

УДК 594.3(477.74)(262.5)

Ершова О. Н., Тоцкий В. Н., Топтиков В. А.,
Ковтун О. А., Лавренюк Т. И.

**СЕЗОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ *RAPANA VENOSA*
(VALENCIENNES, 1846), ОБИТАЮЩЕЙ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОЙ
ЧАСТИ ЧЁРНОГО МОРЯ**

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

Ключевые слова: Чёрное море, *Rapana venosa*, сезонная активность, антиоксидантная система.

Вселившись в Чёрное море в 40-х годах XX-го столетия, *Rapana venosa* быстро распространилась по всей акватории, сформировав достаточно широкие ареалы на всем Черноморском шельфе [21]. Темпы роста и распространения моллюска в Чёрном море свидетельствуют о пластичности и высоких адаптационных возможностях вида [18].

Сезонные изменения жизнедеятельности рассматриваются в качестве одного из важнейших приспособлений, обеспечивающих устойчивость организмов, гидробионтов в том числе, в постоянно меняющихся условиях существования [16, 20]. Согласно литературным данным моллюскам свойственна годовая цикличность биохимических и физиологических показателей и содержания основных групп органических и минеральных веществ в частности [2, 3, 9], изучена сезонная динамика содержания белка, углеводов и липидов у рапаны [12].

Антиоксидантная система (АОС) различных организмов также демонстрирует сезонную ритмику [1, 8, 17]. Ранее в нашей лаборатории изучалась активность АОС рапаны из акваторий с разной степенью загрязнения [15]. Сезонные же особенности АОС рапаны не изучены. В связи с этим, целью данной работы было изучение показателей антиоксидантной системы рапаны в разные периоды годового цикла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовали половозрелых особей рапаны, обитающих в прибрежной акватории, которая примыкает к территории гидробиологической станции Одесского национального университета имени И. И. Мечникова. Моллюсков собирали на каменистых субстратах с глубины от 5 до 10 метров. Площадь сбора составляла около 100 м² данной акватории. Высота раковин собранных моллюсков колебалась в пределах 70-80 мм, возраст особей – 4-5 лет.

Для биохимического анализа использовали ткань пищеводной (лейблейновской) железы. Образцы тканей хранили в морозильной камере (-18°C). Гомогенаты готовили согласно общепринятой методики [11]. Выборка для определения биохимических параметров составляла от 10 до 15 особей обоих полов, взятых в равных соотношениях.

Сезонную динамику биохимических показателей прослеживали в весенний (май 2013г.), летний (июнь-июль 2013г.), осенний (октябрь-ноябрь 2012г.) и зимний (январь-февраль 2013г.) периоды. Определяли активность глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР) а также содержание глутатиона восстановленного (GSH) и малонового диальдегида (МДА) в гомогенатах лейблейновской железы моллюска.

Активность СОД измеряли по степени ингибирования аутоокисления адреналина в щелочной среде путем спектрофотометрической регистрации оптической плотности при 347 нм [14]. Каталазную активность гомогенатов оценивали спектрофотометрически по снижению светопоглощения перекиси водорода при 240 нм в реакционной среде в течение 5 мин [19]. 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 методики [11].

Содержание МДА в экстрактах пищеводной железы определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты [14], содержание GSH – по реакции с реактивом Элмана и образованию окрашенного продукта – 2-нитро-6-меркаптобензойной кислоты, который имеет максимум поглощения при 412 нм [4].

Полученные данные рассчитывали на грамм сырой массы ткани. Статистическую обработку результатов осуществляли в соответствии с приложением *Microsoft Office Excel*. Достоверность различий исследуемых параметров определяли, используя t-тест Стьюдента для несопряженных совокупностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Годовой цикл *R. venosa* разделяют на четыре периода: весенний - преднерестовый период, летний - репродуктивный период, осенний период - полового покоя и период зимовки. Для каждого периода годового цикла *R. venosa* характерна различная интенсивность и направленность биохимических процессов [12]. Проведенные нами исследования показали наличие сезонных колебаний показателей АОС рапаны.

