

УДК 594.1:577.15(262.5)

ВЛИЯНИЕ КРАТКОСРОЧНОЙ ГИПОКСИИ НА СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОГО КОМПЛЕКСА ЧЕРНОМОРСКОГО ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *CERASTODERMA GLAUCUM* (BRUGUIERE, 1789) (CARDIIDAE)

© 2021 г. О. Л. Гостюхина*

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь 299011, Россия

*e-mail: gostolga@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.07.2020 г.

После доработки 02.12.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2021 г.

Изучено влияние краткосрочной гипоксии (40 ч) на показатели антиоксидантного (АО) комплекса: активность глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, а также на уровень восстановленного глутатиона (GSH) и содержание активных продуктов тиобарбитуровой кислоты (ТБК) у черноморского двустворчатого моллюска *Cerastoderma glaucum* (Bruguiere, 1789) с высокой устойчивостью к окислительному стрессу. Исследованы гепатопанкреас, жабры и нога моллюска. Выявлена тканевая специфика реакций АО комплекса в условиях дефицита кислорода. Во всех тканях отмечено значительное снижение активности СОД. Увеличение уровня ТБК-активных продуктов и ресурса GSH было наибольшим в жабрах моллюска. В гепатопанкреасе и ноге моллюска существенно увеличилась активность ГП и каталазы. Полученные результаты отражают достаточно высокую адаптированность моллюска в целом к краткосрочной гипоксии.

Ключевые слова: гипоксия, антиоксидантный комплекс, ТБК-активные продукты, двустворчатые моллюски, *Cerastoderma glaucum*, Чёрное море

DOI: 10.31857/S0134347521050041

Гипоксия, или дефицит кислорода, — одно из самых распространенных явлений в Мировом океане. Ряд акваторий, в том числе Чёрное море, в настоящее время считаются постоянными гипоксическими зонами (Manduzio et al., 2005; Заика, Бондарев, 2010; Фокина и др., 2011; Woo et al., 2013; Khan et al., 2020). Гипоксия приводит к массовой гибели беспозвоночных и рыб, уменьшению их ареалов, влияет на структуру питания, миграции, процессы размножения и является причиной других негативных событий. Для гидробионтов дефицит кислорода — это мощный стрессорный фактор. Чтобы выжить в условиях гипоксии, морские животные выработали разнообразные биохимические, физиологические и поведенческие механизмы (Фокина и др., 2011; Welker et al., 2012, 2013; Woo et al., 2013; Regoli, Giuliani, 2014). Избыток кислорода в среде, как и его недостаток, усиливает образование активных форм кислорода (АФК) (Меньщикова и др., 2006; Welker et al., 2013). Антиоксидантный (АО) комплекс — одна из важнейших молекулярных систем для защиты организма от избытка АФК и окислительного стресса (ОС). Подчеркивается особая организация АО комплекса у морских организмов. Напри-

мер, устойчивые к гипоксии моллюски *Anadara* sp., *Mytilus* sp. и *Cerastoderma* sp. имеют сложную организацию АО системы, в которой велика защитная роль низкомолекулярных антиоксидантов, в первую очередь восстановленного глутатиона — GSH (Soldatov et al., 2014; Гостюхина, Андреев, 2018; Gostyukhina, 2020). Большую устойчивость толерантных к гипоксии моллюсков связывают преимущественно с эффективной регуляцией их АО защиты, индуцированной гипоксией (Woo et al., 2013; Hermes-Lima et al., 2015; Sui et al., 2017). Вы сказано предположение о наличии специфического взаимодействия между активностью ряда АО ферментов и содержанием каротиноидов в АО защите у моллюсков родов *Anadara* и *Cerastoderma* (Soldatov et al., 2017; Gostyukhina, Borodina, 2020). Выделяют ряд особых функциональных состояний АО комплекса двустворчатых моллюсков в зависимости от ткани, условий обитания, природы и степени окислительного стресса (Soldatov et al., 2014).

Гипоксия и аноксия нередко встречаются в придонных водах прибрежных зон и эстуариев (Woo et al., 2013). В Чёрном море гипоксия характерна для закрытых или полузакрытых бухт с за-

трудненным водообменом, а также для мелководных зон, где в глинистых илах в слое до 5 см бактерии активно продуцируют сероводород. Данные акватории являются эвтрофными районами с высокой вариабельностью температуры, солености и концентрации кислорода (Заика, Бондарев, 2010).

