

УДК 594.3(477.74)(262.5)

О. Н. Ершова, к.б.н., старший научный сотрудник
В. А. Топтиков, к.б.н., старший научный сотрудник
Я. А. Терлецкая, младший научный сотрудник
Т. И. Лавренюк, младший научный сотрудник
С. Г. Каракис, старший научный сотрудник
О. А. Ковтун, к.б.н., доцент

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская 2, Одесса 65082, Украина, e-mail: ershova_ok@mail.ru

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ТКАНЕЙ *RAPANA VENOSA* (VALENCIENNES, 1846) ИЗ АКВАТОРИЙ СЕВЕРО-ЗАПАДНОЙ ЧАСТИ ЧЁРНОГО МОРЯ С РАЗЛИЧНЫМИ ЭКОЛОГИЧЕСКИМИ УСЛОВИЯМИ

Исследовалось состояние антиоксидантной системы в лейблейновской железе особей *Rapana venosa*, собранных в двух акваториях северо-западной части Чёрного моря, отличающихся гидролого-гидрохимическими и трофическими условиями обитания (Одесский залив и район мыса Тарханкут). Определяли активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, содержание восстановленного глутатиона и малонового диальдегида. Установлено, что активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, а также содержание восстановленного глутатиона и малонового диальдегида у рапан из Тарханкутской акватории были ниже аналогичных показателей моллюска из Одесского залива в 1,5; 1,4; 1,9 и 1,2 раза соответственно. Активности каталазы и глутатионредуктазы у особей из сравниваемых акваторий были практически на одном уровне. Антиоксидантная система рапан обладает значительной гибкостью, что обеспечивает адаптацию вида к разным условиям окружающей среды

Ключевые слова: Чёрное море, *Rapana venosa*, трофические условия, адаптация, антиоксидантная система.

Занесенный в середине прошлого века [5] с Дальнего Востока хищный брюхоногий моллюск *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) оказался устойчивым к широкому диапазону изменений солёности, температуры и концентрации кислорода [22], а также очень пластичен в отношении потребляемой пищи [24]. Эти особенности позволили ему успешно акклиматизироваться в Чёрном море. Довольно скоро новый вселенец нанес серьёзный урон популяциям устриц и мидий [3, 9]. Из-за подрыва собственной кормовой базы численность рапаны в некоторых районах Чёрного моря существенно сократилась, и имеются данные о том, что этот брюхоногий моллюск пребывает в угнетённом состоянии, о чем свидетельствует измельчание особей, снижение темпов роста и ухудшение его физиологического состояния [1, 9, 8, 14, 13]. Такая ситуация, сложилась с по-

пуляцией рапаны возле Крымского полуострова, в районе мыса Тарханкут [8]. Но, несмотря на то, что рапана, обитающая в этой акватории, постоянно находится в состоянии недоедания, ей удается адаптироваться даже к этим условиям.

Учитывая огромное влияние моллюска на экосистему Чёрного моря и его способность легко приспосабливаться к самым различным условиям, исследование адаптационных возможностей рапаны является одной из фундаментальных проблем, которая на данный момент мало исследована. Основным звеном адаптационных процессов считается антиоксидантная система (АОС), которая в последнее время все чаще используется как биомаркер состояния внешней и внутренней среды организма [7, 6, 12, 25].

В связи с этим, целью работы было определение активности основных ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы), а также содержания малонового диальдегида и глутатиона восстановленного у особей брюхоногого моллюска *Rapana venosa*, собранных в двух разных акваториях Чёрного моря, отличающихся гидролого-гидрохимическими, экологическим и трофическими условиями обитания (Одесский залив и район мыса Тарханкут).

Материалы и методы исследования

Воды Одесского залива отличаются значительными сезонными и внесезонными колебаниями солености (от 2 до 17 ‰), частыми заморными явлениями, высокой концентрацией биогенных и различных загрязняющих веществ [4, 18]. При этом здесь для рапаны существует удовлетворительная кормовая база. Акватория в районе мыса Тарханкут характеризуется более стабильными и благоприятными для существования рапаны гидрологическими и гидрохимическими условиями. Однако, здесь значительно нарушена трофическая емкость для поддержания нормальной жизнедеятельности взрослых особей рапаны [8].