Наибольшее содержание МДА, одного из конечных продуктов перекисного окисления липидов ($24,3 \pm 0,4$ нмоль г/ткани), у рапаны наблюдалось в летний период (рис. 1).

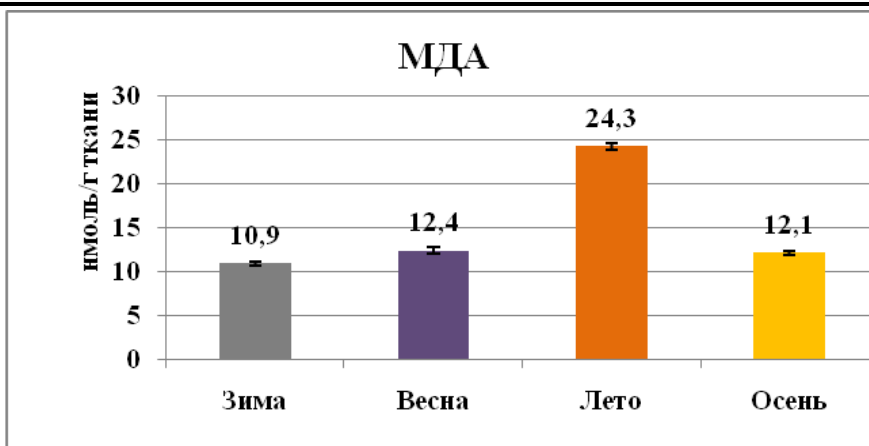


Рис. 1. Содержание МДА у *Rapana venosa*, обитающей в северо-западной части Чёрного моря в разные сезоны года.

Осенью и весной отмечено резкое уменьшение содержания МДА. По сравнению с летним периодом количество диальдегида было в 2 раза ниже ($p < 0,001$). Зимой уровень перекисного окисления липидов продолжал снижаться. Минимальные значения содержания МДА отмечались именно в зимний период и составляли $10,9 \pm 0,21$ нмоль/г ткани.

Иная динамика установлена для супероксиддисмутазной активности (рис. 2). Максимальное значение активности СОД у рапаны наблюдалось в весенний период. В зимний и осенний периоды активность СОД у моллюсков снижалась почти в 2 раза ($p < 0,001$). Минимальные значения данного показателя наблюдались в летний период.

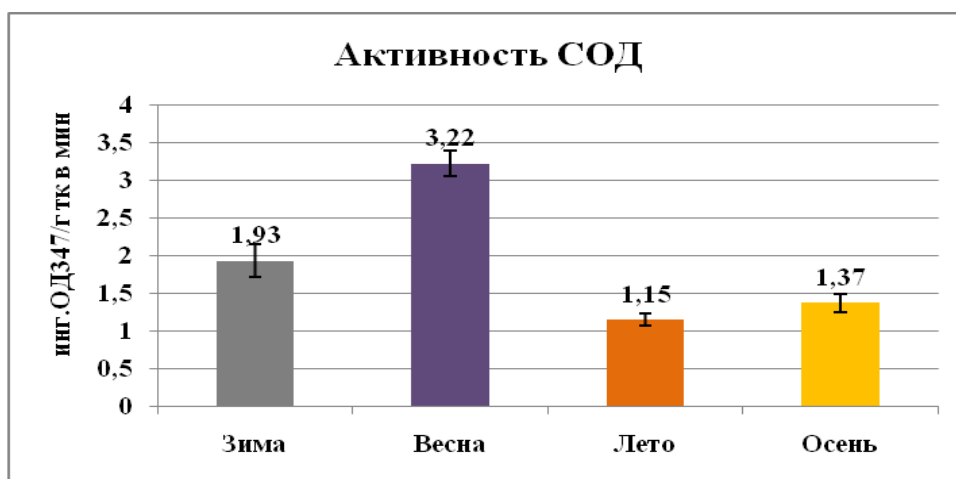


Рис. 2. Активность СОД у *Rapana venosa*, обитающей в северо-западной части Чёрного моря в разные сезоны года.

