

УДК 574.2

ИНТЕГРИРОВАННЫЙ ОТВЕТ БИОМАРКЕРОВ ПРИ ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА МОРСКОЙ СРЕДЫ НА ПРИМЕРЕ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *MYTILUS TROSSULUS* (GOULD, 1850)

© 2021 г. А. А. Истомина¹, А. А. Мазур^{1, *}, В. П. Челомин¹, С. П. Кукла¹, В. В. Слободскова¹, А. Ю. Звягинцев², Ю. В. Федоренц¹, О. А. Еловская¹, Л. Ф. Колосова¹

¹Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

²Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

*e-mail: mazur.aa@poi.dvo.ru

Поступила в редакцию 16.03.2020 г.

После доработки 03.08.2020 г.

Принята к публикации 24.09.2020 г.

Рассмотрена возможность использования для оценки загрязнения морской среды таких биомаркеров, как стабильность мембран лизосом, индекс генетического повреждения, активность каталазы и глутатион-S-трансферазы, содержание малонового диальдегида и индекс кондиции. На основе данных показателей рассчитан индекс, отражающий интегрированный ответ биомаркеров. Полученный индекс подтвердил известную степень загрязнения выбранных акваторий, которая возрастает в ряду: зал. Восток < б. Козьмина < б. Золотой Рог.

Ключевые слова: *Mytilus trossulus*, стабильность мембран лизосом, индекс генетического повреждения, каталаза, глутатион-S-трансфераза, индекс кондиции, интегрированный ответ биомаркеров

DOI: 10.31857/S0134347521030062

Стремительное увеличение антропогенного пресса на прибрежные акватории определяет необходимость активного внедрения в экологическую практику оперативных методов и подходов оценки качества их состояния. Важной задачей остается оценка биологических откликов (эффектов) морских организмов на действие загрязнения. Ученые всего мира активно изучают возможность интеграции индивидуальных реакций биомаркеров в ответ на загрязнение для определения степени нарушения биологических систем и их количественной оценки (Dagnino et al., 2007; Sanchez et al., 2013; Vieira et al., 2014; Benali et al., 2015; González-Fernández et al., 2016; Lompré et al., 2020). На основе математических и статистических преобразований данных рассчитываются индексы, объединяющие реакции биомаркеров на всех уровнях биологической организации. Таким образом, полученные индексы интегрируют синергичные и кумулятивные эффекты разных стрессоров, присутствующих в среде обитания, что позволяет судить о состоянии здоровья исследуемых организмов.

В качестве эффективного неспецифического биомаркера прямого или косвенного воздействия загрязняющих веществ широко применяется ана-

лиз уровня повреждения ДНК (ИГП – индекс генетического повреждения) (Mitchelmore, Chipman, 1998; Frenzilli et al., 2001; Regoli et al., 2004; Al-Fanharawi et al., 2018).

В лабораторных исследованиях и программах биомониторинга часто используют антиоксидантные ферменты каталазу (КАТ) и глутатион-S-трансферазу (GST) как биомаркеры окислительного стресса (Damien et al., 2007; Maria, Bebianno, 2011; Benali et al., 2015). Функция КАТ состоит в разрушении образующегося в организме при окислительных процессах токсичного пероксида водорода (Halliwell, Gutteridge, 2007), который является основным клеточным предшественником высокореактивного гидроксильного радикала ($\text{HO}^{\cdot-}$). Удаление H_2O_2 ферментом КАТ – это важный механизм защиты морских организмов от окислительного стресса (Storey, 1996). Глутатион-S-трансфераза принимает участие в детоксикации полихлорированных бифенилов, полициклических ароматических углеводородов, хлорорганических и фосфорорганических пестицидов в результате их конъюгации с глутатионом (Hayes et al., 2005; Blanchette et al., 2007), а также связывает тяжелые металлы, снижая их токсичность для организмов (She et al., 2003; Yoshinaga et al., 2007).

Накопление продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида – МДА) служит биомаркером окислительного стресса у водных организмов, для которых характерно высокое содержание в липидах полиненасыщенных жирных кислот (Chelomin, Belcheva, 1991; Lushchak, 2011).

Использование показателя стабильности мембран лизосом (СМЛ) в качестве биомаркера общего стресса рекомендовано в рамках европейских региональных программ биомониторинга загрязнения (Vethaak et al., 2017). Это один из ключевых биомаркеров комплексной оценки воздействия загрязняющих веществ, предлагаемой для стран Евросоюза (Martinez-Gomez et al., 2015).

