень глутатиона был самым высоким, в несколько раз выше, чем у других исследованных нами видов (рис. 2). В группе эндобионтов особый интерес представляет *M. stimpsoni*, в тканях которой было

отмечено самое низкое содержание глутатиона по сравнению со всеми исследованными моллюсками.

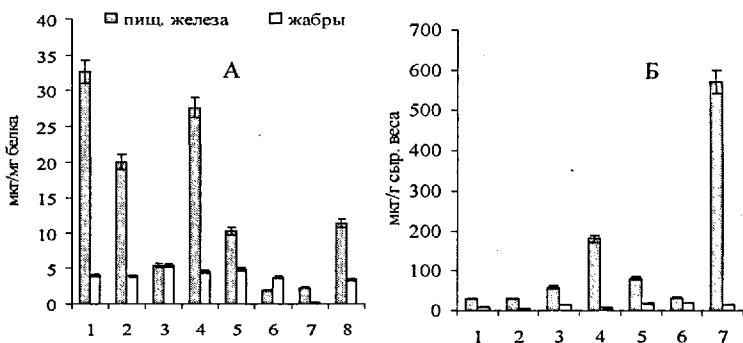


Рис. 2. Сравнительная характеристика отдельных антиоксидантов в тканях массовых видов двусторчатых моллюсков. А – глутатион; Б – каротиноиды (1 – *C. grayanus*, 2 – *C. gigas*, 3 – *A. broughtonii*, 4 – *M. kurilensis*, 5 – *A. boucardi*, 6 – *M. yessoensis*, 7 – *M. stimpsoni*, 8 – *G. yessoensis*) (n=5, P<0.05)

В клетках пищеварительной железы всех исследованных моллюсков отмечены высокие концентрации каротиноидов, что превышало в 10-30 раз концентрации пигмента в жабрах. При этом самое высокое содержание каротиноидов выявлено в клетках пищеварительной железы глицимериса и модиолуса.

Уровень интегральной антирадикальной активности в тканях моллюсков (индекс ИАА) отразил результаты, полученные для отдельных составляющих антиоксидантной системы (глутатиона и каротиноидов) (рис. 3).

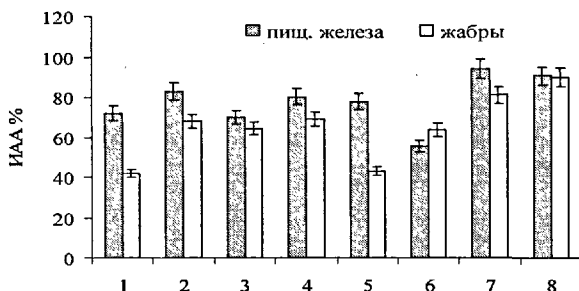


Рис. 3. Сравнительная характеристика уровня индекса ИАА в тканях массовых видов двусторчатых моллюсков (1 – *C. grayanus*, 2 – *C. gigas*, 3 – *A. broughtonii*, 4 – *M. kurilensis*, 5 – *A. boucardi*, 6 – *M. yessoensis*, 7 – *M. stimpsoni*, 8 – *G. yessoensis*) (n=5, P<0.05)

У всех исследованных моллюсков уровень ИАА в клетках пищеварительной железы был выше, чем в жабрах. Исключение составил стеноокисильный

приморский гребешок, у которого, наоборот, в жабрах уровень ИАА был существенно выше ($64.56 \pm 3.18\%$), чем в пищеварительной железе ($44.09 \pm 2.57\%$). Высокий уровень антиоксидантный потенциала отмечен в клетках пищеварительной железы и жабр глицимериса и мерценарии. Необходимо отметить, что по нашим и литературным данным, уровень ИАА по абсолютным значениям у двустворчатых моллюсков и морских беспозвоночных в целом значительно выше, чем у млекопитающих.