В связи с этим актуальны исследования реакций АО комплекса у донных зарывающихся моллюсков, таких как сердцевидка *Cerastoderma glaucum* (Bruguiere, 1789). Моллюски рода *Cerastoderma* – это массовые эврибионтные виды, типичные обитатели морских прибрежных акваторий, играющие заметную роль в донных биоценозах (Ревков, 2011). На примере *C. glaucum* (см.: Алемов, 2009) и *C. edule* (Freitas et al., 2012; Marques et al., 2016) показано, что моллюски данного рода хорошо адаптированы к условиям обитания, устойчивы к загрязнению, эвтрофикации и другим неблагоприятным факторам. Ранее были определены особенности АО комплекса и перекисного окисления липидов (ПОЛ) тканей у *C. glaucum* из Чёрного моря в естественных условиях. Установлено, что уровень ПОЛ у сердцевидки значительно ниже, а активность глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы выше, чем у массовых видов двустворчатых моллюсков Чёрного моря *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) и *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) (Gostyukhina, 2020; Gostyukhina, Andreenko, 2020). Это указывает на конститутивно более высокую активность АО системы сердцевидки по сравнению с таковой у моллюсков данных видов и, очевидно, способствует высокой адаптированности *C. glaucum* к обитанию в условиях с частыми флуктуациями параметров среды, в первую очередь уровня кислорода.

Цель настоящей работы – выявить особенности реакций системы АО защиты в тканях черноморского двустворчатого моллюска *C. glaucum* в условиях краткосрочной гипоксии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования служили взрослые особи черноморского двустворчатого моллюска *Cerastoderma glaucum* (семейство Cardiidae). Моллюсков размером 30–32 мм собирали в мае 2018 г. на мелководном участке прибрежной зоны б. Казачья (район Севастополя, Чёрное море) на глубине 0.5–0.7 м. После транспортировки для снятия стресса животных помещали на 2 сут в аквариумы объемом 50 л с проточной морской водой. Температура воды в аквариумах, как и в море, составляла $18.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$, соленость – 17–18‰. Затем моллюсков разделили на 3 группы – контрольную и 2 опытные. Действию гипоксии одновременно подвергались обе экспериментальные группы моллюсков (по 24 особи в каждом опытном аквариуме).

Животных контрольной группы содержали при 6.4–6.9 мг $\text{O}_2/\text{л}$ – это нормальный уровень кислорода в воде, близкий к природному в месте сбора. Моллюски из опытной группы находились в условиях гипоксии (0.8–0.9 мг $\text{O}_2/\text{л}$) в течение 40 ч. Концентрацию кислорода в воде измеряли с помощью люминесцентного оксиметра HACH LDO 101 и снижали путем барботажа азотом в течение 4 ч; после достижения необходимой концентрации в воду помещали моллюсков опытных групп. Чтобы исключить контакт с кислородом, животных опытных групп содержали в емкостях с закрытыми крышками. Длительность экспозиции определяли с момента начала гибели моллюсков.

Плотность посадки моллюсков составляла 24 особи на 50 л воды. Животных не кормили, так как они фильтровали природную морскую воду, содержащую пищевые частицы. Для удаления метаболитов воду в аквариумах меняли каждые 12 ч (всего 3 раза в течение 40 ч). В аквариум с контрольной группой моллюсков наливали свежую морскую воду, в опытные аквариумы – новую воду, барботированную азотом.

Гепатопанкреас, жабры и ногу выделяли и хранили при температуре минус 80°C . В день работы ткани гомогенизировали при температуре $0\text{--}4^\circ\text{C}$ на ледяной бане с ледяным фосфатным буфером (50 мМ, pH 7.2) (Welker et al., 2012). Для получения супернатантов гомогенаты тканей центрифугировали при 3200 g в течение 15 мин при 4°C с помощью рефрижераторной центрифуги К-23Д (Германия).

Активность ГП определяли по накоплению окисленного глутатиона (260 нм) (Paglia, Valentine, 1967). В реакционную среду (фосфатный буфер pH 7.4, 0.3 М; 2.5 мМ раствор восстановленного глутатиона; 1.8 мМ раствор пероксида водорода) вносили супернатант. Спустя 2 мин реакцию останавливали 10% раствором трихлоруксусной кислоты. Активность ГР оценивали по уменьшению содержания НАДФН (Marques et al., 2016). В среду (фосфатный буфер pH 8.0, 0.05 М; 1 мМ ЭДТА; 7.5 мМ окисленного глутатиона и 1.2 мМ НАДФН) добавляли супернатант и измеряли экстинкцию при 340 нм. Активность каталазы оценивали по реакции с молибдатом аммония (Goth, 1991): к смеси фосфатного буфера (pH 8.0, 0.05 М) и 1.8 мМ пероксида водорода добавляли супернатант, реакцию останавливали 4% раствором молибдата аммония. Экстинкцию желтоокрашенного продукта измеряли при 410 нм. Активность СОД определяли по степени ингибирования восстановления нитросинего тетразолия при длине волны 540 нм (Nishikimi et al., 1972). В среду (фосфатный буфер pH 7.8, 0.05 М; 1 мМ нитросинего тетразолия; 0.1 мМ феназин метасульфата) вносили супернатант и запускали реакцию 1 мМ раствором НАДН. Регистрировали экстинкцию при 560 нм.