Моллюсков собирали в летний период 2013 года на каменистых субстратах с глубины 5–15 метров на расстоянии 50 м от берега. Площадь сбора рапаны составляла около 100 м² в каждой акватории.

Рапаны из исследуемых акваторий отличались по морфометрическим параметрам, в частности по высоте раковины. Эта величина у моллюсков в районе мыса Тарханкут колебалась в пределах 45–50 мм, у рапан из Одесского залива 70–80 мм. Возраст исследуемых моллюсков из обеих акваторий составлял 4–5 лет.

Определяли активность антиоксидантных ферментов—супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), а также содержание глутатиона восстановленного (GSH) и малонового диальдегида (МДА) у особей брюхоногого моллюска обоих полов, взятых в равном соотношении.

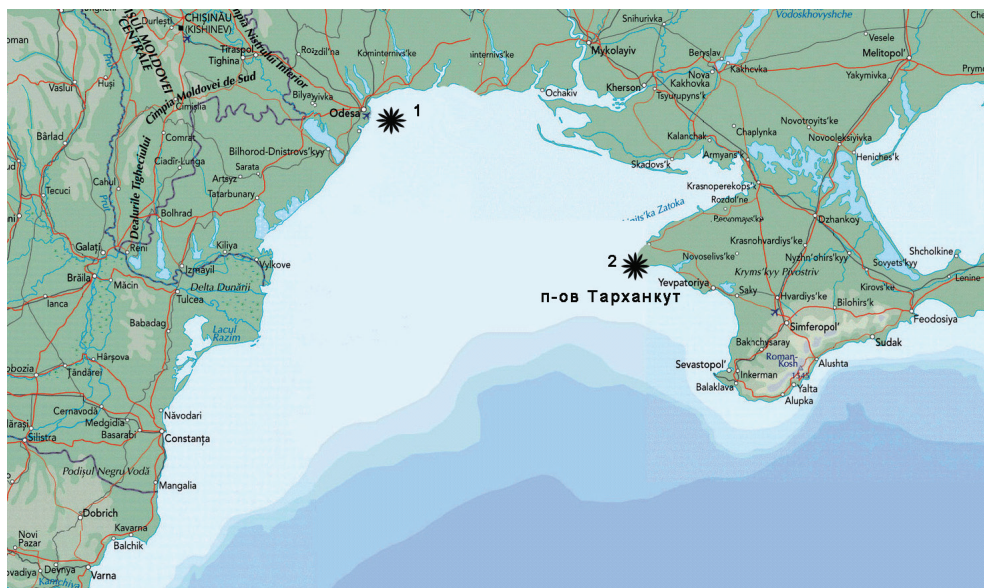


Рис. 1. Карта-схема северо-западной части Чёрного моря с районами отбора рапан.
1 – Одесский залив; 2 – мыс Тарханкут.

Для биохимического анализа использовали ткани пищеводной (лейблейновской) железы. Образцы тканей хранили в морозильной камере ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$). Гомогенаты готовили согласно [11]. Размеры выборок для определения биохимических параметров колебались от 10 до 25 животных.

Активность СОД измеряли по степени ингибирования аутоокисления адреналина в щелочной среде путем спектрофотометрической регистрации оптической плотности при 347 нм [15]. Каталазную активность гомогенатов оценивали спектрофотометрически по снижению светопоглощения перекиси водорода при 240 нм в реакционной среде в течение 5 мин [23]. Активность ГП определяли при наличии в среде H_2O_2 в качестве субстрата. Интенсивность образования окисленного глутатиона оценивали по динамике изменения оптической плотности при 430 нм [10]. ГР-активность измеряли по скорости окисления НАДФН в реакционной среде. Реакцию инициировали окисленным глутатионом. Убыль НАДФН регистрировали по падению оптической плотности при 340 нм через 5 мин инкубации. Расчет активности производили согласно [11].

