

УДК 594.3(477.74)(262.5)

Ершова О. Н., Каракис С. Г., Лавренюк Т. И.,
Драгоева А. Г., Ковтун О. А.

**ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ
СИСТЕМЫ САМЦОВ И САМОК *RAPANA VENOZA* С АКВАТОРИИ
ОДЕССКОГО ЗАЛИВА ЧЕРНОГО МОРЯ**

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

Исследовались особенности антиоксидантной системы в лейблейновской железе самцов и самок брюхоногого моллюска *Rapana venosa* 3-х и 6-ти лет, обитающие в прибрежной акватории Одесского залива Черного моря. Воды данной акватории отличаются значительными сезонными и внесезонными колебаниями солености (от 2 до 17 ‰), высокой концентрацией биогенных и различных загрязняющих соединений. В пищеводной (лейблейновской) железе моллюсков определяли активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР) и содержание восстановленного глутатиона (GSH). Степень окислительного повреждения биополимеров оценивали по уровню содержания малонового диальдегида (МДА). Показано, что по большей части показателей АОС между самцами и самками в целом нет достоверной разницы. Исключение составляют каталаза и СОД, где активность первой выше у самок в 1,2 раза, а по второму показателю - у самцов в 1,5 раза. Исследования активности АОС рапан 3-х лет показало, что отличие между самцами и самками отмечалось только по содержанию GSH. По остальным показателям достоверных отличий не наблюдалось. У 6-ти летних рапан также не было достоверной разницы между самцами и самками по большей части исследуемых показателей АОС. В то же время, такой интегральный показатель, как МДА был в 1,3 раза ниже у самок, возможно за счет повышенной активности ГР по сравнению с особями мужского пола. Сопоставляя показатели АОС у рапан 3-х и 6-ти лет, можно видеть, что в основном они находятся на одном уровне. При этом, только активность ГР к 6-ти годам снижается в 1,8 раза, а активность ГП с возвратом, напротив, увеличивается в 1,45 раза. Полученные результаты свидетельствуют о том, что к 3-х годам антиоксидантная система в основном сформирована, и только ГР и ГП претерпевают трансформации, необходимой для перестройки биохимических и физиологических процессов с 3-х до 6-и лет. Сделан вывод, что существуют некоторые особенности как у рапан разного пола и разного возраста, так и внутри разных возрастных групп, что необходимо учитывать при дальнейших исследованиях АОС рапаны.

Ключевые слова: *Rapana venosa*, антиоксидантная система, Черное море

Проблема устойчивости морских организмов, их адаптация к изменяющимся условиям среды остается одной из основных проблем биологии. Важным проявлением стресс-реакции и адаптационной перестройки является совершенствование деятельности регуляторных механизмов, участвующих в поддержании оптимального уровня интенсивности обменных процессов на уровне целостного организма [11]. Как известно, одним из ведущих механизмов адаптации детерминирующих развитие вторичных изменений органов и тканей, является интенсификация свободнорадикального окисления биологических субстратов при действии активных форм кислорода [6; 4]. Механизмы и последствия стресс-реакции в организме зависят не только от метаболических возможностей различных тканей, но и от возраста индивидуума. У двустворчатых моллюсков *Unio pictorum* выявлены возрастные особенности стрессорной динамики показателей перекисного окисления липидов и перекисного окисления белков в жабрах, гепатопанкреасе, гонадах и ноге, показано также, что уровень каталазы, супероксиддисмутазы и церулоплазмينا у животных разных возрастных групп существенно различается между собой [2].

В то же время, возрастной аспект исследования свободнорадикальной деструкции белковых и липидных компонентов тканей брюхоногих моллюсков, практически не представлен в литературе и должен дополнить известные к настоящему времени закономерности адаптационных процессов на разных этапах онтогенеза и позволит существенно углубить представления о возрастных особенностях механизмов адаптации к экстремальным воздействиям.