Таблица 1. Показатели антиоксидантного комплекса и перекисного окисления липидов в тканях двустворчатого моллюска *Cerastoderma glaucum* в условиях краткосрочной гипоксии (40 ч)

Показатель	Гепатопанкреас		Жабры		Нога	
	контроль	гипоксия	контроль	гипоксия	контроль	гипоксия
ТБК-активные продукты, мкмоль МДА/г ткани	26.1 ± 3.7	39.5 ± 5.1*	25.9 ± 4.3	49.5 ± 9.8*	17.7 ± 3.4	29.9 ± 4.7*
Содержание глутатиона, мкг/г ткани	131.5 ± 28.3	326.6 ± 53.7**	60.1 ± 3.7	287.7 ± 39.8***	119.9 ± 16.5	196.1 ± 57.4*
Активность ГП, мкмоль GSSG/мин/мг белка	72.8 ± 8.8	196.4 ± 13.6**	46.1 ± 4.9	44.6 ± 5.5	18.8 ± 1.8	58.5 ± 7.7**
Активность ГР, мкмоль НАДФН/мин/мг белка	584.7 ± 80.6	610.0 ± 78.4	799.3 ± 127.2	879.5 ± 222.9	263.4 ± 44.1	447.9 ± 58.9*
Активность каталазы, мкмоль H ₂ O ₂ /мин/мг белка	12.8 ± 2.6	104.7 ± 16.1***	33.5 ± 5.4	61.4 ± 17.6*	15.9 ± 2.2	72.8 ± 35.6**
Активность СОД, мкмоль НАДН/мин/мг белка	3626.3 ± 580.2	820.7 ± 124.9***	10108.9 ± 2018.5	1412.9 ± 277.0***	6021.3 ± 1428.3	1849.7 ± 630.8**

Примечание. По сравнению с контрольными значениями отличия достоверны при: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; $n = 24$.

Активность ферментов определяли при температуре $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. О содержании восстановленного глутатиона (GSH) судили по реакции с аллоксановым реактивом. Гомогенаты готовили отдельно на основе 5% метафосфорной кислоты (Путилина, 1982). Интенсивность ПОЛ оценивали по уровню продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов), при длине волны 532 нм (Ohkawa et al., 1979). Содержание белка определяли по методу Лоури. Экстинкцию измеряли на спектрофотометре СФ-2000. Статистическая обработка цифрового материала выполнена с использованием стандартных компьютерных программ Past 3 и Grapher-7. Характер распределения данных в выборках определяли по W-критерию Шапиро–Уилка. Большая часть анализированных выборок (показатель/ткань) имела распределение, отклоняющееся от нормального, поэтому для оценки достоверности полученных различий использовали U-критерий Манна–Уитни. Количество особей в каждой группе составляло 24.

Рассчитывали среднее арифметическое, среднее квадратичное отклонение и ошибку среднего. Различия считали статистически достоверными при значении $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наиболее выраженное увеличение уровня ТБК-активных продуктов при гипоксии зарегистрировано в жабрах моллюска – в 1.9 раза ($p \leq 0.05$); в гепатопанкреасе и ноге оно было меньше – в 1.5–1.7 раза ($p \leq 0.05$) (табл. 1). Рост показателей антиоксидантной глутатионовой системы (АГС) при гипоксии выявлен во всех тканях: в гепатопанкреасе и ноге уровень GSH увеличился соответственно в 2.5 и 1.6 раза ($p \leq 0.05$), активность ГП возросла в 2.7 и 3.1 раза ($p \leq 0.01$), а активность ГР в ноге увеличилась в 1.7 раза ($p \leq 0.05$). Наи-