На уровне организма/популяции общую токсичность среды обитания оценивают с помощью индекса кондиции (ИК) (Benali et al., 2015), позволяющего получить информацию о физиологическом состоянии организма и об условиях роста. Данный показатель совместно с биомаркерами на молекулярно-клеточном уровне обеспечивает целостный и интегративный подход к изучению биологических эффектов.

Двустворчатый моллюск *Mytilus trossulus* (Gould, 1850), ведущий прикрепленный образ жизни, активно фильтрует воду и аккумулирует различные загрязняющие вещества, поэтому его часто используют в качестве тест-объекта для биомониторинга загрязнения морской среды (Bendell-Young et al., 2004; Pempkowiak et al., 2006; Lehtonen et al., 2016). В зал. Петра Великого *M. trossulus* доминирует в сообществах обрастания большинства гидротехнических сооружений (Звягинцев, 2005).

Цель настоящей работы – оценить соответствие реакции выбранного набора биомаркеров степени загрязнения окружающей среды и рассчитать интегрированный ответ биомаркеров, отражающий как состояние здоровья мидий, так и качество морской среды, в которой они обитают. Для этого на примере мидии *M. trossulus* на клеточном уровне организации исследованы СМЛ, уровень повреждения ДНК (ИГП), активность КАТ и GST, содержание малонового диальдегида (МДА), а на уровне организма – индекс кондиции (ИК).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Характеристика мест сбора материала

Особей *Mytilus trossulus* примерно одинакового размера собирали в посленерестовый период в ноябре 2018 г. в относительно чистой акватории зал. Восток (42°53'32" N; 132°44'6" E) и в загрязненных бухтах Козьмина (42°42'95" N; 133°00'71" E) и Золотой Рог (43°7'16" N; 131°54'46" E) Японско-

го моря. Зал. Восток обычно рассматривают как подверженную минимальному антропогенному воздействию фоновую акваторию в пределах зал. Петра Великого (Чернова, 2010; Сокольников и др., 2015). Здесь располагается Государственный природный комплексный морской заказник “Залив Восток”. Однако в последнее время органическое загрязнение залива увеличивается, что связано с рекреационной нагрузкой (Бойченко, 2009; Барышева и др., 2019). В б. Козьмина расположен крупный российский нефтепорт, через который осуществляется экспорт топливно-энергетических ресурсов в страны Азиатско-Тихоокеанского региона; здесь находится пункт разбора морских судов на металлолом, кроме этого прибрежная акватория б. Козьмина испытывает антропогенное воздействие (пос. Козьмино). Бухта Золотой Рог – самая грязная в зал. Петра Великого (Качество морских вод..., 2018), в нее поступают сточные воды г. Владивостока, негативное воздействие оказывают городские порты и судоремонтные заводы, маломерный и крупнотоннажный флот. На дне бухты образовался осадочный “нефтебитумный” слой, толщина которого местами достигает 0.7–1.5 м (Качество морских вод..., 2018). Воды б. Золотой Рог относят к V классу качества (грязные), в то время как воды б. Козьмина – к III классу (умеренно загрязненные) (Качество морских вод..., 2017, 2018, 2019).

Предварительная подготовка материала

Собранных мидий в течение двух дней акклиматизировали к лабораторным условиям (аэрируемая фильтрованная морская вода, 16°C), чтобы снять стресс от транспортировки. Объектом исследования служила пищеварительная железа, которая является центром регуляции метаболизма, а также участвует в механизмах иммунной защиты и поддержания гомеостаза внутренней среды, в процессах детоксикации, аккумуляции и элиминации ксенобиотиков (Vasanthi et al., 2017). Для определения СМЛ использовали по 10 мидий из каждой акватории; для определения активности GST и КАТ, ИК, а также содержания МДА – по 25 особей и для определения ИГП – по 5 особей. Для биохимического анализа реакции GST, КАТ и МДА пищеварительную железу от пяти мидий объединяли в одну пробу (всего 5 проб для каждой выборки) и быстро замораживали при температуре –80°C.

Стабильность мембран лизосом

Для оценки СМЛ применяли цитохимический метод, основанный на захвате лизосомами красителя нейтрального красного, время удерживания которого отражает степень повреждения мембран (Martinez-Gómez et al., 2015). Гемолимфу (0.1 мл)

получали из переднего мускула-аддуктора каждой мидии с помощью шприца для подкожных инъекций объемом 1 мл (соотношение гемолимфы и фильтрованной морской воды в шприце составляло 1 : 1). После 15 мин инкубации клеток с красителем при температуре 15°C препарат просматривали под микроскопом Axiostar plus (увеличение $\times 400$) сначала с интервалом 15 мин, а затем с интервалом 30 мин (до 180 мин для здоровых клеток). Время нахождения препарата под объективом микроскопа в каждом случае не превышало 1 мин. Полученные результаты выражали как последнее время удерживания красителя у 50% клеток препарата.