Исследованные моллюски, в основном - эврибионтные животные, выдерживающие широкий диапазон температур, изменения солёности, содержания в воде кислорода, различных взвешенных частиц и токсических веществ. Очевидно, в процессе адаптации к данным условиям у таких моллюсков как *S. grayanus*, *S. gigas*, *A. broughtonii*, *M. kurilensis*, *M. stimpsoni*, не способных (в отличие от *M. yessoensis*) к избеганию неблагоприятных факторов среды, сформировалась высокая по активности и пластичная многокомпонентная структура антиоксидантной системы. Эта особенность и отразилась на полученных результатах, которые свидетельствуют о высоком уровне антиоксидантной системы и ее связи с эколого-физиологическими особенностями морских двустворчатых моллюсков. В связи с этим есть основания полагать, что и стратегия участия антиоксидантной системы в защите от окислительного стресса в тканях различных по обитанию представителей двустворчатых моллюсков будет существенно отличаться. Принимая во внимание важную роль этой защитной системы в жизнедеятельности данной группы организмов, следует отметить, что индекс ИАА может отражать не только состояние всей антиоксидантной системы, но и, в определенной мере, степень подверженности организма к окислительному стрессу.

Глава 4. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В ТКАНЯХ РАЗЛИЧНЫХ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ

Явление окислительного стресса, сопровождающегося деструктивным повреждением основных биоструктур, чрезвычайно широко распространено в природе и обнаруживается, практически, во всех органах и тканях организмов на любом уровне организации. Принимая во внимание высокую чувствительность процессов генерации оксидантов к воздействию неблагоприятных факторов

среды (природного и антропогенного характера), в последующих экспериментах мы исследовали влияние аккумуляции тяжелых металлов и дефицита кислорода (аноксия – реоксигенация) на активность антирадикальной системы и образование продуктов окисления мембранных липидов в тканях морских двустворчатых моллюсков. Учитывая важную роль антиоксидантной защиты в метаболизме кислорода в экстремальных условиях, часть работы посвящена исследованию влияния аноксии и последующей реоксигенации на состояние антиоксидантной системы и развитие процессов окислительного стресса на примере одного из самых устойчивых к недостатку кислорода моллюсков *Anadara broughtonii*. Аноксия (168 ч) вызывала общее подавление антиоксидантной активности, снижение уровня глутатиона и сопровождалась интенсивным накоплением продуктов ПОЛ в тканях моллюсков, что свидетельствовало о развитии окислительного стресса (рис. 4).

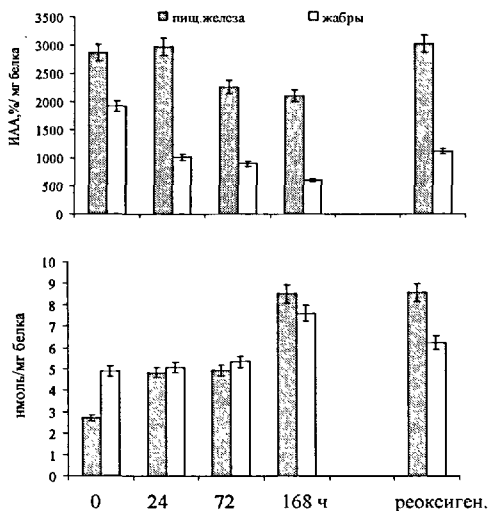


Рис. 4. Развитие окислительного стресса в тканях *A. broughtonii* под воздействием аноксии. А – динамика изменения уровня ИАА; Б – динамика накопления продуктов ПОЛ (МДА) в тканях моллюсков ($n=5$, $P<0.05$)

В процессе реоксигенации (72 ч) в пищеварительной железе анадары наблюдалось полное восстановление антиоксидантного потенциала, тогда как в жабрах – только частично. При этом уровень МДА незначительно снижился в жабрах, и, практически, не изменялся в пищеварительной железе моллюсков. Полученные результаты выявили общее подавление антиоксидантной активности (индекс ИАА, содержание глутатиона) в исследованных тканях экспериментальных

моллюсков *A. broughtonii* в условиях аноксии. Однако, интенсивность окислительного процесса (накопление продуктов деструкции липидов) в этих тканях различна и во многом, определяется временем нахождения в данных условиях и степенью развития механизмов детоксикации. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о высокой лабильности антиоксидантной системы, что, очевидно, и обеспечивает повышенную резистентность *A. broughtonii* к такому стрессовому фактору как аноксия. В целом, экспериментальные исследования показали, что антиоксидантная система является одной из основных звеньев биохимической защиты и адаптации моллюсков к колебаниям доступности кислорода.

