

УДК 594.1:577.15(262.5)

ВЛИЯНИЕ ГОЛОДАНИЯ НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ КОМПЛЕКС ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906) ИЗ ЧЕРНОГО МОРЯ

© 2023 г. О. Л. Гостюхина^{1, *}, А. А. Солдатов^{1, 2}

¹Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь 299011, Россия

²ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет,
ул. Университетская, 33, Севастополь 299053, Россия

*e-mail: gostolga@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.04.2022 г.

После доработки 28.06.2022 г.

Принята к публикации 06.10.2022 г.

Исследовано влияние 30-суточного голодания на состояние антиоксидантного комплекса и перекисного окисления липидов в тканях черноморского двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Животных содержали в аквариумах с системой закрытого водообмена и биофильтрацией воды. Определяли активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, супероксиддисмутазы и каталазы, а также содержание восстановленного глутатиона и ТБК-активных продуктов. Выявленные у анадары реакции антиоксидантного комплекса и перекисного окисления липидов имели тканевую специфику: в условиях голодания содержание ТБК-активных продуктов в гепатопанкреасе и ноге моллюска уменьшалось, а в жабрах не изменялось. Наиболее выраженные изменения антиоксидантного комплекса выявлены в гепатопанкреасе, где показано увеличение всех исследованных параметров. В ноге отмечен рост только показателей антиоксидантной глутатионовой системы, а в жабрах — только активности глутатионпероксидазы и содержания восстановленного глутатиона. Полученные результаты свидетельствуют об устойчивом антиоксидантно-проксидантном равновесии двустворчатого моллюска *A. kagoshimensis* в условиях голодания.

Ключевые слова: голодание, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, восстановленный глутатион, супероксиддисмутаза, каталаза, перекисное окисление липидов, *Anadara kagoshimensis*

DOI: 10.31857/S0134347523010047, EDN: LRSBCY

Моллюски рода *Anadara* относятся к числу эврибионтных морских организмов, одним из наиболее устойчивых к действию таких экологически значимых факторов среды, как дефицит кислорода, эвтрофикация и заиление, что нередко наблюдают в Черном море (Анистратенко, Халиман, 2006; Ревков, 2016). У двустворчатого моллюска-вселенца *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) (Bivalvia: Arcidae) отмечены особенности, отличающие его от других моллюсков, обитающих в Черном море. В эритроцитах *A. kagoshimensis*, как и других видов рода *Anadara*, содержится гемоглобин (Novitskaya, Soldatov, 2013) — белок, связывающий и запасающий кислород. Анадара устойчива и даже тяготеет к условиям заиления и гипоксии, эвтрофированным акваториям (Ревков, 2016). Она способна выживать при аноксии, гипоксии и даже заморах при очень низком содержании кислорода в среде (до 0.5 мл/л) в течение 5–7 сут (Miyamoto, Iwanaga, 2017). Отчасти это связывают с интенсивностью потребления кислорода, которая у анадары даже при нормоксии в 5–6 раз ниже,

чем у массового черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, а в метаболизме некоторых тканей вселенца преобладают анаэробные процессы (Солдатов и др., 2010).

Активность ферментов энергетического обмена лактат- (ЛДГ) и малатдегидрогеназы (МДГ) в тканях *A. kagoshimensis* в 2–6 раз выше, чем в тканях *M. galloprovincialis* (см.: Golovina et al., 2016). У *A. kagoshimensis* более низкий уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), но более высокие показатели антиоксидантного (АО) комплекса и других систем (уровень глутатиона, мочевины, аминокислот, каротиноидов и активность глутатионредуктазы и аланинаминотрансферазы), чем у таких двустворчатых моллюсков Черного моря, как аборигенный вид *M. galloprovincialis* и интродуцент *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (см.: Гостюхина, Андреев, 2019; Gostiukhina, Golovina, 2013; Golovina et al., 2016). Вероятно, эти особенности наряду с другими чертами метаболизма определяют адаптации *A. kagoshimensis* к условиям

обитания и место моллюска в структуре бентосных сообществ Черного моря (Ревков, 2016).