Индекс кондиции

ИК рассчитывали как отношение сырой массы мягких тканей мидии (г) к общей массе тела (раковина + мягкие ткани + мантийная жидкость, г), умноженное на 100 (Benali et al., 2015).

Индекс генетического повреждения

Для оценки уровня повреждения молекулы ДНК использовали щелочной вариант метода ДНК-комет, описанный ранее (Слободскова и др., 2015). Цифровые изображения обрабатывали в компьютерной программе CaspLab (v. 1.2.2). Для каждой кометы определяли долю ДНК в хвосте и на ее основе рассчитывали ИГП. При этом выборку ДНК-комет, полученных из одного геле-слайда (1 слайд = 1 особь; $n = 5$), разделили на пять классов в зависимости от степени фрагментации клеточной ДНК: класс С0 – < 5% фрагментированной ДНК (повреждение отсутствует или минимально); С1 – 5–20% (слабое повреждение); С2 – 20–40% (среднее); С3 – 40–75% (высокое) и С4 – > 75% (экстремальное повреждение) (Mitchellmore, Chirman, 1998). ИГП рассчитывали по формуле $(C1 + 2 \times C2 + 3 \times C3 + 4 \times C4) / (C0 + C1 + C2 + C3 + C4)$. В исследованных группах мидий анализировали по 5 геле-слайдов, содержавших не менее 50 ДНК-комет в каждом.

Биомаркеры окислительного стресса

Пищеварительную железу мидий гомогенизировали при температуре 4°C в 0.05 М фосфатном буфере рН 7.4 (1 : 10, масса/объем), содержавшем 0.1 мМ фенилметансульфонилфторид (ингибитор протеаз), 1% Тритон Х-100 и 1 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту. Гомогенаты центрифугировали в течение 30 мин при 15000 г и температуре 4°C. В полученных супернатантах определяли активность КАТ по скорости распада перекиси водорода (Regoli, Principato, 1995) и конъюгирующую активность GST в реакции с

субстратом 1-хлор-2,4-динитробензолом (Habig, Jakoby, 1981).

Содержание МДА определяли по цветной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (Buege, Aust, 1978).

Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури (Markwell et al., 1978).

Все измерения проводили на двухлучевом спектрофотометре UV-2550 с термостатированной ячейкой (Shimadzu) при температуре 20°C.

Интегрированный ответ биомаркеров (ИОБ)

ИОБ рассчитывали по предложенному ранее алгоритму (Sanchez et al., 2013). Этот подход систематизации данных основан на принципе отклонения от эталона (т.е. от контрольных значений). В качестве контрольных значений использовали данные, полученные для мидий из зал. Восток, который рассматривали как фоновую акваторию.

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программы Statistica 7. При оценке достоверности изменений биомаркеров использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Стабильность мембран лизосом

Согласно нашим данным, время удерживания нейтрального красного лизосомами у мидий из бухт Козьмина и Золотой Рог было соответственно в 1.5 и 2 раза значительно меньше, чем у мидий из зал. Восток (табл. 1, $n = 10$, $p < 0.05$).

Индекс генетического повреждения

Анализ отдельных классов ДНК-комет показал, что в пищеварительной железе мидий из зал. Восток более 85% комет принадлежали к классам С0 и С1 с неповрежденной или мало поврежденной ДНК (рис. 1). У мидий из бухт Козьмина и Золотой Рог доля ДНК-комет, принадлежавших к классам С0 и С1, была меньше, чем у моллюсков из зал. Восток, соответственно на 5 и 20%, а доля комет, относившихся к классу с сильно поврежденной ДНК (С3), выше на 1.7 и 14.75% соответственно (рис. 1). Кроме этого, у мидий из бухт Козьмина и Золотой Рог были отмечены ДНК-кометы с критическим уровнем повреждения ДНК (С4): 0.33 и 4.25% соответственно. Согласно рассчитанным на основе этих данных ИГП (табл. 1), исследуемые акватории располагаются следующим образом: зал. Восток < б. Козьмина < б. Золотой Рог.