Цель исследования: изучение перекисного окисления липидов, а так же состояния антиоксидантной системы самцов и самок брюхоногих моллюсков *Rapana venosa* разных возрастных групп.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили особи *Rapana venosa* 3-х и 6-ти лет, обитающие в прибрежной акватории Одесского залива Черного моря. Воды Одесского залива отличаются значительными сезонными и внесезонными колебаниями солености (от 2 до 17 ‰), частыми заморными явлениями, высокой концентрацией биогенных и различных загрязняющих соединений [3; 10]. При этом, здесь для рапаны существует достаточная кормовая база. Моллюсков собирали на каменистых субстратах с глубины от 5 до 15 метров на расстоянии 50-150 м от берега. Площадь сбора рапаны составляла около 100 м². Высота раковин 3-х летних моллюсков колебалась в пределах от 40 до 50 мм, 6-ти летних – от 70 до 80 мм.

Для биохимического анализа использовали ткань пищеводной (лейблейновской) железы. Образцы тканей хранили в морозильной камере

(-18°C). Гомогенаты готовили по методике [7]. Размеры выборок для определения биохимических параметров колебались от 8 до 15 особей обоего пола.

Антиоксидантную систему исследовали определяя активности антиоксидантных ферментов - супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), а также содержание глутатиона восстановленного (GSH) и малонового диальдегида (МДА).

Активность СОД измеряли по степени ингибирования аутоокисления адреналина в щелочной среде путем спектрофотометрической регистрации оптической плотности при 347 нм [8]. Каталазную активность гомогенатов оценивали спектрофотометрически по снижению светопоглощения перекиси водорода при 240 нм в реакционной среде в течение 5 мин. [12]. Активность GSH-пероксидазы определяли при наличии в среде H₂O₂ в качестве субстрата. Интенсивность образования GSSG оценивали по динамике изменения оптической плотности при 430 нм [5]. ГР-активность измеряли по скорости окисления НАДФН в реакционной среде. Реакцию инициировали окисленным глутатионом. Спад НАДФН регистрировали по падению оптической плотности при 340 нм через 5 мин инкубации. Расчет активности проводили согласно [Прохорова М.И., 1982].

Содержание МДА в экстрактах пищеводной железы определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты [9], содержание GSH - по реакции с реактивом Элмана и образования окрашенного продукта – 2-нитро-6-меркаптобензойной кислоты, который имеет максимум поглощения при 412 нм [1].

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

Результаты исследования

В первой части эксперимента проводили сравнительный анализ активности ферментов антиоксидантной системы (АОС) рапан разного пола.

В выборке одного пола объединяли рапан разного возраста. Результаты проведенного эксперимента представлены в табл. 1.

Достоверной разницы содержания малонового диальдегида (МДА) и глутатиона восстановленного (GSH) в лейблейновской железе между самцами и самками не наблюдалось. Не отмечалось также различий у моллюсков разного пола по активности ферментов глутатионредуктазы (ГР) и глутатионпероксидазы (ГП). В то же время, активность каталазы у рапан была выше у особей женского пола в 1,2 раза, а активность супероксиддисмутазы (СОД) в 1,5 раза выше у самцов. Можно

предположить, что повышенная активность каталазы у самок связана с повышенным образованием H₂O₂ в лейблейновской железе. У самцов же более высокий уровень СОД, может быть индуцирован повышенным образованием оксидных радикалов.

Таблица 1

Активность антиоксидантной системы самцов и самок *R. venosa* (n = 8-12).

	самцы	самки
МДА, нмоль/г тк	11,7±0,46	12,7±0,25
ГР, мкмоль НАДФН/г тк/мин	1,04±0,03	1,08±0,02
Каталаза, ммоль/г тк/мин	1,56±0,03	1,9±0,1**
GSH, ммоль/г тк	1,26±0,04	1,18±0,05
ГП, нмоль/г тк/мин	735,5±38,1	778,1±41,4
СОД, инг ОД ₃₄₇ /г тк/мин	1,64±0,17*	1,07±0,16

Примечание: достоверная разница между самцами и самками * - P<0,05, ** - P<0,01

При исследовании активности АОС рапан разного возраста (3-х и 6-и лет), в выборке рапан одного возраста объединяли моллюсков разного пола. Результаты проведенного эксперимента представлены в Табл. 2. Сравнивая активность АОС рапан разного возраста, установлено, что каждая возрастная группа имеет некоторые особенности. Так, по содержанию МДА и GSH в лейблейновской железе рапан из разных возрастных групп не выявлено достоверных различий. Активность каталазы и СОД также была на одном уровне у моллюсков разного возраста. Различия между рапанами 3-х и 6-лет отмечались только при исследовании активности ферментов ГР и ГП.

