

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 594-14

**ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА
В ТКАНЯХ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *Anodonta cygnea* (L., 1758)**

© 2020 г. А. С. Соколова^а, *, Д. В. Микряков^а, **, В. Р. Микряков^а

^аИнститут биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
пос. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., Россия

*e-mail: Aleksandrasokol@rambler.ru

**e-mail: daniil@ibiw.ru

Поступила в редакцию 04.08.2017 г.

После доработки 08.12.2018 г.

Принята к публикации 24.12.2018 г.

Исследован уровень перекисного окисления липидов в гемолимфе, гепатопанкреасе, жабрах и мышцах двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea* (L., 1758) разного возраста. Выявлена зависимость содержания малонового диальдегида в гемолимфе и исследуемых тканях от возраста моллюска и структурно-функциональной характеристики тканей. У более старых особей, по сравнению с молодыми, в гепатопанкреасе, жабрах и гемолимфе увеличивается содержание малонового диальдегида, в тканях ноги — уменьшается.

Ключевые слова: моллюск *Anodonta cygnea*, возраст, малоновый диальдегид, перекисное окисление липидов, окислительный стресс, гемолимфа, гепатопанкреас, жабры, мышцы

DOI: 10.31857/S0320965220010167

Один из конечных продуктов ПОЛ — МДА. Образование МДА происходит в результате свободно-радикального окисления полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов клеточных мембран АФК (Барабой и др., 1992; Владимиров и др., 1991; Зенков и др., 2001; Канунго, 1982; Меншикова и др., 2008; Тарусов, 1957; Nagman, 1956). МДА — высокотоксическое соединение, вызывающее полимеризацию белков, разрушение ДНК, сульфгидрильных антиоксидантов, модификацию липидного слоя клеточных мембран. Как следствие, происходит подавление генерации высокоэнергетических соединений митохондриями, в частности, аденозинтрифосфата, необходимого для обеспечения жизнедеятельности клеток, темпов роста, развития целостного организма (Журавлев, Пантюшенко, 1989; Кольтовер, 2000; Метлицкий и др., 1984; Хэм, Кормак, 1982).

В настоящее время огромное внимание уделяется изучению изменения содержания МДА в организме и оценке влияния АФК на метаболические процессы, структурную целостность клеток, тканей и органов, появление патологий и преждевременное старение (Бельчева и др., 2014; Зенков и др., 2001; Канунго, 1982; Меншикова и др., 2008;

Скулачев, 2009; Тодоров И., Тодоров Г., 2003; Физиологические..., 1982; Abele et al., 2009; Hole et al., 1995).

В стационарных условиях во всех клетках живого организма в небольших количествах постоянно образуются свободные радикалы или АФК. Они участвуют в процессах клеточного метаболизма, и их негативное влияние на клетки нейтрализуется ферментными и неферментными антиоксидантами или антиоксидантным ферментным комплексом (Солдатов и др., 2007). При воздействии негативных стресс-факторов происходит активация процессов окислительного стресса, связанная с избыточным накоплением АФК, и, как следствие, нарушение динамического равновесия окислительно-восстановительного баланса (или редокс-потенциала), обеспечиваемое прооксидант-антиоксидантной системой (Меньшикова и др., 2008).

Исследования по изучению влияния окислительного стресса на уровень ПОЛ по данным содержания МДА в тканях моллюсков в основном проводят на морских видах, которые используются в качестве биомаркеров в экологических и эколоксикологических исследованиях для оценки качества условий среды обитания и характера реагирования на токсиканты (Бельчева и др., 2014; Тоцкий и др., 2013; Экоксикологические..., 2016).

Сокращения: АФК — активные формы кислорода; МДА — малоновый диальдегид; ПОЛ — перекисное окисление липидов.

Для беспозвоночных характерно большее разнообразие процессов старения, чем для позвоночных. Этому способствует наличие всего спектра вариации продолжительности жизни: от полной недетерминированности до строгой детерминированности (Комфарт, 1967; Скулачев, 2009; Hole et al., 1995; Viarengo et al., 1989). На мидиях и морских гребешках показано, что с возрастом активируются процессы ПОЛ, снижается способность антиоксидантной системы инактивировать АФК и содержание антиоксидантов в тканях (Бельчева и др., 2014; Черноморские..., 2014; Hole et al., 1995; Viarengo et al., 1989). Информация о возрастных изменениях у пресноводных видов моллюсков отсутствует.