Таблица 1. Биологические показатели *Mytilus trossulus* из разных акваторий зал. Петра Великого Японского моря (среднее значение ± стандартное отклонение)

Акватория	Длина, мм	Биомаркер					
		СМЛ	ИГП	КАТ	ГСТ	МДА	ИК
Зал. Восток	26.4–38.8	78.9 ± 17.9	0.64 ± 0.06	49.1 ± 5.5	161.7 ± 13.8	77.7 ± 9.5	50.5 ± 14.1
Б. Козьмина	26.3–38.9	51.8 ± 22.6*	0.79 ± 0.23	60.3 ± 5.2*	240.0 ± 29.0*	64.2 ± 6.0*	33.3 ± 9.6*
Б. Золотой Рог	23.4–32.2	40.5 ± 23.4*	1.16* ± 0.23	56.0 ± 6.7	236.8 ± 16.9*	58.3 ± 4.5*	38.8 ± 5.9*

Примечание. СМЛ – стабильность мембран лизосом, мин; ИГП – индекс генетического повреждения; КАТ – активность каталазы, мкмоль/мин/мг белка; ГСТ – активность глутатион-S-трансферазы, нмоль/мин/мг белка; МДА – содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка; ИК – индекс кондиции. *Достоверность различий относительно зал. Восток; критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$

Биомаркеры окислительного стресса

В пищеварительной железе мидий из б. Козьмина активность КАТ и ГСТ была соответственно в 1.2 и 1.5 раза выше, чем у моллюсков из зал. Восток; у мидий из б. Золотой Рог активность КАТ отличалась незначительно, а активность ГСТ также была в 1.5 раза выше, чем у мидий из зал. Восток (табл. 1) ($n = 5, p < 0.05$).

Содержание МДА в пищеварительной железе мидий из бухт Козьмина и Золотой Рог оказалось соответственно в 1.2 и 1.3 раза ниже, чем у мидий из зал. Восток (табл. 1) ($n = 5, p < 0.05$).

Индекс кондиции

Согласно полученным морфометрическим данным (табл. 1, длина раковины), возраст исследованных мидий не превышал одного года. Индекс кондиции у мидий из бухт Козьмина и Золотой Рог был значимо соответственно в 1.5 и 1.3 раза меньше, чем у мидий из зал. Восток (табл. 1) ($n = 25, p < 0.05$).

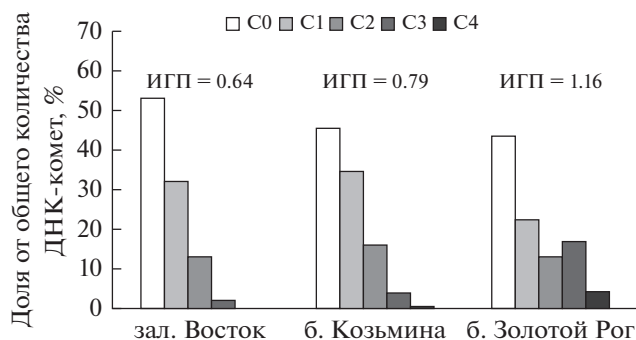


Рис. 1. Распределение ДНК-комет по классам в пищеварительной железе мидии *Mytilus trossulus* из разных акваторий (класс C0 – меньше 5% фрагментированной ДНК; класс C1 – 5–20%; C2 – 20–40%; C3 – 40–75%; C4 – больше 75%). ИГП – индекс генетического повреждения.

Интегрированный ответ биомаркеров

Рассчитанные значения ИОБ для мидий из зал. Восток, бухт Козьмина и Золотой Рог составили соответственно 0, 6.53 и 9.14. Графическое изображение полученных значений (рис. 2) наглядно отражает поведение отдельных биомаркеров и их отклонение от контроля. Область выше ноля показывает индукцию биомаркеров, ниже ноля – их ингибирование.

ОБСУЖДЕНИЕ

Стабильность мембран лизосом

Лизосомы – это органеллы, присутствующие во всех эукариотических клетках; они выполняют функцию изоляции и деградации отработавших и поврежденных макромолекул, а также токсичных для клетки веществ органической и неорганической природы. Патологическое изменение целостности мембран лизосом – важнейший биомаркер токсического воздействия на клеточном уровне (Dagnino et al., 2007; Martinez-Gómez et al.,

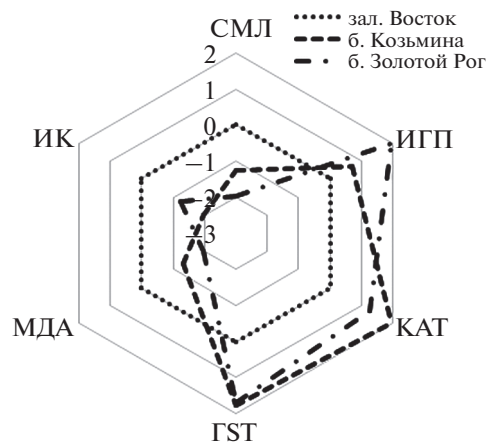


Рис. 2. Графическое представление интегрированного ответа биомаркеров в пищеварительной железе мидии *Mytilus trossulus* из разных акваторий. Обозначения биомаркеров, как в табл. 1.