Среди экологически значимых факторов, действующих в водной среде, можно выделить голодание (дефицит пищи), которое является одним из видов гипометаболизма (Almeida, Di Mascio, 2011). Для большинства гидробионтов голодание является естественным и периодически может чередоваться с состоянием насыщения, например, при сезонной флуктуации биомассы первичных продуцентов (Истомина, Челомин, 2018), когда многие бентосные виды не питаются в течение недель и даже месяцев (Almeida, Di Mascio, 2011).

Голодание способствует развитию состояния стресса, когда организм либо лишен пищевых субстратов, либо получает их в недостаточном количестве, что характеризуется глубокими изменениями в метаболизме и может приводить к общему ослаблению организма (Горомосова, Шапиро, 1984). При голодании развивается ряд приспособительных реакций, ферментные системы организма адаптируются к отсутствию пищи, что сопровождается переходом к эндогенному питанию и затрагивает белково-углеводный, липидный и энергетический обмен (Зайчик, Чурилов, 2001; Андреев и др., 2009; Almeida, Di Mascio, 2011), при этом у моллюсков меняется антиоксидантно-прооксидантный баланс (Ansaldi et al., 2007).

Предполагают, что основное негативное действие голодания связано с усилением генерации активных форм кислорода (АФК) в этот период. Отмечают, что организмы, устойчивые к гипометаболическим состояниям, обладают высокоэффективными защитными системами (Almeida, Di Mascio, 2011). Одной из важнейших защитных систем организма в условиях любого стрессорного воздействия является АО комплекс. Реакции показателей АО комплекса и ПОЛ в тканях гидробионтов при голодании разнообразны, имеют видовую и тканевую специфику, а также зависят от продолжительности периода пищевой депривации.

Исследовано влияние дефицита пищи на АО комплекс мидии *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) в течение двух недель (Истомина, Челомин, 2018), двустворчатого моллюска *Sinonovacula constricta* (Lamarck, 1818) в течение 6 сут (Zhang et al., 2010) и камбалы калкан *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814) — 8 сут (Гостюхина, Головина, 2011). Адаптивные реакции АО системы при голодании выявлены и у других моллюсков, например, у наземного вида *Otala lactea* (Müller, 1774) (см.: Ramnanan, Storey, 2006), у брюхоногого моллюска *Nacella concinna* (Strebel, 1908) (см.: Ansaldi et al., 2007), у пресноводного моллюска *Pila globosa* (Swainson, 1822) (см.: Bhunia et al., 2016) и др.

Опубликованы результаты изучения АО системы и ПОЛ у гидробионтов при голодании

(Гостюхина, Головина, 2011; Истомина, Челомин, 2018; Ramnanan, Storey, 2006; Ansaldi et al., 2007; Zhang et al., 2010). Однако механизмы и особенности метаболизма, обеспечивающие адаптации животных к пищевой депривации, еще не ясны. Особенно актуальны такие исследования у видов с высокой устойчивостью к различным стресс-факторам среды, к числу которых относят *A. kagoshimensis*. В связи с этим цель настоящего исследования — выявить реакции защитного АО комплекса моллюска-вселенца в Черное море *A. kagoshimensis* на действие голодания как экологически значимого фактора. Полученные сведения позволят расширить представление об адаптивных возможностях и о функциональном разнообразии адаптационных реакций у этого вида в условиях его обитания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Половозрелых особей анадары *Anadara kagoshimensis* собирали в апреле 2020 г. на мидиево-устричной ферме в районе пос. Качивели (Южный берег Крыма, Черное море) на глубине 1.5–2.0 м при температуре воды 14–15°C и солености 17–18‰. Длина раковины моллюсков составляла 32–36 мм. После транспортировки животных 2–3 сут выдерживали в проточных аквариумах для акклимации, затем их разделили на две группы (контрольную и опытную) и на 30 сут поместили в непроточные аквариумы (объем 150 л) с аэрацией. Во время эксперимента параметры морской воды в аквариумах были такими же, как в море: температура — 14–15°C, соленость — 17–18‰, концентрация кислорода — 7.3–7.6 мг/л.

В аквариумах была установлена система закрытого водообмена с биофильтрацией воды: на фильтрах формируется бактериальная флора, которая поглощает нитраты и нитриты, происходит денитрификация воды, что препятствует развитию бактерий и микроводорослей. В аквариумах ежедневно заменяли 10% объема воды для удаления продуктов обмена.