В дальнейших сериях экспериментов мы исследовали характер ответной реакции антиоксидантной системы на аккумуляцию такого токсичного металла как Cd. Количество депонированного металла в исследованных тканях рассматривалось как своеобразный интегральный показатель, отражающий степень нагрузки на биохимические процессы и физиологические функции моллюсков. При этом выявлена видовая особенность *M. kurilensis*: в тканях жабр этого моллюска наблюдалась более интенсивная аккумуляция металла, чем в пищеварительной железе (рис. 5А).

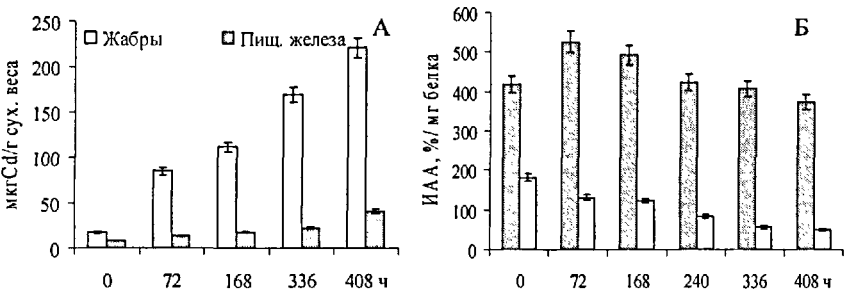


Рис. 5. А – динамика накопления Cd тканями *M. kurilensis*
 Б – реакция антиоксидантной системы *M. kurilensis* на аккумуляцию Cd (n=5, P<0.05)

Процесс аккумуляции кадмия сопровождался интенсивным накоплением продуктов ПОЛ и подавлением антиоксидантного потенциала в тканях модиолуса, что, указывало на развитие окислительного стресса. На протяжении всего

экспериментального периода наиболее существенно активность антиоксидантной системы снижалась в клетках жабр, где отмечена и самая высокая степень аккумуляции этого металла. В пищеварительной железе наблюдался двухфазный ответ антиоксидантной системы на накопление кадмия (рис. 5Б).

Аналогичная картина наблюдалась в экспериментах с медью - с первых часов эксперимента уровень ИАА в клетках жабр и пищеварительной железы *M. kurilensis* существенно снизился и к концу экспозиции не превышал 30% и 69% от исходных значений соответственно. В отличие от экспериментов с кадмием, аккумуляция меди сопровождалась более быстрым снижением антирадикальной активности защитной системы в тканях моллюсков. Вследствие этого, именно снижение способности антиоксидантной системы инактивировать высокореакционные оксирадикалы, наблюдаемые в экспериментах, рассматривается как вероятная причина формирования окислительного стресса и накопления продуктов окислительной деструкции липидов в тканях моллюсков.

Учитывая, что в природных условиях моллюски могут испытывать одновременно и действие тяжелых металлов, и резкие перепады в доступности кислорода (вплоть до аноксии), были проведены соответствующие эксперименты. Под влиянием аноксии степень уязвимости антиоксидантной защиты, особенно в клетках пищеварительной железы у экспериментальных моллюсков *M. kurilensis*, подвергнутых воздействию как кадмия, так и меди, заметно возросла (рис. 6).

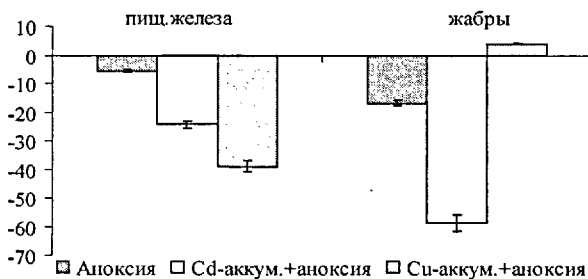


Рис. 6. Влияние аккумуляции и аноксии на уровень антиоксидантной активности в тканях *M. kurilensis* (n=5, P<0.05)

В результате этих экспериментов установлено, что аккумуляция ТМ потенцирует реакцию антиоксидантной системы на аноксию. Существенное снижение уровня ИАА в условиях кратковременной аноксии на фоне накопления токсичных металлов сопровождалось развитием окислительного стресса. Кроме

того, ответная реакция моллюсков на кислородное голодание в этих условиях носила выраженную тканевую специфичность - заметное различие в изменении уровня ИАА в клетках пищеварительной железы и жабр. Результаты показали, что действие меди носило как токсический, так и стимулирующий характер.