2015). Известно, что дестабилизация мембран лизосом происходит в ответ на действие органических загрязнителей и тяжелых металлов (Lowe et al., 1995; Regoli et al., 1998; Moore, 2004). В результате повреждения мембран лизосом высвобождаются гидролитические ферменты и накопленные токсические вещества, что приводит к необратимым патологическим изменениям и гибели клетки (Kurz et al., 2008).

В соответствии с методом определения СМЛ приняты следующие критерии оценки физиологического состояния организмов: СМЛ ≥ 120 мин – здоровые организмы; $120 \text{ мин} > \text{СМЛ} \geq 50 \text{ мин}$ – находящиеся в состоянии компенсаторной адаптации; СМЛ < 50 мин – находящиеся в состоянии патологии (Martinez-Gómez et al., 2015).

Согласно этим критериям оценки, мидии из б. Золотой Рог испытывают высокий уровень стресса (патологическое состояние), а мидии из б. Козьмина и зал. Восток подвержены умеренному стрессу и находятся в состоянии компенсаторной адаптации.

Индекс генетического повреждения

Результаты оценки уровня повреждения молекулы ДНК показали, что в пищеварительной железе мидий из бухт Козьмина и Золотой Рог присутствовали ДНК-кометы, относящиеся к классам С3 (высокое повреждение) и С4 (экстремально высокое). Это свидетельствует о нарушении способности регуляторных систем клетки репарировать вызванные загрязнением повреждения ДНК (Bjelland, Seeberg, 2003). Можно предположить, что постепенное накопление повреждений в структуре молекулы ДНК и несостоятельность системы репарации, угнетенной действием антропогенного пресса, способны привести к возникновению ошибок в структуре ДНК, к появлению мутаций и гибели клеток у моллюсков, обитающих в бухтах Козьмина и Золотой Рог.

Биомаркеры окислительного стресса

По сравнению с мидиями из фонового зал. Восток, у мидий из загрязненных акваторий наблюдалась более высокая активность антиоксидантных ферментов. Такая реакция предполагает некоторые адаптивные и компенсаторные механизмы, действующие при хроническом загрязнении, и ранее была показана для *Mytilus galloprovincialis*, *Perna perna*, *Mytella guyanensis* и *Crenomytilus grayanus* (Bainy et al., 2000; Nasci et al., 2002; Torres et al., 2002; Бельчева и др., 2013; Benali et al., 2015).

Известно, что ответ фермента на действие токсических веществ демонстрирует тренд колоколообразной формы: сначала увеличение активности за счет активации синтеза, а затем ее уменьшение из-за усиления катаболизма и/или

прямого ингибиторного действия токсических веществ на молекулу фермента (Regoli, Principato, 1995; Frenzilli et al., 2004; Dagnino et al., 2007). В нашем случае активация GST и KAT у мидий из загрязненных акваторий, возможно, связана с формированием устойчивости к стрессовым условиям обитания.

Анализ содержания МДА в пищеварительной железе мидий показал, что его количество ниже у животных из загрязненных акваторий. На фоне увеличенной активности GST и KAT это также может отражать адаптацию к хроническому воздействию загрязняющих веществ. Аналогичные результаты были получены для *M. galloprovincialis* и *C. grayanus*, у которых в загрязненных акваториях активность антиоксидантных ферментов в пищеварительной железе и жабрах увеличилась, а содержание МДА не изменилось (Vox et al., 2007; Бельчева и др., 2013).

Возможно, такая защитная реакция компонентов антиоксидантной системы характерна для представителей семейства Mytilidae и свидетельствует об их лучшей приспособленности к существованию в условиях загрязнения окружающей среды. Известно, что у менее устойчивого к загрязнению японского гребешка *Chlamys farreri* в ответ на комплексное загрязнение среды обитания может происходить как активация, так и ингибирование антиоксидантных ферментов, а содержание продуктов перекисного окисления липидов в тканях увеличивается (Guo et al., 2017).

Индекс кондиции

Показатель “индекс кондиции” обычно используется в аквакультуре и экологическом мониторинге для оценки физиологического состояния мидий (Gagne et al., 2008; Benali et al., 2015). Рост, размножение и выживание двустворчатых моллюсков зависят от наличия достаточного запаса энергии в их организме. Воздействие загрязняющих веществ отрицательно сказывается на росте организма из-за высоких затрат энергии на процессы детоксикации вредных веществ (Nicholson, Lam, 2005). В связи с этим важность данного показателя особенно для быстрорастущей и короткоживущей мидии *M. trossulus* необходимо отметить.