Моллюсков контрольной группы ежедневно кормили микроводорослями (*Tetraselmis viridis*, штамм IBSS-25, 5–10 мл/50 л морской воды), а особи опытной группы пищу не получали. Визуально наблюдали снижение интенсивности открытия и закрытия створок у моллюсков опытной группы, что указывало на уменьшение их фильтрационной активности. Поступление питательных веществ к моллюскам было ограничено, так как в аквариумы подавалась фильтрованная морская вода лишь с остаточным количеством пищевых частиц, не удаленных фильтрами. В течение эксперимента гибели моллюсков не наблюдали. Через 30 сут у моллюсков выделяли гепатопанкреас, жабры и ногу; ткани сразу замораживали и хранили при температуре –80°C. В дальнейшем ткани гомогенизировали при температуре 0–4°C.

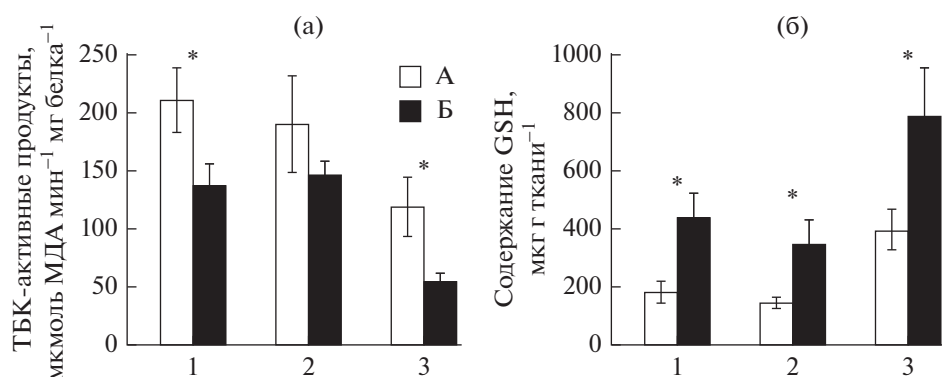


Рис. 1. Содержание ТБК-активных продуктов (а) и восстановленного глутатиона (GSH) (б) в тканях анадары *Anadara kagoshimensis* при 30-суточном голодании. А – контрольная группа, Б – голодание; 1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога. *Отличия достоверны при $p \leq 0.05–0.01$ (критерий Манна–Уитни).

Гомогенаты центрифугировали (3200 g, 15 мин) (Centrifuge 5424 R, Eppendorf).

Активность ГП определяли по накоплению окисленного глутатиона (Paglia, Valentine, 1967), активность ГР – по уменьшению уровня НАДФН (Marques et al., 2016). Активность СОД оценивали по степени ингибирования восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) (Nishikimi et al., 1972), а каталазы – по реакции остаточных количеств пероксида водорода с молибдатом аммония (Goth, 1991). Активность ферментов определяли при температуре $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Содержание восстановленного глутатиона (GSH) оценивали по реакции с аллоксановым реактивом (Путилина, 1982). Интенсивность ПОЛ измеряли по уровню продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов) (Ohkawa et al., 1979).

Для статистической обработки цифрового материала использовали стандартные программы Past 3 и Grapher 7. В каждой группе было по 21 моллюску. Рассчитывали среднее арифметическое и ошибку среднего. Для оценки достоверности различий применяли *U*-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически достоверными при значении $p \leq 0.05$. На рисунках результаты представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В гепатопанкреасе и ноге голодавших моллюсков содержание ТБК-активных продуктов по сравнению с таковым у питавшихся особей было ниже соответственно – в 1.6 ($p \leq 0.05$) и 2.2 раза ($p \leq 0.01$). В жабрах анадары изменений не выявлено (рис. 1а).

Показатели АО комплекса, напротив, преимущественно увеличились. Так, содержание GSH в тканях возросло в 1.9–2.3 раза ($p \leq 0.05–0.01$)

(рис. 1б). На этом фоне активность ГП и ГР при голодании во всех исследованных тканях анадары увеличилась в 1.7–3.3 раза, за исключением активности ГР в жабрах (рис. 2а, 2б). Наибольшее увеличение активности ГП отмечено в гепатопанкреасе – в 3.3 раза ($p \leq 0.01$), а ГР в ноге – в 1.8 раза ($p \leq 0.01$). В жабрах выявлена тенденция к увеличению активности ГР в 1.4 раза, однако отличия не были достоверными.