Авторы исследовали уровень содержания МДА в тканях и органах двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea* (L., 1758) разных возрастных групп. Выбор данного вида обусловлен тем, что *A. cygnea* относится к широко распространенным обитателям пресноводных экосистем (Алимов, 1967; Соколова и др., 2015; Старобогатов, 1988) и играет важную роль в очищении водоемов от биогенных и абиогенных загрязнителей. Вид обитает в прибрежных водах и разных по загрязнению экосистемах при широком диапазоне изменчивости экологических факторов. Кроме того, установлено, что разновозрастные и разноразмерные двустворчатые моллюски различаются содержанием в тканях иммунных комплексов и МДА, интенсивностью инвазии водяными клещами из рода *Unionicola* Haldeman, 1842 (Соколова и др., 2015). Поскольку заражение водяными клещами регистрировали только у крупных особей, сделано предположение, что высокий уровень инвазии у старших возрастных *A. cygnea* обусловлен снижением адаптивного потенциала, супрессией метаболических процессов и нарушением окислительно-восстановительного потенциала. Выдвинутое нами положение послужило основой для оценки уровня содержания МДА в тканях двустворчатого моллюска разного возраста.

Материалом для исследования послужили 23 половозрелые особи *A. cygnea*, собранные в декабре 2014 г. на р. Суноге Ярославской обл. Моллюсков разделили на шесть возрастных групп от 4 до 9 лет. Возраст определяли по дугообразному рисунку на створках раковин (Власов, 1935).

У моллюсков препарировали жабры, мышцы и гепатопанкреас, из которых готовили гомогенаты на дистиллированной воде в соотношении 1 : 6 (масса к объему). Гемолимфу отбирали с помощью шприца из заднего аддуктора моллюска и центрифугировали при 600 г в течение 15 мин. Интенсивность ПОЛ в тканях оценивали по накоплению МДА. Концентрацию МДА определяли в гомогенатах тканей на основе учета количества продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбиту-

ровой кислотой и дающих с ней окрашенный комплекс. Интенсивность окрашивания оценивали спектрофотометрически по изменению максимума поглощения при 535 нм. Содержание МДА вычисляли с учетом коэффициента молярной экстинкции 1.56×10^5 (М см) и выражали в наномолях на 1 г ткани (Андреева и др., 1988).

При статистической обработке данных вычисляли средние значения и их ошибку. Корреляционную связь между возрастом моллюсков и уровнем МДА определяли по Спирмену. Достоверность различий оценивали при $p \leq 0.05$.

Результаты исследования показали, что с повышением возраста моллюсков уровень МДА увеличивается в гемолимфе, жабрах и гепатопанкреасе в 2.5, 1.7 и 2.2 раза соответственно и постепенно снижается в мышцах моллюсков от четырех до восьми лет (табл. 1). Достоверные различия МДА между особями четырех и семи–девяти лет зафиксированы в гемолимфе и гепатопанкреасе. Выявлена высокая корреляционная связь между возрастом моллюска и уровнем МДА: положительная в гемолимфе (+0.84), жабрах (+0.73) и гепатопанкреасе (+0.90) и отрицательная – в мышцах (–0.85). Самый низкий уровень МДА зафиксирован в гемолимфе, высокий – в гепатопанкреасе и жабрах.

Аналогичные данные изменения уровня ПОЛ в гемолимфе, жабрах и гепатопанкреасе получены при исследовании морских двустворчатых моллюсков: *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), *M. edulis*, *M. trossulus* (L., 1758), *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853), *Geukensia demissa* (Dillwyn, 1817), *Perna viridis* (L., 1758), *Anadara broughtonii* (Shrenk, 1867) и *Modiolus kurilensis* (Lamarck, 1799) (Черноморские..., 2014). Авторы показали, что у более взрослых особей снижается содержание α -токоферола и активность антиоксидантных ферментов при одновременном повышении активности ПОЛ и накоплении пигмента старения (липофусцина) в тканях гепатопанкреаса. Снижение содержания антиоксидантов приводит к активации ПОЛ и накоплению МДА и, как следствие, к снижению адаптивного потенциала и ускорению темпов старения многоклеточных животных (Барабой, 1991; Зенков и др., 2001; Меньшикова и др., 2008; Fiho, 1996; Harman, 1956; Radi, Matkovic, 1988; Winston, 1991).