Глава 5. РЕАКЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

В настоящее время в экотоксикологических исследованиях применяют подход, получивший в литературе название «Активный биомониторинг». На основе экспериментально-полевых исследований по пересадке мидии Грея из относительно чистых районов (акватории вблизи о-вов Рейнеке, Б. Пелис) в антропогенно загрязненную акваторию б. Десантная была прослежена динамика развития процессов окислительного стресса в тканях моллюсков и оценена степень чувствительности антиоксидантной системы к комплексу тяжелых металлов, присутствующих в воде и донных отложениях. Первоначально были получены биохимические показатели для моллюсков, обитающих в выбранных нами биотопах, характеризующих уровень активности антиоксидантной системы и степень окислительных процессов в тканях (таблица).

Таблица. Сравнительная характеристика антиоксидантной системы и продуктов ПОЛ в тканях *S. grayanus* из разных биотопов зал. Петра Великого (П – пищеварительная железа; Ж – жабры) (n=5, P<0.05)

Место обитания мидий/ ткань		Активность АО ферментов			ИАА (%)	Продукты ПОЛ		
		Каталаза (мкмоль/мин/мг белка)	СОД (ед. акт-ти/мг белка)	ГР (нмоль/мин/мг белка)		ДК (мкмоль/мг липидов)	МДА нмоль/мг белка	ОШ (УЕ × 10 ⁻² /г сыр. ткани)
о-в Рейнеке	Ж	14.12±1.7	77.3±6.4	20.9±1.7	38.9±2.8	1.17±0.29	4.03±0.62	20.3±2.7
	П	106.7±1.8	187.9±8.8	45.4±5.7	50.0±3.3	2.11±0.34	1.75±0.34	87.7±5.9
о-в Б. Пелис	Ж	15.3±2.1	228±12.1	51.3±2.9	34±2.4	1.37±0.16	3.81±0.21	24.4±11.9
	П	120.9±7.3	86±5.31	39.5±2.7	34.3±2.34	2.07±0.30	1.48±0.16	117.7±43.7
б. Десантная	Ж	27.7±4.7	232.5±16.5	44.0±5.9	25.4±2.4	3.44±0.38	2.49±0.46	84.4±5.4
	П	180±13.9	213.0±7.2	25.9±2.2	40.8±3.7	8.76±0.51	6.74±0.71	613±10.8

Повышенная активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатион-редуктазы), высокое содержание продуктов ПОЛ в тканях указывают на то, что в мидиях, обитающих в б. Десантная, резко стимулированы проокислительные процессы, характерные для состояния окислительного стресса. В результате экспериментальной пересадки мидии Грея из акваторий вблизи островов Рейнеке и Б. Пелис в загрязненную б. Десантная была прослежена

динамика изменения уровня ИАА (рис.7) и развития окислительного стресса в тканях моллюсков (рис. 8).

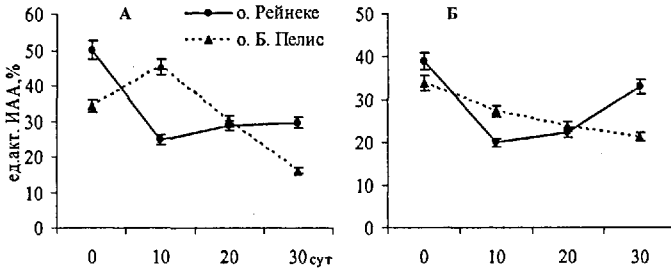


Рис. 7. Изменение уровня ИАА в тканях *C. grayanus* после переноса в б. Десантная (А - пищеварительная железа; Б - жабры) ($n=5$, $P<0.05$)

Получены результаты, свидетельствующие о высокой чувствительности как низкомолекулярного звена, так и антиоксидантной системы в целом к загрязнению. С первых дней пересадки отмечалась ярко выраженная реакция активности всех антиоксидантных ферментов на присутствие загрязняющих веществ, содержащихся в водах б. Десантная. Наблюдалось усиленное накопление продуктов ПОЛ в тканях мидий обеих популяций, что указывало на развитие окислительного стресса (рис. 8).