Максимальная активность каталазы была выявлена у особей рапаны весеннего и летнего выловов ($1,96 \pm 0,095$ и $1,81 \pm 0,098$ ммоль/г ткани в мин соответственно) (рис. 3). В осенний период активность каталазы оставалась на достаточно высоком уровне и составляла $1,72 \pm 0,06$ ммоль/г ткани в мин. Минимальное значение активности каталазы ($1,1 \pm 0,095$ ммоль/г ткани в мин) наблюдалось в зимний период ($p < 0,001$).

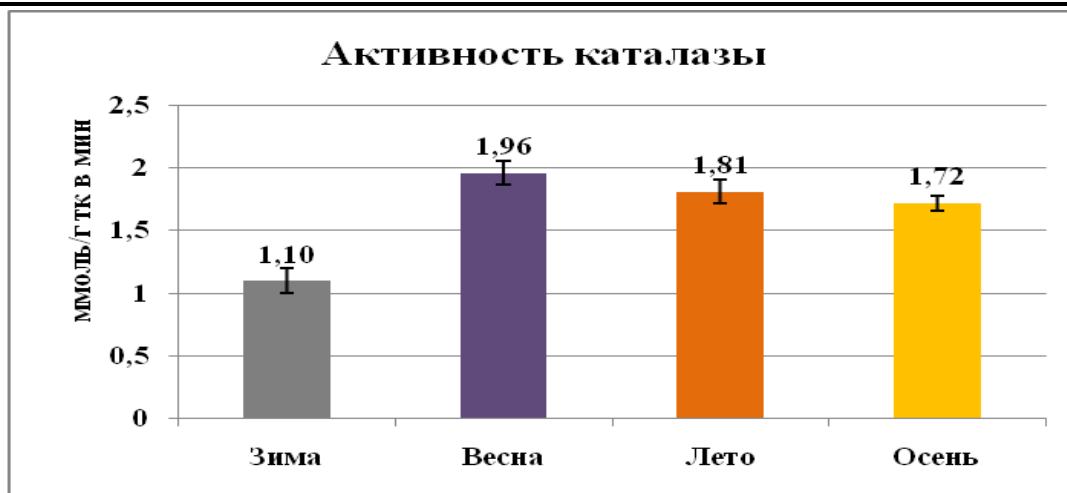


Рис. 3. Активность каталазы у *Rarana venosa*, обитающей в северо-западной части Чёрного моря в разные сезоны года.

Активность ГП в разные сезоны года изменялась следующим образом. Наибольшая активность данного фермента, как и каталазы отмечалась в весенний и летний периоды (рис. 4). Осенью и зимой пероксидазная активность в тканях уменьшалась, но оставалась на достаточно высоком уровне, и составляла $756,3 \pm 27,9$ и $767,8 \pm 40,4$ нмоль/г ткани в мин.

Достоверность различий по этому показателю установлена только при сравнении максимального (весной) с минимальными значениями (осенью и зимой).

Сезонное исследование глутатионредуктазы также показало, что фермент по разному проявляет активность в течении года (рис.5). В осенний период отмечалась наибольшая активность данного фермента ($1,06 \pm 0,02$ мкмоль/г ткани в мин).