Таблица 2

Активность антиоксидантной системы *R. venosa* 3-х и 6-и лет, (n = 8-15)

	Рапаны 3-х лет	Рапаны 6-ти лет
МДА, нмоль/г тк	13,1±0,4	11,7±0,7
ГР, мкмоль НАДФН/г тк в мин	1,4±0,06*	0,76±0,05
Каталаза, ммоль/г тк в мин	1,84±0,15	2,07±0,1
GSH, ммоль/г тк	1,56±0,067	1,58±0,064
ГП, нмоль/г тк в мин	775,85±51,5	1130,40±81,96**
СОД, инг ОД ₃₄₇ /г тк в мин	2,23±0,28	2,47±0,19

Примечание: достоверная разница между рапанами 3-х та 6-ти лет * - P<0,05, ** - P<0,01

Так, с возрастом активность ГР снижалась у 6-х летних моллюсков в 1,8 раза по сравнению с 3-ти летними, а активность ГП наоборот

повышалась у 6-ти летних рапан в 1,45 раза. Вероятно, такие результаты могут свидетельствовать о том, что к 3-х годам антиоксидантная система в основном сформирована, и только ГР и ГП претерпевают трансформации, необходимой для перестройки биохимических и физиологических процессов с 3-х до 6-и лет.

Исследовались также особенности активности антиоксидантной системы моллюсков разного пола 3-х летнего возраста (табл. 3). Установлено, что содержание МДА а также активность ГР, каталазы, ГП и СОД была на одном уровне как у самцов, так и у самок рапан 3-х летнего возраста.

Таблица 3

Активность антиоксидантной системы самцов и самок *R. venosa* 3-х летнего возраста (n = 8-15)

	Рапаны 3-х лет	
	самцы	самки
МДА, нмоль/г тк	12,55±0,6	13,64±0,46
ГР, мкмоль НАДФН/г тк в мин	0,96±0,06	1,11±0,11
Каталаза, ммоль/г тк в мин	1,67±0,16	2,06±0,28
GSH, ммоль/г тк	1,71±0,09*	1,40±0,06
ГП, нмоль/г тк в мин	801,7±94,3	751,6±49,2
СОД, инг ОД ₃₄₇ /г тк в мин	2,40±0,40	2,10±0,40

Примечание: достоверная разница между самцами и самками * - $P < 0,05$.

В этой возрастной группе исключение составляет GSH, содержание которого было достоверно выше в 1,2 раза у самцов по сравнению с аналогичным показателем у рапан женских особей.

Результаты исследования активности АОС самцов и самок рапан 6-и летнего возраста представлены в Табл.4. Сравнивая некоторые показатели АОС в рапан разного пола в этой возрастной категории установлено, что активность каталазы, ГП, СОД и содержание такого антиоксиданта, как GSH было практически на одном уровне у моллюсков одного и другого пола.

В то же время, содержание МДА в этой возрастной группе было достоверно ниже в 1,3 раза у самок, вероятно, за счет более высокой активности ГР у особей женского пола в 1,45 раза.

Суммируя полученные результаты в целом, можно заключить, что существуют некоторые особенности состояния АОС как у рапан разного пола и разного возраста, так и внутри разных возрастных групп. Так, по большей части показателей АОС между самцами и самками в целом нет достоверной разницы. Исключение составляют каталаза и СОД, где активность первой выше у самок в 1,2 раза, а по второму показателю - у самцов в 1,5 раза. При исследовании активности АОС рапан 3-х лет можно

видеть, что отличие между самцами и самками отмечались только по содержанию GSH. По остальным показателям достоверных отличий не наблюдалось. У 6-ти летних моллюсков также не отмечали достоверной разницы по большей части исследуемых показателей АОС. В то же время, такой интегральный показатель, как МДА был в 1,3 раза ниже у самок, возможно за счет повышенной активности ГР по сравнению с особями мужского пола. Сопоставляя показатели АОС у рапан 3-х и 6-ти лет, можно видеть, что в основном они находятся на одном уровне. При этом активность ГР к 6-ти годам снижается в 1,8 раза, а активность ГП, напротив, увеличивается в 1,45 раза. Вероятно, такие результаты свидетельствуют о том, что к 3-х годам антиоксидантная система в основном сформирована, и только ГР и ГП претерпевают трансформации, необходимой для перестройки биохимических и физиологических процессов с 3-х до 6-и лет.