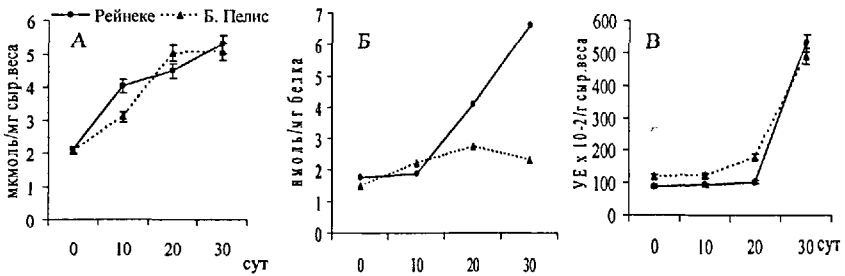


Рис. 8. Изменение уровня продуктов ПОЛ в пищеварительной железе *C. grayanus* после переноса в б. Десантная (А - диеновые конъюгаты; Б - МДА; В - липофусцин) ($n=5$, $P<0.05$)

Однако характер накопления продуктов ПОЛ в тканях моллюсков о-ва Б. Пелис существенно отличался от другой популяции, что вероятно, можно объяснить преадаптированностью этих моллюсков к повышенному содержанию микроэлементов в воде и донных отложениях, обусловленного «сезонным апвеллингом» в данном районе.

Глава 6. БИОМОНИТОРИНГ АКВАТОРИЙ ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО

В хронологическом отношении накопление пероксидов и дезорганизация в составе основных компонентов антиоксидантной системы может быть наиболее ранним этапом развития всей совокупности событий, приводящих организм к окислительному стрессу с последующим летальным исходом. А в условиях интенсивного загрязнения прибрежных акваторий развитие этих процессов представляется наиболее реальным, подтверждением чему служат результаты лабораторных и полевых исследований последних лет (Regoli, Principato, 1995; Livingstone, 2001; Lesser, 2006). На основе биохимических маркеров окислительного стресса и уровня антиоксидантного потенциала организма, был проведен мониторинг акваторий зал. Петра Великого. В качестве организмов-мониторов были использованы широко распространенные моллюски: гигантская устрица и анадара Броутона, отобранные в разных акваториях залива Петра Великого (п-ов Де-Фриза, о-в Скребцова, прибрежный район водолазной станции Института биологии моря – «ИБМ» (Амурский залив) и бухты Горностаи и Муравьиная (Уссурийский залив). Кроме устрицы и анадары, в работе были использованы *S. grayanus*, обитающие в разных по степени антропогенной нагрузки районах зал. Петра Великого (острова Б. Пелис и Рейнеке, пролив Старка (вблизи о-ва Попова), мысов Токаревского, Чумака, Ограновича, прибрежный район «ИБМ», бухты Козьмино и Десантная).

Как показали результаты наших исследований у моллюсков, из загрязненных акваторий, в частности, таких как бух. Десантная, м. Токаревского, м. Чумака, района «ИБМ» и прол. Старка, характер изменений биохимических показателей свидетельствовал о развитии деструктивных прооксидантных процессов. В данном случае накопление продуктов ПОЛ отражает возникший в организме существенный дисбаланс между биохимическими процессами генерации свободных радикалов (в частности оксирадикалов) и основной антиоксидантной системой, выполняющей защитную функцию.

На основе предлагаемого нами индекса интегральной антирадикальной активности (ИАА) выявлена зависимость уровня ИАА от содержания глутатиона в тканях мидий Грея, обитающих в разных биотопах залива - с увеличением

концентрации глутатиона уровень ИАА снижался. В результате анализа выделились две группы акваторий (рис. 9).