Содержание МДА в экстрактах пищеводной железы определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты [16], содержание GSH – по реакции с реактивом Элмана и образованию окрашенного продукта – 2-нитро-6-меркаптобензойной кислоты, который имеет максимум поглощения при 412 нм [2].

Полученные данные рассчитывали на грамм сырой массы ткани. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью приложения *Microsoft*

Office Excel. Достоверность различий исследуемых параметров определяли, используя t-тест Стьюдента для несопряженных совокупностей.

Результаты исследования и их обсуждение

Активация АОС рассматривается как универсальный отклик биоты на всевозможные изменения окружающей среды [6, 7, 12, 20,]. Инициация АОС обычно проявляется в стимуляции активности антиоксидантных ферментов (СОД, каталазы, ГП, ГР), блокирующих распространение свободных радикалов при стрессе [25]. Накапливающиеся в процессе ПОЛ свободные радикалы дисмутируются ферментом СОД в менее токсичную перекись водорода, и от активности этого фермента зависит дальнейшее развитие процесса ПОЛ в организме [19]. Проведенные исследования показали, что АОС рапаны, в зависимости от местообитания, обладает определенными особенностями.

Установлено, что активность СОД в лейблейновской железе у рапан, собранных в районе мыса Тарханкут, была в 1,5 раза ниже, чем у моллюсков из акватории Одесского залива (рис. 2а).

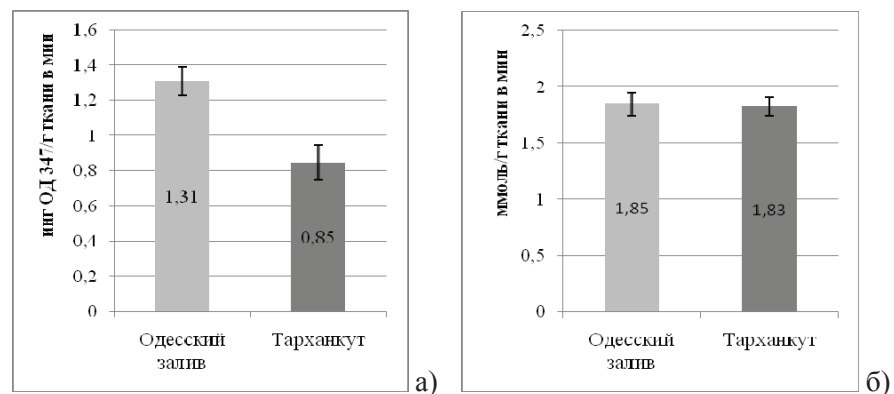


Рис. 2. Активность супероксиддисмутазы (а) и каталазы (б) в лейблейновской железе рапан из разных акваторий северо-западной части Чёрного моря

Активность каталазы была на одном уровне, как у рапан, собранных в Одесском заливе, так и у моллюсков, выловленных вблизи мыса Тарханкут, и составляла $1,85 \pm 0,1$ и $1,83 \pm 0,08$ ммоль/г ткани в минуту соответственно (рис. 2б).

Активность ГР у животных из исследуемых акваторий так же достоверно не различалась и составляла $0,77 \pm 0,021$ и $0,83 \pm 0,024$ мкмоль/г ткани в минуту, соответственно (рис. 3а). Это подтверждает тезис о том, что данный фермент всегда находится в активном состоянии, независимо от изменяющихся условий как внутри самого организма, так и при изменениях условий окружающей среды [17].