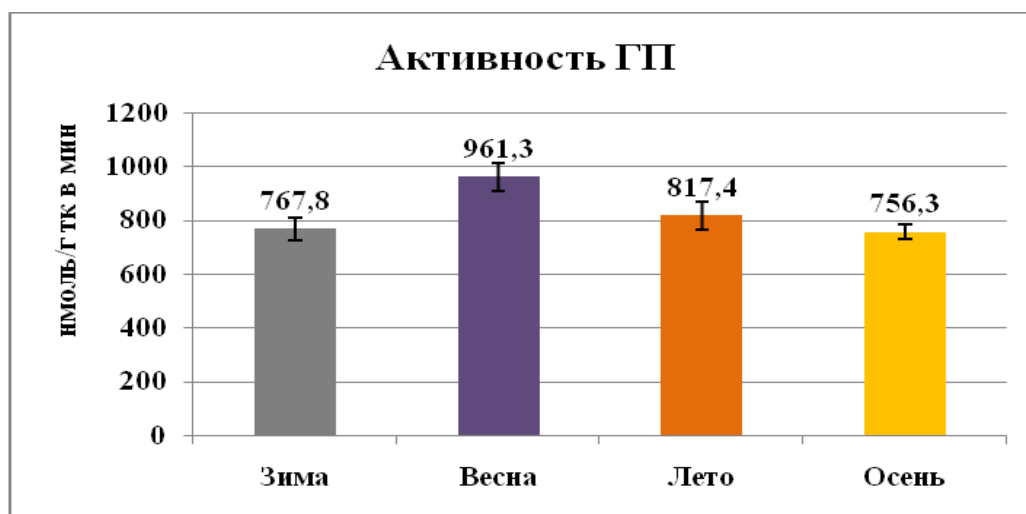


Рис. 4. Активность ГП у *Rarana venosa*, обитающей в северо-западной части Чёрного моря в разные сезоны года.

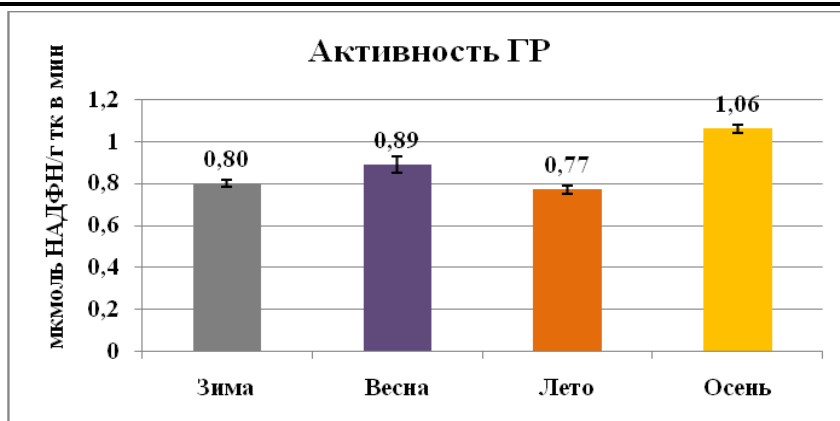


Рис. 5. Активность ГР у *Rapaana venosa*, обитающей в северо-западной части Чёрного моря в разные сезоны года.

В другие сезоны активность ГР моллюска была достоверно ниже по сравнению с осенним периодом.

Наибольшее содержание GSH в лейблейновской железе моллюсков было установлено в весенний период и составляло $1,57 \pm 0,038$ ммоль/г ткани (рис.6). В другие сезоны года количество данного антиоксиданта в лейблейновской железе постепенно уменьшалось и достигало минимального значения в зимний период. Показания уровня GSH в тканях рапаны в разные сезоны, достоверно отличались друг от друга. Полученные результаты можно резюмировать в таблице 1.

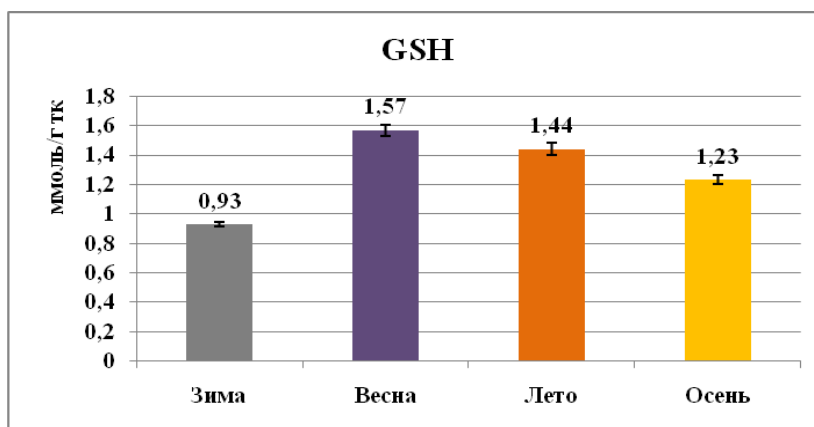


Рис. 6. Содержание GSH у *Rapaana venosa*, обитающей в северо-западной части Чёрного моря в разные сезоны года.