Повышение активности СОД и каталазы в условиях голодания зарегистрировано только в гепатопанкреасе анадары – в 1.9 и 2.6 раза ($p \leq 0.05–0.01$) соответственно. В жабрах и ноге моллюска эти показатели оставались на прежнем уровне (рис. 3а, 3б).

Для повышения информативности полученных результатов были рассчитаны коэффициенты корреляции для двух групп моллюсков в трех исследованных тканях в норме и при голодании (см. табл. 1). Наиболее высокие значения коэффициента получены в жабрах голодавших особей для следующих пар показателей: активность ГП и уровень GSH, активность ГП и ГР, СОД и каталазы (прямая связь), а также для активности СОД и уровня GSH (обратная связь). В гепатопанкреасе наиболее высокий коэффициент корреляции рассчитан для активности СОД и каталазы, а также для активности ГП и уровня GSH (прямая связь). Более низкими были коэффициенты корреляции для следующих пар показателей: активность ГП и ГР (прямая связь), а также активность СОД–уровень GSH (обратная связь), что отражает взаимосвязь средней силы. О взаимосвязи средней силы у моллюсков обеих групп в ноге свидетельствуют коэффициенты корреляции для показателей: активность ГП–уровень GSH (прямая связь у моллюсков обеих групп), активность СОД–уровень GSH (обратная – у голодавших особей).

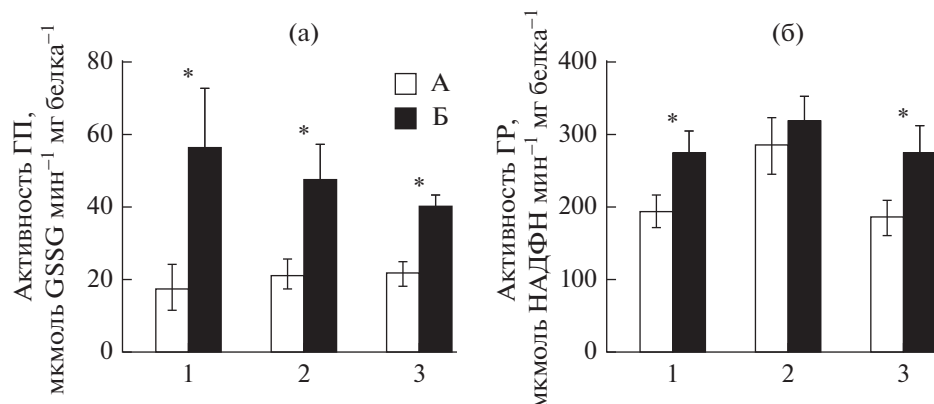


Рис. 2. Активность ГП (а) и ГР (б) в тканях анадары *Anadara kagoshimensis* при 30-суточном голодании. А – контрольная группа, Б – голодание; 1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога. *Отличия достоверны при $p \leq 0.05–0.01$ (критерий Манна–Уитни).