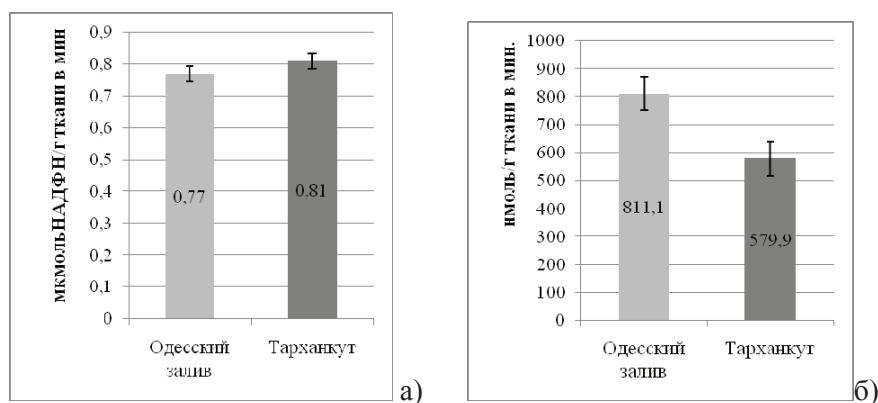


Рис. 3. Активність глутатионредуктази і глутатионпероксидази в лейблейнової жезеле рапан із різних акваторій северо-западної частини Чорного моря

Фермент ГП наряду с каталазой преобразует перекись водорода до нетоксичних соединений – воды и молекулярного кислорода. Активність цього антиоксидантного фермента у рапан, зібраних в районі мису Тарханкут, була в 1,4 рази нижче по порівнянню з активністю ГП у рапан, зібраних в районі Одеського залив (рис. 3б).

Как отмечалось выше, активності СОД і ГП у рапани, обитавоючої в Одеському залив, були достовірно вище по порівнянню з моллюсками із Тарханкутської акваторії. Однак, відношення активності ГП к активності СОД було статистически однаковим у рапан із двох порівнюваних акваторій (рис. 4).

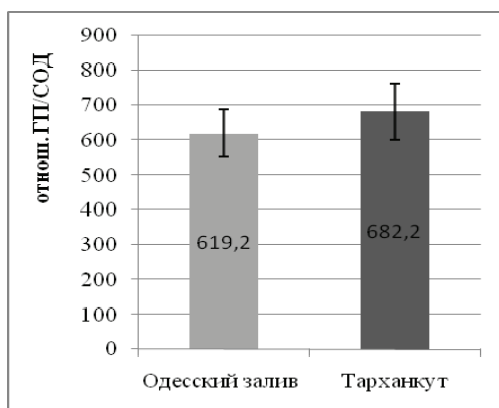


Рис. 4. Відношення ГП к СОД в лейблейнової жезеле рапан із різних акваторій северо-западної частини Чорного моря

Содержание GSH у рапан, зібраних із акваторії розположеної вблизи мису Тарханкут, було в 1,9 рази менше по порівнянню з содержанием цього антиоксиданта у рапан із акваторії Одеського залив (рис. 5а).

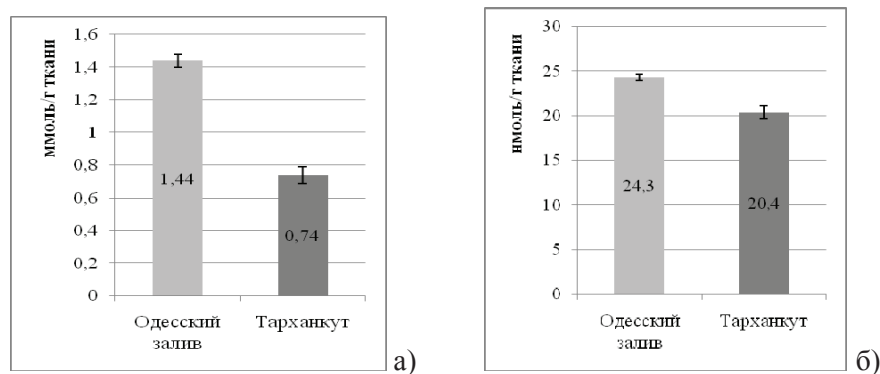


Рис. 5. Содержание GSH (а) и МДА (б) в лейбейновской железе рапан из разных акваторий северо-западной части Чёрного моря

Известно, что уровень глутатиона в печени уменьшается при голодании и что для синтеза восстановленного глутатиона необходим цистеин [21]. Можно предположить, что снижение содержания данного антиоксиданта у рапан из Тарханкутской акватории связано с довольно скудными трофическими условиями обитания. Содержание МДА является интегральным показателем баланса про- и антиоксидантных процессов, развивающихся в организме. Проведенные исследования показали, что у рапан, выловленных вблизи мыса Тарханкут, содержание этого продукта было в 1,2 раза меньше, чем у моллюсков собранных в районе Одесского залива (рис. 5б).