большее увеличение содержания GSH выявлено в жабрах – в 4.8 раза ($p \leq 0.001$). Изменения в системе ключевых АО ферментов были следующими. Активность каталазы в гепатопанкреасе и ноге увеличилась соответственно в 8.1 и 4.6 раза ($p \leq 0.001$). Однако активность СОД в этих же тканях снизилась соответственно в 4.4 и 3.3 раза ($p \leq 0.01$). В жабрах активность каталазы увеличилась всего в 1.8 раза ($p \leq 0.05$), однако активность СОД снизилась в 7.2 раза ($p \leq 0.001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень перекисного окисления липидов. Гипоксия в течение 40 ч привела к росту уровня ПОЛ во всех тканях моллюска, наибольшее увеличение отмечено в жабрах. Усиление процессов ПОЛ может быть связано с рядом причин. Как известно, при дефиците кислорода нарушается работа митохондрий, стимулируются генерация АФК, повреждение ДНК, белков и липидов (Фокина и др., 2011; Welker et al., 2013), меняется АО активность и может усиливаться ОС (Abele, Puntarulo, 2004; Кулинский, Колесниченко, 2009).

При гипоксии происходит активное автоокисление многих белков (Sokolov et al., 2019). Из некоторых белков высвобождаются ионы железа, что активирует синтез АФК. Например, в реакции Фентона образуется высокоактивный гидроксильный радикал. Этому способствует и снижение pH среды при переходе к анаэробному обмену (Abele-Oeschger, Oeschger, 1995).

Увеличение содержания ТБК-активных продуктов (МДА) во всех исследованных тканях *Cerastoderma glaucum* при гипоксии, вероятно, связано и с окислением мембранных липидов, а именно полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Как известно, благодаря большому числу ненасыщенных связей ПНЖК служат основным субстратом ПОЛ (Меньшикова и др.,

2006). Поэтому их преимущественное окисление на фоне роста уровня АФК может способствовать усилению ПОЛ у моллюсков при гипоксии. Повышение количества продуктов ПОЛ (МДА) при дефиците кислорода отмечено и у других двустворчатых моллюсков: после пребывания в течение 24 ч на воздухе в гепатопанкреасе и жабрах мидии *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Almeida et al., 2005), а также мидии *Mytilus coruscus* (через 48–72 ч при 2 мг O_2 /л) (Sui et al., 2017) и мидии *Geukensia demissa* (4–8 сут при 2.5% O_2) (Khan, Ringwood, 2016). Подобные реакции выявлены и у некоторых брюхоногих моллюсков: после аноксии (6 сут) у *Littorina kurila* (Linnaeus, 1758) (Istomina et al., 2013) и после 30 ч на воздухе в гепатопанкреасе *L. mandschurica* (Schrenk, 1861) (Истомина и др., 2011а).

Антиоксидантный комплекс. Как следует из результатов, реакцией на гипоксию в тканях сердцевидки стало увеличение большинства АО показателей. Снизилась только активность СОД. В целом это указывает на активацию АО защиты всех изученных тканей моллюска в ответ на гипоксию.

Состояние антиоксидантной глутатионовой системы. В условиях гипоксии реакция АГС в исследованных тканях сердцевидки различалась. Тканеспецифичность ответной реакции, вероятно, обусловлена конститутивными чертами АО системы моллюсков в связи с их разными эколого-физиологическими особенностями (Солдатов и др., 2010; Истомина и др., 2011б). Донный зарывающийся моллюск *C. glaucum*, очевидно, обладает своей спецификой при адаптации к гипоксии. Существенное увеличение активности ГП и уровня GSH в гепатопанкреасе и ноге сопровождалось либо неизменной активностью ГР (гепатопанкреас), либо ростом ее активности (нога). Это указывает на активное участие GSH как кофактора в работе ГП, так как активность ГП и скорость инактивации АФК напрямую зависят от содержания в клетке GSH (Кулинский, Колесниченко, 2009). В жабрах моллюска, напротив, при гипоксии отмечено увеличение лишь ресурса GSH, уровень которого здесь был выше, чем в других исследованных тканях. Это может быть связано с лучшей обеспеченностью жабр кислородом по сравнению с таковой других тканей. Жабры как орган дыхания и фильтрационного питания испытывают высокую кислородную нагрузку, поэтому требуется более эффективная АО защита, которую могут обеспечить, в первую очередь, низкомолекулярные антиоксиданты. Среди них наиболее важен глутатион. Известно, что GSH как конъюгирующий агент способен осуществлять самостоятельное АО действие в отношении широкого ряда АФК – синглетного кислорода, супероксидного анион-радикала (СОАР), а также многих токсикантов (Regoli, Giuliani, 2014; Trevisan et al., 2016). Вероятно, это позволяет обеспечить в жабрах наиболее быстрый и эффективный АО ответ при развитии окислительного стресса. Непосредственное участие GSH в инактивации

АФК особенно важно для жаберной ткани как одной из наиболее уязвимых для АФК в силу специфики ее структуры и функции. Жабры служат важным глутатион-зависимым барьером для защиты моллюсков от окислительного стресса (Trevisan et al., 2016).