Обнаруженное различие содержания антиоксидантов в тканях исследуемых органов свидетельствует о разной интенсивности происходящих метаболических и биоэнергетических процессов, связанных с синтезом высокоэнергетических соединений (АТФ). Вероятно, это обусловлено их структурно-функциональными особенностями и уровнем содержания антиоксидантного ферментного комплекса.

Таблица 1. Возрастная динамика уровня МДА (нмоль/г) в гемолимфе и тканях двустворчатых моллюсков

Возраст, год	Гемолимфа	Жабры	Гепатопанкреас	Мышцы
4	0.23 ± 0.08	2.49 ± 0.37	2.35 ± 0.24	5.23 ± 1.64
5	0.49 ± 0.09 ⁴	3.22 ± 0.54	4.01 ± 1.51	2.89 ± 0.94
6	0.52 ± 0.11	3.4 ± 0.55 ⁴	4.29 ± 1.81	2.54 ± 0.57
7	0.55 ± 0.03 ⁴	3.42 ± 0.60	4.96 ± 0.95 ⁴	1.65 ± 0.60
8	0.69 ± 0.11 ⁴	3.59 ± 0.26	5.01 ± 0.76 ⁴	0.86 ± 0.19 ⁶
9	0.70 ± 0.10 ⁴	4.27 ± 1.15	5.22 ± 0.65 ⁴	2.91 ± 0.77 ⁸

Примечание. ^{4, 6, 8} – достоверные различия уровня МДА относительно четырех-, шести- и восьмилетней возрастных групп при $p \leq 0.05$.

Гемолимфа двустворчатых моллюсков состоит из гуморальных и клеточных компонентов и представляет собой защитно-транспортную циркуляторную систему в составе тканей внутренней среды, ответственную за поддержание гомеостаза. Форменным элементам гемолимфы – гемоцитам и амeboцитам – принадлежит ведущая роль в поддержании иммунного гомеостаза и реализации иммунного ответа, транспортировке продуктов метаболизма к тканям и органам (Анисимова, 2013; Заварзин, 1953; Присный, Кулько, 2012; Черников и др., 2013; Cheng, 1981; Wootton, Pipe, 2003).

Гепатопанкреас у моллюсков сочетает в себе свойства печени и поджелудочной железы, выполняет функции пищеварения, нейтрализации токсических соединений, поступающих в организм с пищевыми массами, биоаккумуляции и детоксикации различных химических соединений (Черноморские..., 2014). Существует мнение, что при старении в клетках печени существенно снижается энергетическая функция митохондрий в результате нейтрализации продуктами ПОЛ супероксиддисмутазы (Физиологические..., 1982).

Жабры находятся в вентилирующей мантийной полости моллюска и выполняют функции фильтрации и газообмена между гемолимфой и мантийной жидкостью. При взаимодействии с водной средой жабры испытывают значительную окислительную нагрузку по сравнению с другими тканями (Гостюхина и др., 2005; Солдатов и др., 2007; Viarengo et al., 1989). Кроме того, жабры, подобно выделительной системе у рыб и млекопитающих, участвуют в элиминации продуктов метаболизма из организма. Высокие величины содержания МДА, выявленные в жабрах *Anodonta cygnea* старших возрастных групп, связаны не только с качеством воды, но и с более интенсивной элиминацией конечных продуктов метаболизма ПОЛ, поступающих из тканей и органов.

Мускулатура ноги двустворчатых моллюсков состоит из гладких мышечных волокон. Она выполняет функцию двигательной активности, которая в осенне-зимний период снижается

до минимума и отличается низкой долей содержания структур, осуществляющих генерацию АФК (Гидулянов, 2014).