Сравнивая показатели исследуемых компонентов АОС особей рапаны из разных акваторий можно прийти к следующему заключению. В зависимости от определенного комплекса условий среды обитания АОС рапаны может функционировать в разных режимах. Одни компоненты антиоксидантной защиты отличаются лабильностью. Так, активности СОД и ГП, а также содержание восстановленного глутатиона у особей моллюска из Одесского залива были выше, чем у рапаны из акватории мыса Тарханкут. Другие же компоненты АОС оставались стабильными, что было показано для каталазы и ГР, активности которых не различались у особей из разных мест обитания. СОД, обезвреживая супероксидные радикалы, продуцирует при этом менее активное производное кислорода – пероксид водорода. Последний элиминируется каталазой и ГП. Важно то, что несмотря на имеющиеся различия в активности СОД и ГП у особей из разных акваторий, соотношение их активности оставалось постоянным и не зависящим от условий окружающей среды (рис. 4). Возможно, что данное соотношение является у рапаны одним из важных для функционирования АОС. Следует также отметить то, что снижение активности ряда ферментов АОС (СОД и ГП) и уменьшение содержания GSH у рапаны из Тарханкутской акватории не приводит к потере эффективности антиоксидантной защиты. В пользу

этого свидетельствуют данные о более низком содержании МДА у моллюсков данной акватории. Вероятно, что в условиях дефицита пищевых ресурсов у рапаны формируется экономный режим функционирования АОС. Таким образом, можно заключить, что рапана обладает гибкой антиоксидантной системой, способной обеспечить выживание вида в разных условиях обитания.

Выводы

1. У рапаны, обитающей вблизи мыса Тарханкут, где отмечается скудная кормовая база, содержание GSH, активности СОД и ГП ниже по сравнению с особями моллюска из акватории Одесского залива в 1,9; 1,5 и 1,4 раза соответственно.

2. Активность каталазы и ГР у рапан, выловленных вблизи мыса Тарханкут, была на уровне активности данных ферментов у моллюсков из Одесского залива.

3. Содержание МДА было меньше у рапан, обитающих вблизи мыса Тарханкут, в 1,2 раза по сравнению с аналогичным показателем для рапан, обитающих в акватории Одесского залива.

4. АОС рапан обладает значительной гибкостью, что обеспечивает адаптацию вида к разным условиям окружающей среды.