Ранее было показано, что роль антиоксидантной глутатионовой системы велика у *C. glaucum* и в естественных условиях. В частности, уровень ПОЛ в тканях данного моллюска существенно ниже, чем в тканях анадары и мидии, а активность ГП (гепатопанкреас, жабры) и ГР (все ткани) выше (Gostyukhina, 2020). Это свидетельствует о сравнительно более высокой активности АГС у *C. glaucum* и отражает высокую адаптированность моллюска к среде с частым дефицитом кислорода. Наличие конститутивно активной антиоксидантной системы считают одним из важных факторов устойчивости водных животных к ОС (Welker et al., 2013). Полученные результаты согласуются и с АО стратегией у других моллюсков, устойчивых к ОС. Известно, что в АО защите *Anadara* sp. и *Mytilus* sp. также велика роль GSH (Гостюхина, Андреев, 2018; Gostyukhina, 2020). Такие антиоксиданты меньше зависят от источников энергии и наличия пластических ресурсов в клетке (Меньшикова и др., 2006). Высокая активность АГС, вероятно, дает *C. glaucum* конкурентные преимущества для выживания в донных биотопах Чёрного моря.

Супероксиддисмутаза и каталаза. Влияние гипоксии привело к росту активности каталазы, но к снижению активности СОД в исследованных тканях. Серцевидки как бентосные моллюски эволюционно адаптированы к частому недостатку кислорода (Freitas et al., 2012; Marques et al., 2016). Активация каталазы во всех тканях, вероятно, обусловлена необходимостью срочного “аварийного” ответа на увеличение уровня ПОЛ и АФК, в том числе H_2O_2 . Основным источником H_2O_2 в гемолимфе моллюсков при гипоксии является аутоокисление дыхательного пигмента (Abele-Oeschger, Oeschger, 1995). Каталаза, очевидно, играет одну из ключевых ролей в адаптации моллюска к гипоксии. Подобный тип ответных АО реакций особенно важен для моллюсков, которые постоянно обитают в толще донных осадков и не способны избегать неблагоприятных условий.

Снижение активности СОД может быть связано с двумя основными причинами. Известно, что адаптация моллюсков к ОС при гипоксии может протекать путем избирательной активации одного из ключевых АО ферментов (Welker et al., 2012, 2013). В нашем исследовании у *C. glaucum* отмечено увеличение активности каталазы, но снижение активности СОД. У спизулы *Spisula sachalinensis* наблюдали обратную картину (Истомина и др., 2011б). Эти моллюски обитают на дне, периодически зарываясь в слой донных осадков, и испытывают гипоксические условия. Вероятно, увеличение активности одного из ключевых АО

ферментов (СОД или каталазы) эффективно противодействует ОС при гипоксии. Однако нельзя исключить снижение активности СОД в тканях *C. glaucum* вследствие более высокой, чем у каталазы, чувствительности этого фермента к дефициту кислорода и, как результат, его частичной инактивации. Вероятно, при непродолжительной гипоксии увеличение активности каталазы, а также ГП и уровня GSH у *C. glaucum* обеспечивает достаточную АО защиту. В то же время снижение активности СОД может компенсироваться существенным увеличением GSH, что и было отмечено нами. Известно, что глутатион способен непосредственно инактивировать СОАР (Меньщикова и др., 2006), отчасти дублируя функцию СОД. Это может дать преимущество в скорости обезвреживания СОАР и экономии ресурсов в условиях снижения уровня белка при гипоксии (Welker et al., 2012). Важная совместная АО роль СОД и глутатиона отмечена также у моллюсков *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) и *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) (Бельчева и др., 2016). У анадары *Anadara kagoshimensis*, обитающей в донных осадках, как и у *C. glaucum*, высокий ресурс GSH сочетается с низкой активностью СОД, и наоборот (Гостюхина, Андреевко, 2018).

Сравнение активности СОД при гипоксии у двустворчатого моллюска *Astarte borealis* (Schumacher, 1817) и аннелиды *Arenicola marina* (Linnaeus, 1758) показало, что у двустворчатого моллюска в отличие от аннелиды активность СОД уменьшалась (Abele-Oeschger, Oeschger, 1995). Поскольку в жидкостях организмов этих животных каталаза, инактивирующая перекись водорода, отсутствует, их защиту обеспечивают такие АО ферменты, как ГР и СОД. Однако, если у *A. marina* активность СОД не была затронута гипоксией, то у *A. borealis*, напротив, при гипоксии активность СОД гемолимфы существенно снижалась. Это отражает разные АО стратегии гидробионтов в связи с их эколого-физиологической спецификой.