Таблица 4

**Активность антиоксидантной системы самцов и самок
R. venosa 6-и летнего возраста (n = 9 -13)**

	Рапаны 6-ти лет	
	самцы	самки
МДА, нмоль/г тк	13,05±0,97*	10,35±0,67
ГР, мкмоль НАДФН/г тк в мин	0,64±0,07**	0,93±0,06
Каталаза, ммоль/г тк в мин	1,98±0,18	2,18±0,07
GSH, ммоль/г тк	1,60±0,04	1,55±0,06
ГП, нмоль/г тк в мин	1137,4±99,5	1123,5±133,4
СОД, инг ОД ₃₄₇ /г тк в мин	2,34±0,34	2,56±0,21

Примечание: достоверная разница между самцами и самками рапаны * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$

Выводы:

1. В целом, АОС самцов и самок рапан отличалась по двум показателям. Активность каталазы была выше у самок в 1,2 раза, а активность СОД выше у самцов в 1,5 раза. По остальным показателям АОС в лейблейновской железе моллюсков разного пола различий не отмечалось.

2. При исследовании особенностей активности АОС самцов и самок рапан 3-х лет не выявлено разницы между полами почти по всем показателям. В этой возрастной группе исключение составляет GSH, содержание которого было достоверно выше в 1,2 раза у самцов по сравнению с аналогичным показателем у рапан женских особей.

3. У 6-ти летних моллюсков содержание МДА в лейблейновской железе меньше у особей женского пола в 1,3 раза, а активность ГР у особей женского пола больше по сравнению с самцами в 1,45 раза. По остальным показателям активности АОС самцов и самок этой возрастной группы различий не наблюдалось.

4. Исследование активности АОС рапан 3-х и 6-ти лет показало, что эти возрастные группы отличались между собой только по двум показателям. Активность ГР с возрастом снижалась у моллюсков в 1,8 раза по сравнению с 3-х летними рапанами, а активность ГП повышалась у 6-ти летних рапан в 1,45 раза.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Горячковский А.М. Клиническая биохимия. 2-е изд. / А.М. Горячковский // О.: Астропринт, 1998. – 608 с.
2. Гханнам Х.Э.(2011) Свободнорадикальный гомеостаз моллюсков *Unio Pictorum* в норме и при воздействии тяжелых металлов, Автореф. диссерт., Астрахань, 25 с.
3. Доценко С.А. Мінливість основних гідрологічних характеристик Одеського регіону північно-західної частини Чорного моря / С.А. Доценко. // Автореф. дисертації, канд. географ. наук. – Одеса, 2003. – 20 с.
4. Дубинина Е.Е., Дадали В.А. 4-гидрокси-транс-2-ноненаль в функциональной активности клеток//Биохимия том 75, вып. 9.-2010.-С.1189-1212
5. Ланкин В.З. Возрастное изменение глутатион-S-трансферазной и глутатионпероксидазной активности цитозоля печени крыс / Ланкин В.З., Тихадзе А.К., Ковалевская А.Л., Лемешко В.В., Вихерт А.М. // ДАН СССР. – 1981. – Т. 261, № 6. – С. 1467–1470.
6. Ланкин, В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях / В.З. Ланкин А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков. М. - 2001.-71с.
7. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Учеб. пособие под ред. М. И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. – С. 30-31, 163-164, 181 – 183.
8. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса авто окисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопросы мед. химии. – 1999. – №3. – С. 263-273.
9. Стальная Д.И. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / Стальная Д.И., Гаришвили Т.Г. // Сб. Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
10. 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.
11. Федоров Б.М. Стресс и система кровообращения. – М.: Медицина, 1991. – 320 с.
12. Murlund S., Nordenson J., Back O. Normal Cu, Zn superoxidedismutase, Mn- SOD, catalase and glutathione peroxidase in werner's syndrome // J.Gerontj. – 1981. – 36, №4. – P.405-409.