Как правило, индекс кондиции у аборигенных и пересаженных в загрязненную акваторию мидий ниже, чем у моллюсков из условно чистой воды (Regoli et al., 1998; Guerlet et al., 2010). Однако известны и обратные примеры, что можно объяснить влиянием на ИК таких естественных факторов среды, как температура, доступность пищи и репродуктивный цикл (Vox et al., 2007; Benali et al., 2015).

Согласно нашим данным, ИК у *M. trossulus* из загрязненных бухт Козьмина и Золотой Рог был значимо ниже, чем у моллюсков из фоновой акватории зал. Восток. Очевидно, это связано с токсическим влиянием тяжелых металлов и других загрязнителей на стабильность мембраны лизосом органов пищеварительной системы моллюска, что приводит к низкому усвоению питательных веществ (Nicholson, 1999). На примере мтилиды *Perna viridis* из загрязненной акватории показаны цитопатологические изменения морфологии жабр и пищеварительной железы, приводящие к потере важных физиологических функций этих органов (Vasanthi et al., 2017). Таким образом, ИК связывает реакции биомаркеров клеточного, тканевого и организменного уровней биологической организации и в определенной мере отражает нарушения физиологических функций, вызванных загрязнением.

Интегрированный ответ биомаркеров

Все исследованные в данной работе биомаркеры показали ответ, который индуцирован или ингибирован относительно значений фоновой акватории. Пространственное расположение реакции биомаркеров в виде диаграммы (рис. 2) позволило визуализировать их ответ и чувствительность. Согласно результатам наших исследований, наиболее чувствительными биомаркерами являются стабильность мембран лизосом, индекс генетического повреждения, активность GST и индекс кондиции.

Полученные значения ИОБ для зал. Восток, бухт Козьмина и Золотой Рог составили соответственно 0, 6.53 и 9.14. Считается, что приближение ИОБ к значению 10 (существенное отклонение от нулевого значения) свидетельствует о сильном загрязнении водной среды (Sanchez et al., 2013). Следовательно, рассчитанный интегральный показатель подтверждает известную степень загрязнения выбранных акваторий, возрастающую в ряду зал. Восток < б. Козьмина < б. Золотой Рог.

Таким образом, предложенный подход объединения реакции биомаркеров достаточно эффективен для оценки качества водной среды и ранжирования акваторий по степени загрязнения. В дальнейшем в целях проведения масштабного мониторинга необходимо определить естественную вариативность базовых уровней чувствительных биомаркеров у широкого ряда видов гидробионтов из фоновых акваторий с различными гидрологическими характеристиками.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 19-35-90015 и при частичной поддержке госбюджетной темы НИР ТОИ ДВО РАН (№ 121-21500052-9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барышева В.С., Чернова Е.Н., Патрушева О.В. Загрязнение морской среды залива Восток Японского моря органическими веществами (2016–2018 гг.) // Вестн. ДВО РАН. 2019. № 2. С. 87–94.
- Бельчева Н.Н., Истомина А.А., Кудряшова Ю.В., Челомин В.П. Оценка качества морской среды по показателям окислительного стресса и содержанию тяжелых металлов в тканях мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae) // Биол. моря. 2013. Т. 39. № 4. С. 281–286.
- Бойченко Т.В. Химико-экологическая и микробиологическая оценка качества морских поверхностных вод южного Приморья: Автореф. дис. ... к. б. н. Владивосток. 2009. 24 с.
- Звягинцев А.Ю. Морское обрастание в северо-западной части Тихого океана. Владивосток: Дальнаука. 2005. 432 с.
- Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник 2016. М.: Наука. 2017. 285 с.
- Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник 2017. М.: Наука. 2018. 295 с.
- Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник 2018. М.: Наука. 2019. 287 с.
- Слободскова В.В., Кукла С.П., Челомин В.П. Анализ качества морской среды на основе определения генотоксичности ДНК клеток жабр приморского грешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1856) // Биол. моря. 2015. Т. 41. № 6. С. 457–460.
- Сокольникова Ю.Н., Трубецкая Е.В., Беленева И.А. и др. Флуоресцентный анализ реакций *in vitro* фагоцитоза как эффективный метод оценки активности гемцитов двустворчатого моллюска *Modiolus kurlensis* (Bernard, 1983) из фоновых и импактной акваторий // Биол. моря. 2015. Т. 41. № 2. С. 122–129.
- Чернова Е.Н. Изменение концентрации металлов в тканях мидии *Mytilus edulis* из Белого моря в ходе репродуктивного цикла // Биол. моря. 2010. Т. 36. № 1. С. 63–69.
- Al-Fanharawi A.A., Rabee A.M., Al-Mamoori A.M.J. Biochemical and molecular alterations in freshwater mollusks as biomarkers for petroleum product, domestic heating oil // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2018. V. 158. P. 69–77.
- Bainy A.C.D., Almeida E.A., Müller I.C. et al. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil // Mar. Environ. Res. 2000. V. 50. P. 411–416.