На процессы, происходящие в организме рапаны, в частности на активность антиоксидантных ферментов и интенсивность перекисного окисления липидов, влияет множество факторов среды: температура и соленость воды, световой режим, доступность кислорода, химические загрязнения, экологическое состояние акватории, обеспеченность пищей, стадия жизненного цикла моллюска.

По данным А.И. Иванова [6], в весенний период, с повышением температуры воды выше 11°C моллюски начинают активно питаться. Это обеспечивает интенсивный рост раковины и мягкого тела рапаны [12].

Именно в этот период отмечалась наибольшая активность СОД, каталазы, ГП а также содержание такого важнейшего антиоксиданта как GSH по сравнению с другими сезонами года.

Таблица 1.

Сезонные изменения показателей антиоксидантной системы в лейблейновской железе рапаны

Сезоны	Уровень значений показателей АОС					
	Акт-сть СОД	Акт-сть каталазы	Акт-сть ГП	Акт-сть ГР	Содержание GSH	Содержание МДА
Зима	средний	миним.	миним.	≈ к миним.	миним.	миним.
Весна	максим.	максим.	максим.	≈к миним.	максим.	≈ к миним.
Лето	миним.	≈ к максим.	≈ к максим.	миним.	≈ к максим.	максим.
Осень	≈ к миним.	≈ к максим.	≈к максим.	максим.	≈ к миним.	≈ к миним.

Примечание: максим. – максимальное значение; миним. – минимальное значение; ≈ к максим. – значение приближенное к максимальному уровню; ≈ к миним. – значение приближенное к минимальному уровню

В летний репродуктивный период интенсивность потребления корма рапаной возрастает, но, несмотря на это, происходит снижение роста у половозрелых особей, при сохранении высокого темпа у неполовозрелых животных [7]. Для этого периода характерны высокий уровень пероксидвосстанавливающей активности (каталазы, ГП) и такого важного редуцирующего компонента как GSH при минимальных значениях активности СОД и ГР. При этом именно летом усиливается переокисление липидов, о чем свидетельствует максимальное содержание в ткани МДА. Усиление ПОЛ можно связать с несколькими причинами. Во-первых, с необходимостью перестройки биохимических процессов в связи с репродуктивной активностью особей. Аналогичные изменения АОС – снижение активности СОД и повышение активности каталазы наблюдались у американских норок – представителей животных значительно отличающихся от моллюсков [8]. Во-вторых, интенсификацией окислительных процессов, необходимых для энергообеспечения организмов и в-третьих – неблагоприятной экологической обстановкой, которая складывается в летний период.

В осенний период, характерной особенностью которого является прекращение размножения, рапана продолжает активно питаться, и в теле животного интенсивно накапливаются органические вещества. Активность каталазы находится на достаточно высоком уровне, а активность ГР в этот сезон максимальная. Активность СОД, в этот период года близка к минимальным значениям, а активность ГП – наиболее низкая. Возможно такое состояние АОС отражает преобладание в организме анаболических процессов, связанных с интенсивным расходом восстановителей (GSH в частности).

Особенностью зимнего периода рапаны является снижение интенсивности питания и прекращение роста во всех возрастных группах [7]. Рапана ведет малоподвижный образ жизни с наименьшими энергетическими и пластическими тратами. Это позволяет ей сохранить накопленные органические компоненты до периода начала роста и размножения. В этот период существенных изменений в биохимическом составе тела не происходит и уровень органических и минеральных веществ достаточно постоянен, что связано с общим низким уровнем метаболизма [12]. Соответственно и антиоксидантная система в этот период времени находится на довольно низком уровне, а содержание МДА достигает своего годового минимума.