О. М. Єршова, С.Г. Каракис, Т. І. Лавренюк, О. Г. Драгоєва, О. О. Ковтун
ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ
САМЦІВ І САМОК *RAPANA VENOZA* З АКВАТОРІЇ ОДЕСЬКОЇ
ЗАТОКИ ЧОРНОГО МОРЯ

Ключові слова: Rapana venosa, антиоксидантна система, Чорне море

Досліджувалися особливості антиоксидантної системи в лейблейновській залозі самців і самок черевоногого моллюска *Rapana venosa* 3-х і 6-ти років,

що мешкають в прибережній акваторії Одеської затоки Чорного моря. Води цієї акваторії відрізняються значними сезонними і позасезонними коливаннями солоності (від 2 до 17 ‰), високою концентрацією біогенних і різних забруднюючих сполук. У пищеводній (лейблейновській) залозі молюсків визначали активність супероксиддисмутази (СОД), каталази, глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонредуктази (ГР) і вміст відновленого глутатіону (GSH). Ступінь окислювального пошкодження біополімерів оцінювали за рівнем вмісту малонового діальдегіду (МДА). Показано, що здебільшого між показниками АОС самців і самок в цілому немає достовірної різниці. Виняток становлять каталаза і СОД, де активність першої вище у самок в 1,2 рази, а за другим показником - у самців в 1,5 рази. Дослідження активності АОС рапан 3-х років показало, що відмінність між самцями і самками визначалась тільки за вмістом GSH. За іншими показниками достовірних відмінностей не спостерігалось. У 6-ти літніх рапан також не було достовірної різниці між самцями і самками в більшості досліджуваних показників АОС. У той же час, такий інтегральний показник, як МДА був в 1,3 рази нижче у самок, можливо за рахунок підвищеної активності ГР в порівнянні з особами чоловічої статі. Порівнюючі показники АОС у рапан 3-х і 6-ти років, можна бачити, що в основному вони знаходяться на одному рівні. При цьому тільки активність ГР до 6-ти років знижується в 1,8 рази, а активність ГП з віком, навпаки, збільшується в 1,45 рази. Отримані результати свідчать про те, що до 3-х років антиоксидантна система в основному сформована, і тільки ГР і ГП претерплюють трансформації, необхідної для перебудови біохімічних і фізіологічних процесів з 3-х до 6-и років. Зроблено висновок, що існують деякі особливості як у рапан різної статі і різного віку, так і всередині різних вікових груп, що необхідно враховувати при подальших дослідженнях АОС рапани.

O. N. Ershova, S.G.Karakis, T. I. Lavrenyuk, O. G. Drahoyeva, O. A. Kovtun
AGE PECULIARITIES OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF THE
FEMALE AND THE SAMOUS *RAPANA VENOZA* WITH THE
AQUATORIUM OF THE ODESSA GULF OF THE BLACK SEA

Key words: *Rapana venosa*, *antioxidant system*, *Black Sea*

The features of the antioxidant system in the leiblian gland of males and females of the gastropod *Rapana venosa*, 3 and 6 years old, inhabit the coastal waters of the Odessa gulf of the Black Sea. The waters of this area are characterized by significant seasonal and off-season salinity fluctuations (from 2 to 17 ‰), a high concentration of biogenic and various polluting compounds. The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (HP), glutathione reductase (GR) and the content of reduced glutathione (GSH) were determined in the esophageal (leiblian) gland of mollusks. The degree of oxidative

damage to biopolymers was assessed by the level of malonic dialdehyde (MDA) content. It is shown that for the most part AOS indicators between males and females as a whole there is no reliable difference. The only exception is catalase and SOD, where the activity of the first is 1.2 times higher in females, and in the second one, in males 1.5 times. Studies of the activity of AOS rapan in 3 years showed that the difference between males and females was noted only in the content of GSH. For the rest of the indicators, no significant differences were observed. In 6-year-old rapans, there was also no significant difference between males and females for the most part of the AOS indicators studied. At the same time, an integral index such as MDA was 1.3 times lower in females, possibly due to increased activity of GH compared to males. Comparing the indicators of AOS in rapan 3 and 6 years, you can see that they are basically on the same level. In this case, only the activity of GH by the age of 6 decreases 1.8 times, and the activity of GP with the opposite, increases by 1.45 times. The obtained results indicate that by the age of 3, the antioxidant system is basically formed, and only GR and GP undergo transformation necessary for the reconstruction of biochemical and physiological processes from 3 to 6 years. It is concluded that there are some peculiarities in both the rape of different sexes and different ages, and within different age groups, which must be taken into account in further studies of AOS of the rapana.