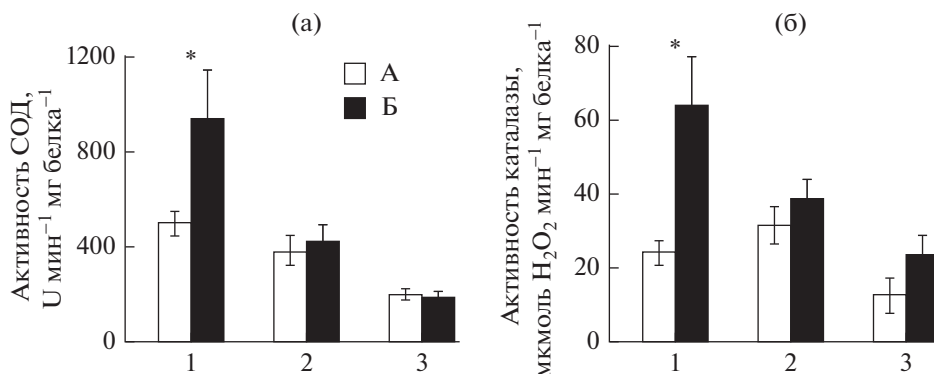


Рис. 3. Активность СОД (а) и каталазы (б) в тканях анадары *Anadara kagoshimensis* при 30-суточном голодании. А – контрольная группа, Б – голодание; 1 – гепатопанкреас, 2 – жабры, 3 – нога. *Отличия достоверны при $p \leq 0.05–0.01$ (критерий Манна–Уитни).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что адаптация к состоянию голодания протекает как ряд процессов, связанных с общим снижением скорости метаболизма и направленных на поддержание энергии в клетке и на выживание организма. Происходит снижение основного обмена, ферментативной активности

и ограничение аэробных процессов (Зайчик, Чурилов, 2010). Основное негативное действие голодания связывают с ростом генерации активных форм кислорода (АФК) в данный период, что можно объяснить участием АФК в стрессовых реакциях, клеточном цикле, энергетическом обмене, работе фагоцитирующих клеток (Almeida,

Таблица 1. Коэффициенты корреляции для показателей антиоксидантного комплекса в тканях анадары в норме и при голодании

Пара показателей	Вид ткани					
	гепатопанкреас		жабры		нога	
	контроль	голодание	контроль	голодание	контроль	голодание
Активность ГП–уровень GSH	0.683	0.756	0.814	0.870	0.590	0.658
Активность ГП и ГР	0.526	0.586	0.842	0.985	0.275	0.304
Активность СОД–уровень GSH	–0.528	–0.581	–0.653	–0.793	–0.542	–0.885
Активность СОД и каталазы	0.896	0.923	0.881	0.900	0.374	0.411

Di Mascio, 2011). Эти процессы, очевидно, влияют на состояние АО комплекса и ПОЛ моллюска.

Интенсивность ПОЛ

Снижение уровня ПОЛ, очевидно, связано со снижением скорости обмена в целом и, в частности, с уменьшением уровня биосинтеза жирных кислот и липидов в условиях снижения/прекращения поступления необходимых питательных веществ. Как известно, жиры – это основной запасной энергетический субстрат организма, и для получения энергии при голодании они используются в первую очередь. Снижение жировых запасов при голодании выявлено у многих видов рыб. На начальных этапах дефицита пищи используются триацилглицериды, идет катаболизм жирных кислот, снижается ресурс холестерина. В целом процессы синтеза жирных кислот и липогенеза у голодающих животных замедляются или прекращаются (Shikata, Shimeno, 1997; Gao et al., 2004).

Установленные нами изменения, вероятно, связаны с длительностью пищевой депривации. В первые сутки голодания уровень ПОЛ может повышаться в связи с увеличением синтеза АФК (Almeida, Di Mascio, 2011) и наличием определенных запасов липидных субстратов. При 30-суточном дефиците пищи нами отмечено снижение ПОЛ, что, очевидно, связано со снижением количества липидов и других окисляемых субстратов в тканях. Уменьшение скорости процессов ПОЛ у моллюсков при голодании вследствие замедления метаболизма и снижения уровня свободно-радикального окисления (СРО) отмечали и другие исследователи: в гепатопанкреасе двустворчатых моллюсков *Nacella concinna* (см.: Ansaldo et al., 2007) и *Crenomytilus grayanus* (см.: Истомина, Челомин, 2018), а также в нервной ткани брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) (см.: Sidorov, Maslova, 2009).

Одной из причин снижения содержания продуктов ПОЛ у моллюсков при дефиците пищи считают также активацию в этих условиях лизосомальной аутофагии, что исследовано в гепатопанкреасе мидии *M. galloprovincialis* (см.: Moore et al., 2007). В данном процессе утилизируются части поврежденных клеток и молекул, а также продукты распада, образующиеся при голодании. Следовательно, это может способствовать снижению количества окисляемых субстратов, общего содержания АФК в клетке и уменьшению интенсивности ПОЛ в целом. С данными причинами связывают снижение уровня ПОЛ в гепатопанкреасе дальневосточной мидии *M. galloprovincialis* при голодании (Истомина, Челомин, 2018).