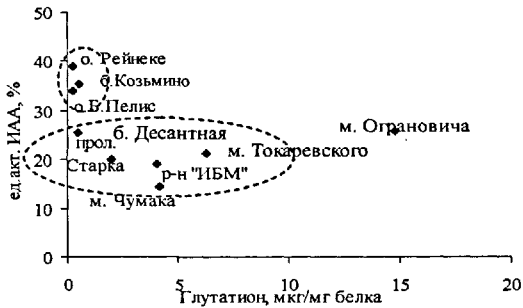


Рис. 9. Зависимость концентрации глутатиона от уровня ИАА в тканях *S. grayanus* из разных акваторий зал. Петра Великого ($n=5$, $P<0.05$)

В первой группе – моллюски в тканях, которых отмечено низкое содержание глутатиона и высокий уровень ИАА. К ней отнесены мидии, обитающие в акватории б. Козьмино и вблизи о-вов Рейнеке и Б. Пелиса. Вторая группа моллюсков характеризуется повышенным содержанием глутатиона и сниженным уровнем ИАА. Учитывая, что увеличение содержания глутатиона является индикатором присутствия в среде ТМ и органических ксенобиотиков, то полученная зависимость уровня ИАА от концентрации глутатиона в тканях моллюсков может достоверно отражать характер загрязнения районов обитания гидробионтов.

Как и в случае с глутатионом, в клетках жабр моллюсков из различных загрязненных районов обнаружена отрицательная корреляция между уровнем ИАА и содержанием продуктов ПОЛ (дисенных конъюгатов и липофусцина) (рис.10).



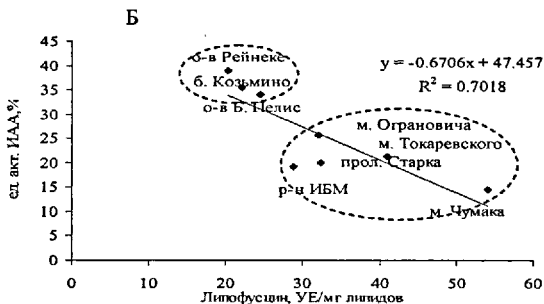


Рис. 10. Зависимость концентрации продуктов ПОЛ (А – диеновые конъюгаты (ДК); Б- липофусцин) от уровня ИАА в тканях *C. grayanus* из разных акваторий зал. Петра Великого ($n=5$, $P<0.05$)

Увеличенное содержание продуктов ПОЛ (индикаторы развития окислительного стресса) и низкий уровень ИАА в исследованных тканях указывают на то, что моллюски обитают в неблагоприятных условиях среды.

Методом кластеризации на основе всех биохимических показателей в тканях исследованных *C. grayanus* (концентрация глутатиона, уровень ИАА, содержание продуктов ПОЛ (диеновые конъюгаты, МДА, липофусцин), было выделено 3 группы районов (рис. 11).

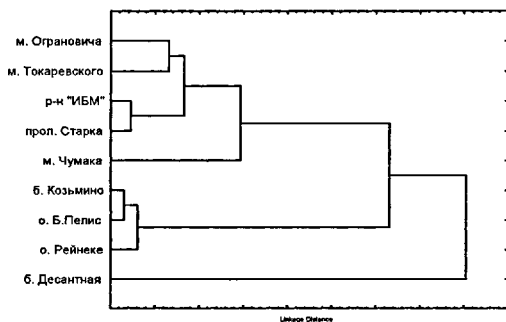


Рис. 11. Дендрограмма сходства биохимических маркеров по районам зал. Петра Великого. По оси абсцисс – дистанция присоединения (или межвыборочная дисперсия), по оси ординат – район исследований

Первая группа - по всем биохимическим показателям в исследованных тканях моллюсков - относительно чистые и благоприятные для обитания акватории. Вторая группа - акватории с преобладающим органическим загрязнением; и третья - значительно отличающаяся от всех остальных районов – б. Десантная, характеризующаяся высоким загрязнением неорганического происхождения.

Снижение способности антиоксидантной системы инактивировать высокореакционные оксидрадикалы, наблюдаемые нами у экспериментальных моллюсков из ряда загрязненных акваторий зал. Петра Великого, необходимо рассматривать как причину формирования окислительного стресса и накопления продуктов окислительной деструкции липидов в тканях моллюсков. Результаты данной работы показывают, что выбранные нами биомаркеры окислительного стресса в полной мере отражают уровень загрязнения морских акваторий. А индекс интегральной антирадикальной активности в тканях моллюсков можно отнести к универсальному индикатору общего состояния организма. Но, если биохимические показатели ПОЛ являются индикаторами патологических, часто необратимых, процессов, то реакция компонентов антиоксидантной системы, отражающая начальные этапы воздействия поллютантов на организм, может быть использована в прогностическом мониторинге.