Выводы. Выявлены основные закономерности изменения уровня МДА в тканях *A. cygnea* с возрастом. Показана связь уровня МДА со структурно-функциональными особенностями исследуемых тканей. Характер изменения содержания МДА у разных возрастных групп *A. cygnea* отражает общие закономерности старения вида и соответствует общей теории старения (Нагман, 1956).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012690123-4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алимов А.Ф. 1967. О возможной роли животных-фильтраторов в процессах самоочищения водоемов // Моллюски и их роль в биоценозах и формировании фауны. Ленинград: Наука.
- Андреева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. 1988. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лабораторное дело. № 11. С. 41.
- Анисимова А.А. 2013. Морфофункциональные параметры гемоцитов в оценке физиологического состояния двустворчатых моллюсков // Биол. моря. Т. 39. № 6. С. 389.
- Барабой В.А. 1991. Механизмы стресса и перекисного окисления липидов // Успехи современной биологии. Т. 3. Вып. 6. С. 923.
- Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. 1992. Перекисное окисление и стресс. Санкт-Петербург: Наука.
- Бельчева Н.Н., Кудряшова Ю.В., Истомина А.А. 2014. Возрастное изменение реакций антиоксидантных ферментов в жабрах приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* на окислительный стресс // Вопросы рыболовства. Т. 15. № 3. С. 306.
- Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. 1991. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. Т. 29. С. 1.