Антиоксидантный комплекс

Полученные результаты можно связать как со специфическими для каждой ткани анадары особенностями, так и с общими для всего организма процессами при голодании у моллюсков.

Тканевые особенности. При голодании и других состояниях гипометаболизма у моллюсков отмечают тканеспецифические изменения в АО активности и уровне ПОЛ (Hermes-Lima, Storey, 1995; Nowakowska et al., 2009). В настоящем исследовании у *A. kagoshimensis* также выявлены тканевые особенности реакций АО комплекса и ПОЛ на дефицит пищи.

Гепатопанкреас. При голодании рост параметров антиоксидантной глутатионовой системы (АГС) наблюдали во всех исследованных тканях анадары. В гепатопанкреасе моллюска отмечено также увеличение активности каталазы и СОД на фоне снижения уровня ПОЛ. Причем в гепатопанкреасе голодавших особей выявлены наибольшая активность каталазы, а также ее наибольший рост среди исследованных показателей моллюсков. Увеличение активности СОД отмечено только в этом органе моллюска. Данные реакции указывают на высокий уровень АО защиты в гепатопанкреасе анадары, где протекают основные метаболические реакции и высокий уровень обмена веществ в целом, в том числе интенсивность СРО. Такой тип отклика АО комплекса на стресс в гепатопанкреасе анадары вполне согласуется с ее конститутивными особенностями (Гостюхина, Андреев, 2019), а именно с активным участием в АО защите как ферментного, так и низкомолекулярного звена. Эти выводы подтверждены и значениями коэффициента корреляции r в гепатопанкреасе при голодании. Наиболее высокие величины найдены между активностью ГП и уровнем GSH (0.75), а также активностью СОД и каталазы (0.92), что отражает тесную положительную взаимосвязь между этими показателями и синергизм в процессах АО защиты гепатопанкреаса.

Наиболее высокие значения показателей АО комплекса у моллюсков при гипометаболизме исследователи также определяют в гепатопанкреасе. Так, в пищеварительной железе спящего летом моллюска *O. lactea* выявлена наибольшая активность глутатионзависимых ферментов (Hermes-Lima, Storey, 1995). Напротив, у моллюска *Helix pomatia* Linnaeus, 1758 в состоянии летней спячки наибольшими значениями в гепатопанкреасе отличались не ферменты, а низкомолекулярный глутатион, что, по мнению авторов, обеспечило наименьший уровень ПОЛ в этом органе. Относительно постоянный высокий уровень глутатиона предполагает наличие эффективной АО защиты при возврате моллюска *H. pomatia* к активному состоянию (Nowakowska et al., 2009). Это отмеча-

ют и другие авторы. У покоящихся особей *Helix aspersa* уровень глутатиона в гепатопанкреасе был значительно выше, чем у пробудившихся моллюсков (Ramos-Vasconcelos, Hermes-Lima, 2003).

Нора. В ноге анадары в состоянии голодания нами выявлено увеличение всех показателей АГС, а также отмечена тенденция к росту активности каталазы. При этом снижение уровня ПОЛ в ноге голодавшей анадары было больше, чем падение данного показателя в гепатопанкреасе. В ноге у голодавших моллюсков по сравнению с питавшимися особями на фоне активации ГП отмечен одновременный рост активности ГР и уровня GSH, что, очевидно, связано с наращиванием ресурса этого антиоксиданта. GSH — важнейшее низкомолекулярное соединение, обеспечивающее защиту от АФК и продуктов ПОЛ. Причем содержание GSH в ноге анадары было наибольшим по сравнению с его содержанием в других тканях как у питавшихся, так и у голодавших моллюсков. На этом фоне активность СОД в условиях отсутствия пищи не менялась, а активность каталазы показала лишь тенденцию к росту. Данные результаты свидетельствуют о доминировании АГС в АО защите ноги анадары при голодании. GSH способен инактивировать супероксидный радикал ($O_2^{\cdot-}$), дополняя или заменяя работу СОД, т.е. ферментного звена АО комплекса (Окислительный..., 2006). Этим свойством можно объяснить отсутствие изменений в активности СОД у голодавшей анадары: рост ресурса GSH, возможно, связан с участием данного метаболита в обезвреживании $O_2^{\cdot-}$, что не потребовало дополнительной активации СОД в ноге моллюска. Подобную взаимосвязь активности СОД и уровня GSH может подтвердить и то, что в естественных условиях обитания в тканях анадары высокий ресурс GSH сочетается с низкой активностью СОД, и наоборот (Гостюхина, Андреев, 2019). С этим согласуются величины коэффициента корреляции r в ноге анадары: при голодании наиболее высокие значения получены для пары уровень глутатиона—активность СОД (-0.885), что указывает на высокую степень обратной взаимосвязи между данными показателями, а также для пары уровень глутатиона—активность ГП (0.659), что отражает синергическое взаимодействие глутатиона и фермента при инактивации перекисей.