Список использованной литературы

1. Бондарев И. П. Морфогенез раковины и внутривидовая дифференциация рапаны *Rapana venosa* (Valenciennes, 1864) / И. П. Бондарев // *Ruthenica*. – 2010. – V. 20, № 2. – С. 69–90.
2. Горячковский А. М. Клиническая биохимия. 2-е изд. / А. М. Горячковский. – О.: Астропринт, 1998. – 608 с.
3. Говорин И. А. Оценка влияния хищного брюхоногого моллюска *Rapana venosa* (Valenciennes, 1864) на фильтрационный потенциал *Mytilus galloprovincialis* Lam. / И. А. Говорин, А. П. Куракин // *Экол. безпека прибереж. та шельф. зон та комплекс використання ресурсів шельфу: зб. Наук. Пр.* – 2011. – 25, Т. 1. – С. 435–442.
4. Доценко С. А. Мінливість основних гідрологічних характеристик Одеського регіону північно-західної частини Чорного моря / С. А. Доценко. // *Аатореф. дисертації, канд. географ. наук.* – Одеса, 2003. – 20 с.
5. Драпкин Е. И. Новый моллюск в Чёрном море / Е. И. Драпкин // *Природа*. – 1953. – № 9. – С. 92–95.
6. Ирейкина С. А. Активность антиоксидантной системы и биотрансформации поллютантов у полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из Амурского и Уссурийского заливов (Японское море) / С. А. Ирейкина, О. Н. Лукьянова // *Вопросы рыболовства*. – 2012. – Т. 13, № 1-49. – С. 145–154.
7. Карапетьян О. Ш. Молекулярные биомаркеры антропогенного загрязнения в печени бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* из Таганрогского залива / О. Ш. Карапетьян, Н. И. Цема, С. И. Дудкин // *Вопросы рыболовства*. – 2011. – Т. 12, № 4–48. – С. 747–759.
8. Ковтун О. А. Сравнительная морфологическая характеристика *Rapana venosa* (Gastropoda: Muricidae, Rapantinae) из разных акваторий северной части Черного моря / О. А. Ковтун, В. А. Топтиков, В. Н. Тоцкий // *Вестник ОНУ, Серия Биология*. – 2014. – Т. 19. – Вып. 1(34) – С. 68–80
9. Косьян А. Р. Экологическое состояние популяций *Rapana venosa* в северо-западной части Черного моря / А. Р. Косьян // *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. – 2010. – № 3 (44). – С. 122–127.
10. Ланкин В. З. Возрастные изменения глутатион-S-трансферазной и глутатионпероксидазной активности цитозоля печени крыс / В. З. Ланкин, А. К. Тихадзе, А. Л. Ковалевская и др. // *ДАН СССР*. – 1981. – Т. 261, № 6. – С. 1467–1470.
11. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)* // Под ред. М. И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. – 271 с.

12. Руднева И. И. Применение биомаркеров рыб для экотоксикологической диагностики водной среды / И. И. Руднева // Рыбное хозяйство Украины. – 2006. – № 1. – С. 20–23.
13. Саенко Е. М. Динамика биохимических показателей тканей рапаны (*Rapana thomasiana*) в различные периоды годового цикла / Е. М. Саенко // Вопросы рыболовства. – 2008. – Том 9, № 4 (36). – С. 788–796.
14. Саенко Е. М. Современное состояние популяции рапаны в Азово-Черноморском бассейне / Е. М. Саенко, В. Н. Шевченко // Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна: Сб. научных трудов (2007-2008 гг.) АЗНИИРХ. Ростов на Дону: Диапазон, 2008. – С. 188–192.
15. Сирота Т. В. Новый подход в исследовании процесса автоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы / Т. В. Сирота // Вопросы мед. химии. – 1999. – № 3. – С. 263–273.
16. Стальная Д. И. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / Д. И. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Сб. Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
17. Тарасевич И. С. Активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и уровня глутатиона восстановленного в печени, мозге и эритроцитах крыс в возрастном аспекте / И. С. Тарасевич, О. Н. Ринейская, С. В. Глинник, К. Г. Прокопчик // Ключови въпроси в съвременната наука: материали за 7-а международна научна практическа конференция. – София, 17-25 април, – 2011. – Т. 33. – Биология. – С. 105–106.
18. Тучковенко Ю. С. Влияние гидрологических условий на изменчивость гидрохимических и гидробиологических характеристик вод Одесского региона северо-западной части Черного моря / Ю. С. Тучковенко, С. А. Доценко, С. Е. Дятлов, и др. // Морський екологічний журнал. – 2004. – Т. III, № 4. – С. 75–86.
19. Чеснокова Н. П. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах / Н. П. Чеснокова, Е. В. Понукалина, М. Н. Бизенкова // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 7. – С. 29–36.
20. Шахматова А. А. Отзыв гидробионтов на стрессовые факторы морских экосистем / А. А. Шахматова // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – Симферополь: ТНУ. – 2012. – Вып. 7. – С. 98–113.
21. Akerboom T. Glutathione: metabolism and physiological functions / T. Akerboom, H. Sies. Ed. J. Vina. – Boston: GRG Press, 1990. – P.46–52.
22. Mann R. Salinity tolerance of larval *Rapana venosa*: implications for dispersal and establishment of an invading predatory gastropod on the North American Atlantic coast / R. Mann, J. M. Harding // Biol. Bull. – 2003. – Vol. 204. – P. 96–103.
23. Murlund S. Normal Cu, Zn superoxidedismutase, Mn-SOD, catalase and glutathione peroxidase in werner's syndrome / S. Murlund, J. Nordenson, O. Back // J. Gerontol. – 1981. – V. 36, № 4. – P. 405–409.
24. Savini D. Consumption rates and prey preference of the invasive gastropod *Rapana venosa* in the Northern Adriatic Sea / D. Savini, A. Occhipinti-Ambrogi // Helgol. Mar. Res. – 2006. – Vol. 60 – P. 153–159.
25. Winstone G. W. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms / G. W. Winstone., R. T. Di-Giulio // Aquat. Toxicol. – 1991. – V. 19, № 2. – P. 137-161.