Возможно, в ответ на гипоксию и другие виды ОС у моллюсков происходит избирательная активация тех или иных компонентов АО комплекса. Это может быть обусловлено как конститутивными особенностями вида, так и адаптациями к конкретным условиям обитания. В частности, моллюски, испытывающие частую смену параметров среды, могут быть лучше адаптированы и/или преадаптированы к таким условиям. У брюхоногого моллюска *Littorina kurila* (Middendorff, 1848) в естественных условиях отмечена более высокая АО активность, чем у *Littorina squalida* (Broderip, 1829) (Istomina et al., 2013). Авторы связывают это с обитанием *L. kurila* на литорали, что приводит к постоянным изменениям в АО системе даже в течение суток, тем самым “тренируя” АО систему. Отдельно подчеркивается роль каталазы, так как увеличение её активности во время отлива сопровождалось снижением уровня ПОЛ. Это подтверждает гипотезу о преадаптации АО

комплекса при переходе от гипоксии к нормоксии (Hermes-Lima, Zenteno-Savín, 2002). Возможно, данные процессы в том числе обусловили более высокую активность каталазы у особей *C. glaucum*, подвергшихся гипоксии, чем у животных из контрольной группы.

Считается, что окислительный стресс при гипоксии может быть уменьшен путем модуляции активности одного или нескольких АО компонентов. При этом важность какого-либо конкретного АО фермента не установлена (Истомина и др., 2011б; Welker et al., 2012, 2013). Предполагаем, что выявленный нами рост активности каталазы, ГП и уровня GSH у сердцевидки связан с их ключевым АО действием при гипоксии.

Показано, что моллюски с разными эколого-физиологическими особенностями различаются по реакции их АО систем на гипоксию. У видов, обитающих в относительно постоянных условиях среды, сравнительно постоянный уровень АО активности. Так, в тканях двустворчатого моллюска *C. grayanus* и брюхоногого моллюска *Tegula rustica* (Gmelin, 1791) активность каталазы, СОД и ГР при гипоксии не изменялась (Истомина и др., 2011б). Авторы объясняют это неспособностью защитных систем данных моллюсков в стабильных условиях обитания обеспечить быстрый ответ на дефицит кислорода. Вероятно, основную роль в АО защите от ОС у этих моллюсков играют низкомолекулярные антиоксиданты. У таких моллюсков, как зарывающийся в грунт двустворчатый моллюск *S. sachalinensis* или обитающая в зоне прилива-отлива гастропода *L. mandschurica*, выявлены рост активности АО ферментов (ГР, СОД) (Истомина и др., 2011б) или же конститутивно более высокая АО активность, чем у близких видов, не испытывающих частых флуктуаций параметров среды (Istomina et al., 2013). Данные особенности АО системы этих моллюсков способствуют формированию у них преадаптации к ОС при колебании уровня кислорода в среде. Возможно, выявленные нами реакции АО комплекса *C. glaucum* также связаны с преадаптацией к ОС. Обитание в донных биоценозах со слабым перемешиванием вод, а также накопление поллютантов и биогенных элементов связано с недостатком кислорода в среде. Вероятно, моллюск может быть преадаптирован к дефициту кислорода. Выявленные нами реакции в тканях *C. glaucum* отражают усиление АО защиты моллюска в ответ на краткую гипоксию. Это подтверждает полученные ранее данные о высокой адаптированности моллюсков рода *Cerastoderma* к неблагоприятным факторам среды в донных биотопах (Freitas et al., 2012; Marques et al., 2016; Gostyukhina, 2020; Gostyukhina, Andreenko, 2020).

Таким образом, реакции АО системы сердцевидки *C. glaucum* на краткосрочную гипоксию имели тканевую специфичность. Повышение уровня ПОЛ в 1.5–1.9 раза отмечено во всех тканях. Наибольший рост содержания продуктов ПОЛ и ре-