- Власов Б.В. 1935. Методы определения возраста (Unionidae) по раковине и их значение в научно-промысловых исследованиях // Записки Болшевской биологической станции. Вып. 7–8. С. 133.
- Гидулянов А.А. 2014. Сравнительное изучение процессов перекисидации в тканях у отдельных представителей позвоночных и беспозвоночных животных // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Сер. Биология, химия. Т. 27(66). № 2. С. 48.
- Гостюхина О.Л., Солдатов А.А., Головина И.В., Столбов А.Я. 2005. Антиоксидантный ферментный комплекс тканей различных цветовых морф черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Экол. моря. Вып. 68. С. 42.
- Журавлев А.И., Пантюшенко В.Т. 1989. Свободнорадикальная биология. Москва: Моск. вет. акад. им. К.И. Скрябина.
- Заварзин А.Л. 1953. К сравнительной гистологии крови и соединительной ткани. IV. О воспалительном новообразовании соединительной ткани у беззубки (*Anodonta anatina* L.). Избранные труды. Москва: АН СССР. Т. 2.
- Зенков Н.К., Лапкин В.З., Меньшикова Е.Б. 2001. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты. Москва: МАИК “Наука/Интерпериодика”.
- Канунго М. 1982. Биохимия старения. Москва: Мир. (Kanungo M.S. 1982. Biochemistry of Ageing. Varanasi: Banaras Hindu University.)
- Кольтовер В.К. 2000. Свободнорадикальная теория старения: исторический очерк // Успехи геронтологии № 4. С. 33.
- Комфарт А. 1967. Биология старения. Москва: Мир. (Comfort A. 1964. The biology of senescence. New York: Holt, Rinehart and Winston).
- Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Лапкин В.З. и др. 2008. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА.
- Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л., Кораблева Н.П. и др. 1984. Биохимия иммунитета, покоя, старения растений. Москва: Наука.
- Присный А.А., Кулько С.В. 2012. Морфофункциональные особенности гемоцитов брюхоногого моллюска *Stenomphalia ravergieri* (Ferussac) // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Сер. Естественные науки. № 9(128). Вып. 19. С. 90.
- Скулачев В.П. 2009. Новые сведения о биохимическом механизме запрограммированного старения организма и антиоксидантной защите митохондрий // Биохимия. Т. 74. Вып. 12. С. 1718.
- Соколова А.С., Микряков В.Р., Жаворонкова О.Д., Кузьмичёва С.В. 2015. Морфо-физиологические показатели моллюска *Anodonta cygnea* (Linne, 1758) инвазированного водными клещами из рода *Unionicola* Haldeman, 1842 // Расширенные материалы IV международной конференции: Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. Ярославль: Филигрань. С. 445.
- Солдатов А.А., Гостюхина О.Л., Головина И.В. 2007. Антиоксидантный ферментный комплекс тканей двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. в норме и условиях окислительного стресса (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. Т. 43. № 5. С. 621.
- Старобогатов Я.И. 1988. Раки, моллюски. Ленинград: Лениздат.
- Тарусов Б.Н. 1957. Физико-химические механизмы биологического действия ионизирующих излучений // Успехи соврем. биол. Т. 44. Вып. 2. С. 171.
- Тодоров И.Н., Тодоров Г.И. 2003. Стресс, старение и их биохимическая коррекция. Москва: Наука.
- Тоцкий В.Н., Ершова О.Н., Топтиков В.А. и др. 2013. Состояние антиоксидантной системы у представителей *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846), обитающих в разных акваториях Одесского залива (Черное море) // Вісник Одеського національного університету. Сер. Біологія. Т. 18. Вып. 1(30). С. 7.
- Хэм Ф., Кормак Д. 1982. Гистология. Москва: Мир. Т. 1. 272 с. (Ham A.W., Cormack D.H. 1979. Histology. Philadelphia: Lippincott.)
- Физиологические механизмы старения. Ленинград: Наука. 1982.
- Черников О.В., Молчанова В.И., Чикаловец И.В. и др. 2013. Лектины морских гидробионтов // Биохимия. Т. 78. Вып. 7. С. 977.
- Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии. 2014. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика.
- Экотоксикологические исследования прибрежной черноморской иктиофауны в районе Севастополя. 2016. Москва: ГЕОС.
- Abele D., Brey T., Philipp E. 2009. Bivalve models of aging and the determination of molluscan lifespans // Exp. Gerontol. V. 44. P. 307.
- Cheng T.C. 1981. Bivalves. In Invertebrate blood cells. London: Acad. Press. V. 2. P. 233.
- Fiho W.D. 1996. Fish antioxidant defences – A comparative approach // Braz. J. Med. Biol. Res. V. 29. № 12. P. 1735.
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation biology // J. Gerontol. V. 11. P. 298.
- Hole L.M., Moore M.N., Bellamy D. 1995. Age-related cellular and physiological reactions to hypoxia and hyperthermia in marine mussels // Mar. Ecol.: Prog. Ser. V. 122. P. 173.
- Radi A.R., Matkovic B. 1988. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, proteins contents and lipid peroxidation of carp tissues // Comp. Biochem. Physiol. V. 906. № 1. P. 69.
- Viarengo A., Pertica M., Canesi L. et al. 1989. Lipid peroxidation and level of antioxidant compounds (GSH, vitamin E) in the digestive glands of mussels of three different age groups exposed to anaerobic and aerobic conditions // Mar. Environ. Res. V. 28. P. 2991.
- Winston G.W. 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Comp. Biochem. Physiol. V. 100. № 1–2. P. 173.
- Wootton E.C., Pipe R.K. 2003. Structural and functional characterization of the blood cells of the bivalve mollusc *Scrobularia plana* // Fish Shellfish Immunol. V. 15. P. 249.

Age Changes in the Lamber of the Palm Dialdehyde in the Tissue Collars of *Anodonta cygnea* (L., 1758)

A. S. Sokolova^{1,*}, D. V. Mikryakov^{1,**}, and V. R. Mikryakov¹

¹*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Nekouzskii raion, Yaroslavl oblast, Russia*

**e-mail: Aleksandrasokol@rambler.ru*

***e-mail: daniil@ibiw.ru*

The level of lipid peroxidation in hemolymph, hepatopancreas, gills and muscles of clam *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758) of different ages was studied. The dependence of malondialdehyde content in hemolymph and tissues studied on the age of the mollusk and structural and functional characteristics of tissues was revealed. In hepatopancreas, the content of Malon dialdehyde increases in gills and hemolymph, and decreases in the tissues of the leg in older individuals compared to younger ones.

Keywords: mollusk *Anodonta cygnea*, age, malonic dialdehyde, lipid peroxidation, oxidative stress, hemolymph, hepatopancreas, gills, muscles