Исследуя состояние антиоксидантной системы рапаны можно заключить, что ее показатели подвержены сезонным изменениям. С одной стороны это обусловлено эволюционно сформированными сезонными физиологическими ритмами. С другой стороны, изменения активности ферментов АОС и других ее компонентов могут быть также обусловлены состоянием окружающей среды, в том числе различным уровнем антропогенной нагрузки в разные периоды года. Таким образом, при дальнейших исследованиях физиолого-биохимического статуса *R. venosa* необходимости учитывать сезонные изменения активности антиоксидантной системы моллюска.

ВЫВОДЫ

1. В разные периоды года показатели антиоксидантной системе *R. venosa* существенно изменялись.
2. Активности большинства ферментов АОС (СОД, каталазы, ГП) и уровень GSH у рапаны были максимальными в весенний период.
3. Минимальный уровень параметров АОС рапаны отмечались в зимний период.
4. Интенсивность перекисного окисления липидов, определяемое по уровню МДА, достигала максимума в летний период, минимума – в зимний период года.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алешко С.А. Сезонные изменения некоторых параметров биотрансформации и антиоксидантной системы в печени полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из Амурского залива Японского моря / С.А. Алешко, О.Н. Лукьянова // Биология моря. – 2008. – Т. 34, № 2. – С. 148–151.
2. Вижевский В.И. Рост мидий в озере Донузлав / В.И. Вижевский // Труды Южного научно-исследовательского института морского рыбного хозяйства и океанографии. – 1994. – Т. 40. – С. 115-119.
3. Горомосова С.А. Основные черты биохимии энергетического обмена мидий./ С.А. Горомосова, А.З. Шапиро // М.: Легкая промышленность, 1984. – 119 с.
4. Горячковский А.М. Клиническая биохимия. 2-е изд. / А.М. Горячковский –О.: Астропринт, 1998. – 608 с.
5. Драпкин Е.И. Новый моллюск в Чёрном море / Е.И. Драпкин // Природа. – 1953. – № 9. – С. 92-95.

6. Иванов А.И. Количество пищи потребляемое Черноморской рапаной (*Rapana thomasiana* Grosse) / А.И. Иванов // Зоологический журнал. – 1964. –Т. 43, Вып. 8. – С. 1129-1132.
7. Иванов А.М. Интенсивность питания рапаны (*Rapana thomasiana* Grosse) в зависимости от размеров тела и сезонов года / А.М.Иванов, В.И. Руденко // Тр. Азово-Черноморского научно-исследовательского института морского рыбного хозяйства и океанографии. – 1969. – Вып. 26. – С. 167-172.
8. Ильина Т.Н. Влияние генотипа на сезонные изменения антиоксидантной системы и изоферментного спектра лактатдегидрогеназы американских норок (*Mustela vison* Schreber, 1777) / Т.Н. Ильина, В.А. Илюха, С.Н. Калинина, Н.А. Гормякова, Л.А. Беличева // Вестник ВОГиС. – 2007. – Т. 11, № 1. – С. 145-154.
9. Костюк А.С. Сезонная и инфрарадианная ритмика ноцицепции интактных моллюсков *Helix albescens*/ А.С. Костюк // Ученые записи Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия», – 2012. – Т. 25(64), №3. – С. 81-88.
10. Ланкин В.З. Возрастные изменения глутатион-S-трансферазной и глутатионпероксидазной активности цитозоля печени крыс / В.З. Ланкин, А.К. Тихадзе, А.Л. Ковалевская, В.В. Лемешко, А.М. Вихерт // ДАН СССР. – 1981. – Т. 261, № 6. – С. 1467–1470.
11. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Учеб. пособие под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. – 271 с.
12. Саенко Е.М. Динамика биохимических показателей тканей рапаны (*Rapana thomasiana*) в различные периоды годового цикла / Е.М. Саенко // Вопросы рыболовства. – 2008, Т. 9, № 4 (36). – С. 788-796.
13. 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.
14. 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.
15. Тоцкий В.Н. Состояние антиоксидантной системы у представителей *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846), обитающих в разных акваториях Одесского залива (Чёрное море) / В.Н. Тоцкий, О.Н. Ершова, В.А. Топтиков, О.А. Ковтун, А.Г. Драгоева, Т.И. Лавренюк // Вестник ОНУ, сер. Биология, Т. 18, – Вып. 1(30). – С. 7-15.
16. Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб / М.И. Шатуновский // М.: Наука, 1980. – 288 с.
17. Шахматова О.А. Активность каталазы личинок атерины (*Atherina hepsetus* L.) и параметры среды. Поиск условно нормальных значений /О.А. Шахматова // Современные проблемы экологии Азово-Черноморского региона: IV Междунар. конф. (Керчь, 7-9 окт. 2008 г.) – Керчь, 2008. – С. 143-148.
18. International Concil for the Expeoration of the Sea. Aliem Species Alert: *Rapana venoza* (veined whelk). Edited by R. Mann, A.Occhipinti, J. M. Harding. ICES Cooperative Resercb Report, 2004. № 264. – 14p.
19. Murlund S. Normal Cu, Zn superoxidisedismutase, Mn- SOD, catalase and glutathione peroxidase in werner's syndrome / S. Murlund, J.Nordenson, O. Back // J. Gerontjl. – 1981. – V. 36, № 4. – P. 405–409.