сурса глутатиона зарегистрирован в жабрах моллюска. В гепатопанкреасе и ноге существенно увеличивалась активность глутатионпероксидазы и каталазы. Во всех исследованных тканях активность СОД заметно снижалась. Наибольший вклад в АО защиту *C. glaucum* при гипоксии вносят компоненты глутатионовой системы и каталаза. Эти реакции отражают высокую адаптированность моллюска в целом к гипоксии, характерной для донных биотопов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа подготовлена по теме государственного задания ФИЦ ИнБЮМ РАН “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом”, номер гос. регистрации АААА-А18-11802149 00 93-4 от 14.02.2018.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алемов С.В. Оценка экологического качества портовых акваторий региона Севастополя по характеристикам сообществ макрозообентоса // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа. 2009. № 18. С. 19–29.
- Бельчева Н.Н., Довженко Н.В., Истомина А.А. и др. Антиоксидантная система мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) и приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) (Mollusca: Bivalvia) // Биол. моря. 2016. Т. 42. № 5. С. 375–380.
- Гостюхина О.Л., Андреев Т.И. Ферментное и низкомолекулярное звено антиоксидантного комплекса двух видов черноморских моллюсков с разной устойчивостью к окислительному стрессу: *Mytilus galloprovincialis* Lam. и *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // Журн. общ. биол. 2018. Т. 79. № 6. С. 482–492.
- Заика В.Е., Бондарев И.П. Донная гипоксия на шельфе и аноксия глубоководной бентали в Чёрном море // Мор. экол. журн. 2010. Т. 9. № 2. С. 59–61.
- Истомина А.А., Довженко Н.В., Бельчева Н.Н., Челомин В.П. Влияние меди на антиоксидантную систему брюхоногих моллюсков *Littorina mandschurica* и *Tegula rustica* в условиях гипоксии // Вестн. Санкт-Петербург. ун-та. 2011а. Сер. 3. Вып. 4. С. 25–31.
- Истомина А.А., Довженко Н.В., Бельчева Н.Н., Челомин В.П. Активность антиоксидантных ферментов у разных видов моллюсков в условиях гипоксии/аноксии // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2011б. Т. 13. № 1(5). С. 1106–1108.
- Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // Биомед. химия. 2009. Т. 55. № 3. С. 255–277.
- Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. 2006. М.: Слово. 556 с.
- Путилина Ф.Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях // Методы биохимических исследований. Л.: Изд-во ЛГУ. 1982. С. 183–186.
- Ревков Н.К. Макрозообентос украинского шельфа Чёрного моря // Промысловые биоресурсы Чёрного и Азовского морей. Севастополь. ЭКОСИ-Гидрофизика. 2011. С. 140–162.
- Солдатов А.А., Андреев Т.И., Головина И.В. Особенности организации тканевого метаболизма у моллюсков с различной толерантностью к внешней гипоксии // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2010. Т. 46. № 4. С. 284–290.
- Фокина Н.Н., Нефедова З.А., Немова Н.Н. Биохимические адаптации морских двустворчатых моллюсков к аноксии (Обзор) // Тр. Карельского НЦ РАН. 2011. № 3. С. 121–130.
- Abele D., Puntarulo S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish // Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol. 2004. V. 138. № 4. P. 405–415.
- Abele-Oeschger D., Oeschger R. Hypoxia-induced autoxidation of haemoglobin of the benthic invertebrates *Arenicola marina* (Polychaeta) and *Astarte borealis* (Bivalvia) and the possible effects of sulfide // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1995. V. 187. P. 63–80.
- Almeida E.A., Bairy A.C.D., Dafre A.L. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2005. V. 318. P. 21–30.
- Gostyukhina O.L. Specific Features of Antioxidant Glutathione System in Tissues of the Black Sea Bivalve Mollusk *Cerastoderma glaucum* (Bruguiere, 1789) // Inland Water Biol. 2020. V. 13. № 2. P. 267–273.
- Gostyukhina O.L., Andreenko T.I. Superoxide Dismutase and Catalase Activities in Tissues of the Black Sea Bivalve Mollusks *Cerastoderma glaucum* (Bruguiere, 1789), *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) and *Mytilus galloprovincialis* Lam. as Related to Adaptation to Their Habitats // J. Evol. Biochem. Physiol. 2020. V. 56. № 2. P. 113–124.
- Gostyukhina O.L., Borodina A.V. Carotenoid Content and Antioxidant Status in Tissues of the Eurybiontic Bivalve Mollusk *Cerastoderma glaucum* (Cardiidae) // J. Evol. Biochem. Physiol. 2020. V. 56. № 3. P. 195–206.
- Goth L.A. Simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range // Clin. Chim. Acta. 1991. V. 196. P. 143–152.
- Freitas R., Costa E., Velez C. et al. Looking for suitable biomarkers in benthic macroinvertebrates inhabiting coastal areas with low metal contamination: Compari-