- Benali I., Boutiba Z., Merabet A., Chèvre N. Integrated use of biomarkers and condition indices in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for monitoring pollution and development of biomarker index to assess the potential toxic of coastal sites // Mar. Pollut. Bull. 2015. V. 95. № 1. P. 385–394.
- Bendell-Young L.I., Arifin Z. Application of a kinetic model to demonstrate how selective feeding could alter the amount of cadmium accumulated by the blue mussel (*Mytilus trossulus*) // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2004. V. 298. P. 21–33.
- Bjelland S., Seeberg E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation // Mutat. Res. 2003. V. 531. № 1–2. P. 37–80.
- Blanchette B., Fend X., Singh B.R. Marine glutathione S-transferases // Mar. Biotechnol. (NY). 2007. V. 9. № 5. P. 513–542.
- Box A., Sureda A., Galgani F. et al. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis* // Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol. 2007. V. 146. № 4. P. 531–539.
- Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // Methods Enzymol. 1978. V. 52. P. 302–310. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
- Chelomin V.P., Belcheva N.N. Alterations of microsomal lipid synthesis in gill cells of bivalve mollusk *Mizuhopecten yessoensis* in response to cadmium accumulation // Comp. Biochem. Physiol. C: Comp. Pharmacol. 1991. V. 99. P. 1–5.
- Dagnino A., Allen J.I., Moore M.N. et al. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index // Biomarkers. 2007. V. 12. № 2. P. 155–172.
- Damiens G., Gnassia-Barelli M., Loquès F. et al. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels // Chemosphere. 2007. V. 66. № 3. P. 574–583.
- Frenzilli G., Nigro M., Scarcelli V. et al. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon // Aquat. Toxicol. 2001. V. 53. № 1. P. 19–32.
- Frenzilli G., Bocchetti R., Pagliarecci M. et al. Time-course evaluation of ROS-mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment // Mar. Environ. Res. 2004. V. 58. № 2–5. P. 609–613.
- Gagne F., Burgeot T., Hellou J. et al. Spatial variations in biomarkers of *Mytilus edulis* mussels at four polluted regions spanning the Northern Hemisphere // Environ. Res. 2008. V. 107. № 2. P. 201–217.
- González-Fernández C., Albentosa M. et al. Effect of mussel reproductive status on biomarker responses to PAHs: Implications for large-scale monitoring programs // Aquat. Toxicol. 2016. V. 177. P. 380–394.
- Guerlet E., Vasseur P., Giamberini L. Spatial and temporal variations of biological responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2010. V. 73. № 6. P. 1170–1181.
- Guo R., Pan L., Ji R. A multi-biomarker approach in scallop *Chlamys farreri* to assess the impact of contaminants in Qingdao coastal area of China // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2017. V. 142. P. 399–409.
- Habig W.H., Jakoby W.B. Assay for differentiation of glutathione-S-transferases // Methods Enzymol. 1981. V. 77. P. 398–405.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine, 4th ed. Oxford: Oxford Univ. Press. 2007. 704 p.
- Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione transferases // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2005. V. 45. P. 51–88.
- Kurz T., Terman A., Gustafsson B., Brunk U.T. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1780. № 11. P. 1291–1303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.01.009>
- Lehtonen K.K., Turja R., Budzinski H., Devier M.H. An integrated chemical-biological study using caged mussels (*Mytilus trossulus*) along a pollution gradient in the Archipelago Sea (SW Finland, Baltic Sea) // Mar. Environ. Res. 2016. V. 119. P. 207–221.
- Lompré J.S., Malanga G., Gil M.N., Giarratano E. Multiple-biomarker approach in a commercial marine scallop from San Jose gulf (Patagonia, Argentina) for health status assessment // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2020. V. 78. № 3. P. 451–462.
- Lowe D.M., Fossato V.U., Depledge M.H. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: An *in vitro* study // Mar. Ecol.: Prog. Ser. 1995. V. 129. P. 189–196.
- Lushchak V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. // Aquat. Toxicol. 2011. V. 101. № 1. P. 13–30.
- Maria V.L., Bebianno M.J. Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo(a)pyrene and copper // Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. 2011. V. 154. № 1. P. 56–63.
- Markwell M.A., Haas S.M., Bieber L.L., Tolbert N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples // Anal. Biochem. 1978. V. 87. № 1. P. 206–210.
- Martínez-Gómez C., Bignell J., Lowe D. Lysosomal membrane stability in mussels // ICES Tech. Mar. Environ. Sci. 2015. V. 56. P. 41.
- Mitchellmore C.L., Chipman J.K. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay // Aquat. Toxicol. 1998. V. 41. P. 161–182.
- Moore M.N. Diet restriction induced autophagy: A lysosomal protective system against oxidative- and pollutant-stress and cell injury // Mar. Environ. Res. 2004. V. 58. P. 603–607.
- Nasci C., Nesto N., Monteduro R., Da Ros L. Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy) // Mar. Environ. Res. 2002. V. 54. P. 811–816.
- Nicholson S. Cytological and physiological biomarker responses from green mussels, *Perna viridis* (L.) trans-