ВЫВОДЫ

1. Предложен и апробирован в экспериментальных и полевых условиях новый метод количественного определения защитного антиоксидантного потенциала биологической системы (на примере морских двустворчатых моллюсков).
2. Выявлены видовые и тканевые особенности в содержании отдельных антиоксидантов и уровне интегральной антирадикальной активности у ряда дальневосточных видов морских двустворчатых моллюсков. Наиболее высокий уровень активности антиоксидантной системы и отдельных ее компонентов отмечен для эврибионтного моллюска *M. kurilensis* и зарывающегося в грунт *G. yessoensis*.
3. Установлено, что в основе механизмов повреждающего действия аноксии и аккумуляции тяжелых металлов (на примере Cd и Cu) в тканях *M. kurilensis* и *A. broughtonii* лежит окислительный стресс, который сопровождается образованием продуктов окислительной деструкции липидов и резким снижением уровня интегральной антирадикальной активности.
4. В экспериментах по пересадке животных из чистых районов в загрязненную акваторию показана высокая чувствительность антиоксидантной системы моллюсков к комплексу загрязняющих веществ, присутствующих в воде и донных отложениях. Отмечена динамика изменений биохимических показателей

окислительного стресса и тканевые особенности в реакции отдельных компонентов антиоксидантной системы на загрязнение.

5. Выявлена взаимосвязь между уровнем интегральной антирадикальной активности и количеством продуктов перекисного окисления, а также содержанием отдельных антиоксидантов (глутатиона) в тканях двустворчатых моллюсков, собранных из мест с различной степенью антропогенной нагрузки.

6. Показана перспективность применения предлагаемого показателя интегральной антирадикальной активности (индекса ИАА) в качестве важнейшего индикатора степени развития окислительного стресса у гидробионтов и его использования в программах мониторинга морской среды наряду с изменениями уровня отдельных компонентов антиоксидантной системы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых журналах

1. Довженко Н.В., Куриленко А.В., Бельчева Н.Н., Челомин В.П. Окислительный стресс, индуцируемый кадмием, в тканях двустворчатого моллюска *Modiolus modiolus* // Биология моря, Т. 31, № 5. 2005, - С. 358-362.
2. Chelomin V.P., Kurilenko A.V., Dovzhenko N.V., Belcheva N.N. Biochemical markers of oxidative stress in the assessment of cadmium effects in mussel: experimental studies // Marine Environ. Res. V. 58. 2004. - P. 411.

Статьи, опубликованные в зарубежных журналах

3. Dovzhenko N.V. The role of antioxidant system in surviving of *Anadara broughtonii* during anoxia // Интернет журнал Electronic Journal "International Research Publication", Bulgaria. Standart Serial Number ISBN-954-9368-16-5.
4. Довженко Н.В. Роль антиоксидантной системы в выживании моллюска *Anadara broughtonii* в условиях аноксии // «Scientific articles. Ecology 2006», 2006. - P. 11-18

Работы, опубликованные в материалах региональных, всероссийских, международных конференциях

5. Довженко Н.В., Кавун В.Я., Бельчева Н.Н., Челомин В.П. Биохимические показатели окислительного стресса как индикаторы антропогенного загрязнения водных экосистем // Океанологические исследования. Сборник статей по материалам конференции молодых ученых Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН. Владивосток. Дальнаука. 2001. – С. 291-296.
6. Довженко Н.В., Бельчева Н.Н., Челомин В.П. Использование интегрального показателя антирадикальной активности защитной системы гидробионтов в биомониторинге водной среды (на примере двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus*) // Мат. регион. школы-семинара молод. ученых, аспирант. и студ. «Анализ современного состояния и перспективы развития регионов Дальнего Востока», Биробиджан, 2003. - С. 20-22.
7. Довженко Н.В., Бельчева Н.Н., Челомин В.П. Биохимические показатели окислительного стресса как индикаторы антропогенного загрязнения водных экосистем // Тез. докл. всеросс. конф. «Современные проблемы водной токсикологии». Борок. 2002. - С. 37-38.