20. Shulman G.E., Love R.M. Advances in marine biology. V. 36. The biochemical ecology of marine fishes. Ed. Southward A.S., Tyler P.A., Young C.M. San Diego; San Francisco; New York etc.: Acad. Press, 1999. – 351 p.
21. Zolotarev V. The Black Sea ecosystem changes related to the introduction of new mollusk species / V. Zolotarev // PSZNY: Mar. Ecology. – 1996. – V. 17 (1-3). – P. 227-236.

**О. М. Єршова, В. М. Тоцький, В. А. Топтіков,
Т. І. Лавренюк, О. Г. Драгоєва, О. О. Ковтун**

**СЕЗОННІ ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ
АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ *RAPANA VENOSA*
(VALENCIENNES, 1846), ЩО МЕШКАЄ В ПІВНІЧНО-ЗАХІДНІЙ
ЧАСТИНІ ЧОРНОГО МОРЯ**

Ключові слова: Чорне море, *Rapana venosa*, сезонна активність, антиоксидантна система.

Вивчали стан антиоксидантної системи в різні сезони року у червоного моллюска *Rapana venosa*, що мешкає в північній частині Чорного моря Одеської затоки. У стравохідній (лейблейновській) залозі рапани визначали активність супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази і вміст відновленого глутатіону. Інтенсивність перекисного окислення ліпідів оцінювали за вмістом малонового діальдегіду (МДА). Виявлено коливання активності про- та антиоксидантної системи, пов'язаної з життєвим циклом рапани і факторами навколишнього середовища в різні періоди року. Зроблено висновок про необхідність враховувати сезонні зміни антиоксидантної системі *R. venosa*, що характеризують фізіолого-біохімічний статус моллюска при подальших дослідженнях.

**O. N. Ershova, V. N. Totskiy, V. A. Topnikov,
T. I. Lavrenyuk, O. G. Drahoyeva, O. A. Kovtun**

**SEASONAL FEATURES OF THE OPERATION OF ANTIOXIDANT
SYSTEM *RAPANA VENOSA* (VALENCIENNES, 1846), LIVES IN THE
NORTHWESTERN PART OF THE BLACK SEA**

Keywords: Black Sea, *Rapana venosa*, seasonal activity, antioxidant system.

It was researched the state of the antioxidant system in different seasons in the gastropod *Rapana venosa*, dwelling in the northern part of the Black Sea Odessa Bay. In esophageal (leybleynovskoy) iron brine determined superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione content. Lipid peroxidation was evaluated on the content of malondialdehyde (MDA). Fluctuations revealed activity of pro- and antioxidant systems associated with the life cycle of brine and environmental factors in different periods of the year. The conclusion about the need to take into account seasonal changes in antioxidant system of *R. venosa*, characterizing the physiological and biochemical status of shellfish in further studies.