- planted to contaminated sites in Hong Kong coastal waters // *Mar. Pollut. Bull.* 1999. V. 39. P. 261–268.
- Nicholson S., Lam P.K.S. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia) // *Environ. Int.* 2005. V. 31. № 1. P. 121–132.
- Pempkowiak J., Pazdro K., Kopecka J. et al. Toxicants accumulation rates and effects in *Mytilus trossulus* and *Nereis diversicolor* exposed separately or together to cadmium and PAHs // *J. Environ. Sci. Health, Part A: Environ. Sci. Eng. Toxic Hazard. Subst. Control.* 2006. V. 41. P. 2571–2586.
- Regoli F., Principato G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers // *Aquat. Toxicol.* 1995. V. 31. № 2. P. 143–164.
- Regoli F., Nigro M., Orlando E. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* // *Aquat. Toxicol.* 1998. V. 40. P. 375–392.
- Regoli F., Frenzilli G., Bocchetti R. et al. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment // *Aquat. Toxicol.* 2004. V. 68. P. 167–178.
- Sanchez W., Burgeot T., Porcher J.M. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2013. V. 20. P. 2721–2725.
- She Y.M., Narindrasorasak S., Yang S. et al. Identification of metal-binding proteins in human hepatoma lines by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry // *Mol. Cell. Proteomics.* 2003. V. 2. P. 1306–1318.
- Storey K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1996. V. 29. № 12. P. 1715–1733.
- Torres M.A., Testa C.P., Gaspari C. et al. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil // *Mar. Pollut. Bull.* 2002. V. 44. P. 923–932.
- Vasanthi L.A., Revathi P., Babu Rajendran R., Munuswamy N. Detection of metal induced cytopathological alterations and DNA damage in the gills and hepatopancreas of green mussel *Perna viridis* from Ennore Estuary, Chennai, India // *Mar. Pollut. Bull.* 2017. V. 117. № 1–2. P. 41–49.
- Vethaak A.D., Davies I.M., Thain J.E. et al. Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment // *Mar. Environ. Res.* 2017. V. 124. P. 11–20.
- Vieira C.E.D., Almeida M.S., Galindo B.A. et al. Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas // *Neotrop. Ichthyol.* 2014. V. 12. № 1. P. 153–164.
- Yoshinaga M., Ueki T., Michibata H. Metal binding ability of glutathione transferases conserved between two animal species, the vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea* and the schistosome *Schistosoma japonicum* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1770. P. 1413–1418.

Integrated Response of Biomarkers in the Assessment of the Quality of the Marine Environment on the Example of the Bivalve Mollusk *Mytilus trossulus* (Gould, 1850)

A. A. Istomina^a, A. A. Mazur^a, V. P. Chelomin^a, S. P. Kukla^a, V. V. Slobodskova^a, A. Yu. Zvyagintsev^b, Yu. V. Fedorets^a, O. A. Yelovskaya^a, and L. F. Kolosova^a

^aV.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

^bA.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

The possibility of using a battery of biomarkers – the lysosomal membrane stability (LMS), the genetic damage index (GDI), the activities of catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST), the level of malondialdehyde (MDA), and the condition index (CI) – was tested for the assessment of pollution in the marine environment. These characters were used to calculate the index reflecting integrated biomarker response (IBR). The obtained index confirmed the known degree of marine pollution that increases in a row Vostok Bay < Kozmina Bay < Golden Horn Bay.

Keywords: *Mytilus trossulus*, lysosomal membrane stability, genetic damage index, catalase, glutathione-S-transferase, condition index, integrated biomarker response