8. Довженко Н.В., Бельчева Н.Н., Челомин В.П. Влияние загрязнения на антиоксидантную систему и перекисное окисление липидов *Crenomytilus grayanus*// Сборник научных трудов, Ярославский Государственный Университет им. П.Г. Демидова, 2003. - С. 15-19.
9. Довженко Н.В., Куриленко А.В., Челомин В.П. Исследование реакции антиоксидантной системы двусторчатого моллюска *Modiolus modiolus* на аноксию и аккумуляцию металлов // Сборник статей по материалам Международной конференции «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». Петрозаводск, 2005. - С. 54-61
10. Довженко Н.В. Сравнительная характеристика низкомолекулярного компонента антиоксидантной системы (глутатиона) двусторчатых моллюсков залива Петра Великого (Японское море) // Мат. Межд. науч. конф. «Проблемы устойчивого функционирования водных и наземных экосистем». Ростов-на-Дону, 2006. – С. 108-110.
11. Довженко Н.В., Бельчева Н.Н., Челомин В.П. Использование биохимических показателей окислительного стресса в оценке антропогенного воздействия на морские экосистемы // Тезисы докладов Международной конференции «Современные проблемы океанологии шельфовых морей России». Ростов-на-Дону, 2002. - С. 59-61.
12. Chelomin V.P., Dovzhenko N.V., Stoletnaya A.V., Belcheva N.N. Biomonitoring the health of coastal marine ecosystems: the role of biochemical markers of oxidative stress// In: Abstracts of Ocean 2003. Marine Technology and Ocean Science Conference. 2003. - P. 83.
13. Chelomin V.P., Dovzhenko N.V., Kurilenko A.V., Belcheva N.N. Biochemical markers of oxidative stress in the assessment of cadmium effects in mussel: experimental studies // PRIMO 12, Florida, 2003. - P. 72.
14. Довженко Н.В., Столетняя А.В., Бельчева Н.Н., Челомин В.П. Мониторинг загрязнения прибрежных экосистем на основе биохимических показателей окислительного стресса // Научные труды международного биотехнологического центра МГУ. Тезисы докладов 2-ой международной научной конференции «Биотехнология – охране окружающей среды». Изд. «Спорт и культура». Москва, 2004. - С.105.
15. Довженко Н.В., Бельчева Н.Н., Столетняя А.В., Кавун В.Я., Челомин В.П. Реакция антиоксидантной системы в процессе адаптации двусторчатых моллюсков (на примере *Crenomytilus grayanus*) к антропогенному загрязнению // Тезисы докладов международной научной конференции «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». Петрозаводск, 2004. - С. 41.
16. Dovzhenko N.V., Belcheva N.N., Chelomin V.P. Biochemical markers of oxidative stress as indicators marine pollution // Proceedings abstract volume. Sixth IOC/ WESTPAC International Scientific Symposium Challenges for Marine Science in the Western Pacific (19-23 April,) Hangzhou, China, 2004. - P. 71-72
17. Stoletnyaya A.V., Dovzhenko N.V., Belcheva N.N., Chelomin V.P. Comparative study of antioxidant defense enzymes of different species of marine bivalve mollusks (Amursky Bay) // In: Abstracts of the conference «Mollusks of the Northeastern Asia and Northern Pacific: Biodiversity, Ecology, Biogeography and Faunal History. Vladivostok, 2004. - P. 153.
18. Dovzhenko N.V., Belcheva N.N., Chelomin V.P., Stoletnyaya A.V., Slobodcnjuk A.F., Ponomarev O.V Alteration of antioxidant components and oxidative stress markers in the tissues of marine scallop *Mizuhopecten yessoensis* in aging // In: Abstracts of the international conference «Current problems of aquatic toxicology», Borok, Russia, 2005. - P. 31

ДОВЖЕНКО Надежда Владимировна

**РЕАКЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ДВУСТВОРЧАТЫХ
МОЛЛЮСКОВ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ПОВРЕЖДАЮЩИХ ФАКТОРОВ
СРЕДЫ**

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Зак. № 204п. Формат 60x84 1/16. Усл. п. л. 1,0. Тираж 100 экз.
Подписано в печать 01.11.2006 г.
Печать офсетная с оригинала заказчика.

Отпечатано в типографии ОАО "ДАЛЬПРИБОР"
690105, г. Владивосток, ул. Бородинская, 46/50,
тел. 32-70-49