Статья поступила в редакцию 14.10.2014

**О. М. Єршова, В. А. Топтіков, Я. О. Терлецька, Т. І. Лавренюк,
С. Г. Каракис, О. О. Ковтун**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
кафедра генетики і молекулярної біології,
вул. Дворянська 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: ershova_ok @ mail.ru

АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ТКАНИН *RAPANA VENOSA* (VALENCIENNES, 1846) З АКВАТОРІЙ ПІВНІЧНО-ЗАХІДНОЇ ЧАСТИНИ ЧОРНОГО МОРЯ З РІЗНИМИ ЕКОЛОГІЧНИМИ УМОВАМИ

Резюме

Досліджувався стан антиоксидантної системи в лейблейновській залозі особин *Rapana venosa*, зібраних у двох акваторіях північно-західної частини Чор-

ного моря, що відрізняються гідролого-гідрохімічними і трофічними умовами мешкання (Одеська затока і район мису Тарханкут). Визначали активність супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, вміст відновленого глутатіону та малонового діальдегіду. Встановлено, що активність супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази, а також вміст відновленого глутатіону та малонового діальдегіду у рапан з Тарханкутської акваторії були нижче аналогічних показників моллюска з Одеської затоки в 1,5; 1,4; 1,9 і 1,2 рази відповідно. Активності каталази і глутатіонредуктази у моллюсків з порівнюваних акваторій були практично на одному рівні. Рапана має гнучку АОС, що забезпечує адаптацію виду до різних змін навколишнього середовища

Ключові слова: Чорне море, *Rapana venosa*, трофічні умови, адаптація, антиоксидантна система.

**O. M. Yershova, V. A. Toptikov, Ya. O. Terletska, T. I. Lavrenyuk,
S. G. Karakis, O. O. Kovtun**

Odesa Mechnykov National University,
Department of Genetics and Molecular Biology,
2, Dvoryanska Str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: ershova_ok@mail.ru

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF TISSUE *RAPANA VENOSA* (VALENCIENNES, 1846) FROM THE REGIONS OF THE NORTHWESTERN BLACK SEA DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONDITIONS

Summary

It was investigated the antioxidant system in leyleynovsky gland specimens *Rapana venosa*, assembled in two waters of the north-western part of the Black Sea, there were different by hydrological and hydrochemical and trophic conditions of habitation (Odesa Bay and area of Cape Tarkhankut). It was measured the activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione content and malondialdehyde. The activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase, as well as the content of reduced glutathione and malondialdehyde in rapan of the Tarkhankut waters were lower than those of the mollusc from the Odesa Bay 1.5; 1.4; 1.9 and 1.2 times, respectively. The activity of catalase and glutathione in specimens from the compared waters were at the same level. AOS of rapan has considerable flexibility, what allows which adaptation to the different kinds of environmental conditions

Keywords: the Black Sea, *Rapana venosa*, trophic conditions, adaptation, antioxidant system.