- son between the bivalve *Cerastoderma edule* and the Polychaete *Diopatra neapolitana* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2012. V. 75. P. 109–118.
- Hermes-Lima M., Zenteno-Savín T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress // *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 2002. V. 133. № 4. P. 537–556.
- Hermes-Lima M., Moreira D.C., Rivera-Ingraham G.A. et al. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: revisiting the proposal two decades later // *Free Radicals. Biol. Med.* 2015. V. 89. P. 1122–1143.
- Istomina A.A., Belcheva N.N., Chelomin V.P. Antioxidant system of the intertidal mollusk *Littorina kurila* in its natural habitat // *J. Environ. Sci. Eng. A.* 2013. V. 2. № 12. P. 713–718.
- Khan F.U., Hu M., Kong H. et al. Ocean acidification, hypoxia and warming impair digestive parameters of marine mussels // *Chemosphere.* 2020. V. 256. Epub 2020 May 16.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127096>
- Khan B., Ringwood A.H. Cellular biomarker responses to hypoxia in eastern oysters and Atlantic ribbed marsh mussels // *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 2016. V. 546. P. 123–133.
- Manduzio H., Rocher B., Durand F. et al. The point about oxidative stress in mollusks // *Invertebr. Survival J.* 2005. V. 91. № 2. P. 91–104.
- Marques A., Piló D., Araújo O. et al. Propensity to metal accumulation and oxidative stress responses of two benthic species (*Cerastoderma edule* and *Nephtys hombergii*): are tolerance processes limiting their responsiveness? // *Ecotoxicology.* 2016. V. 25. P. 664–676.
- Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972. V. 46. P. 849–854.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* 1979. V. 95. № 1. P. 351–358.
- Paglia D., Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // *J. Lab. Clin. Med.* 1967. V. 70. P. 158–169.
- Regoli F., Giuliani M. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms // *Mar. Environ. Res.* 2014. V. 93. P. 106–117.
- Sokolov E., Markert S., Hinzke T. et al. Effects of hypoxia-reoxygenation stress on mitochondrial proteome and bioenergetics of the hypoxia-tolerant marine bivalve *Crassostrea gigas* // *J. Proteomics.* 2019. V. 194. P. 99–111.
- Soldatov A.A., Gostyukhina O.L., Golovina I.V. Functional states of antioxidant enzymatic complex of tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. under conditions of oxidative stress // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2014. V. 50. № 3. P. 206–214.
- Soldatov A.A., Gostyukhina O.L., Borodina A.V., Golovina I.V. Glutathione antioxidant complex and carotenoid composition in tissues of the bivalve mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2017. V. 53. № 4. P. 289–297.
- Sui Y., Hu M., Shang Y. et al. Antioxidant response of the hard shelled mussel *Mytilus coruscus* exposed to reduced pH and oxygen concentration. 2017 // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* V. 137. P. 94–102.
- Trevisan R., Mello D., Delapiedra G. et al. Gills as a glutathione-dependent metabolic barrier in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Absorption, metabolism and excretion of a model electrophile // *Aquat. Toxicol.* 2016. V. 173. P. 105.
- Welker A., Campos E., Cardoso L., Hermes-Lima M. Role of catalase on the hypoxia/reoxygenation stress in the hypoxia-tolerant Nile tilapia // *Am. J. Physiol.: Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2012. V. 302. P. 1111–1118.
- Welker A.F., Moreira D.C., Campos E.G., Hermes-Lima M. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability // *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.* 2013. V. 165. № 4. P. 384.
- Woo S., Denis V., Won H. et al. Expressions of oxidative stress-related genes and antioxidant enzyme activities in *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mollusca) exposed to hypoxia // *Zool. Stud.* 2013. V. 52. № 15.

Short-Term Hypoxia Effect on the State of the Antioxidant Complex in the Black Sea Bivalve Mollusk *Cerastoderma glaucum* (Bruguiere, 1789) (Cardiidae)

O. L. Gostyukhina

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS, Sevastopol 299011, Russia

Short-term hypoxia (40 h) effect on the state of the antioxidant complex was studied in the Black Sea cockle *Cerastoderma glaucum* (Bruguiere, 1789) (Bivalvia: Cardiidae) with a high tolerance to oxidative stress. The activity of glutathione peroxidase (GP), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD) and catalase, the level of TBA-reactive products and reduced glutathione (GSH) were studied in the hepatopancreas, gills, and foot of the mollusk. Tissue specificity of antioxidant complex reactions was revealed under hypoxia conditions. SOD activity dropped under hypoxia in all tissues studied. The greatest increase in TBA-reactive products and in the glutathione level was recorded in the mollusk gills. The GP and catalase activities increased significantly in the *C. glaucum* hepatopancreas and foot. In general, these reactions reflect a rather high adaptability of the mollusk to short-term hypoxia.

Keywords: hypoxia, antioxidant complex, TBA-reactive products, bivalves, *Cerastoderma glaucum*, the Black Sea