Нога моллюска *A. kagoshimensis* обладает богатым количественным и качественным составом каротиноидов, имеющих АО свойства. В этом массивном органе происходит запасание данных веществ. Ранее показано (Gostyukhina et al., 2013), что в тканях анадары каротиноиды могут проявлять АО действие совместно с компонентами АО комплекса, в том числе с глутатионом. Кроме того, известна способность каротиноидов к потенци-

рованию функции низкомолекулярных антиоксидантов, таких как GSH, и активности глутатионовых ферментов (Шашкина и др., 2010). Возможно, исходно высокий уровень каротиноидов в ноге моллюска способствовал длительному поддержанию высокого ресурса GSH даже в условиях окислительного стресса при депривации пищи. Как и в нашей работе, у моллюска *Olivella lactea* при гипометаболизме (во время летней спячки) увеличивалась активность глутатионовых ферментов (Hermes-Lima, Storey, 1995).

Жабры. В отличие от гепатопанкреаса и ноги, в жабрах наблюдали лишь рост активности ГП и уровня GSH на фоне постоянного уровня ПОЛ. Известно, что жабры характеризуются не столь высокими пластическими ресурсами и уровнем метаболизма, как гепатопанкреас. Тем не менее, жабры и в норме испытывают высокую окислительную нагрузку в силу функций фильтрации и газообмена. Однако при голодании интенсивность данных процессов, очевидно, существенно снижается на фоне общего падения скорости метаболизма. Это могло послужить причиной снижения уровня ПОЛ и активации в жабрах анадары показателей АГС — основной защитной системы жабр моллюсков, которая создает в них глутатион-зависимый защитный барьер и обеспечивает антиоксидантно-прооксидантное равновесие (Trevisan et al., 2016). Наши результаты также показали, что основную АО защиту жабр анадары при голодании, вероятно, обеспечивают ферменты ГП, ГР и ресурс GSH, в то время как активность ключевых ферментов СОД и каталазы не изменяется.

Тем не менее в жабрах отмечены наиболее высокие значения коэффициента корреляции r при голодании (для активности ГП и ГР — 0.985 ; для активности СОД и уровня глутатиона -0.793), а также в обеих группах (контрольная и голодание) для активности ГП и уровня глутатиона (0.814 и 0.870), активности СОД и каталазы (0.880 и 0.900). Это подчеркивает особую роль разных компонентов АО системы в защите жабр от окислительного повреждения ввиду уязвимости данного органа при различных неблагоприятных воздействиях.

Отсутствие изменений активности СОД и каталазы в жабрах и ноге анадары, выявленное нами при дефиците пищи, косвенно подтверждают и результаты исследования активности генов, кодирующих эти ферменты. У моллюска *Laternula elliptica* (King and Broderip, 1832) при голодании были выявлены лишь незначительные изменения в экспрессии данных генов в ответ на отсутствие пищи (Husmann et al., 2014), что указывает на высокую устойчивость АО системы этого моллюска.

Общие процессы. Полученные результаты могут быть связаны с рядом общих для организма процессов при голодании.

Известно, что на начальных этапах действия стресс-факторов, в том числе голодания, как правило, происходят активизация метаболизма, поддержание уровня энергетических субстратов, а затем, напротив, снижение интенсивности метаболизма, сокращение количества основных питательных веществ (углеводов, липидов, белков), падение уровня биосинтеза и общее истощение организма (Горомосова, Шапиро, 1984; Зайчик, Чурилов, 2001). В работе Головиной (2019) показано, что голодание анадары в течение 16 сут привело к снижению активности ЛДГ и увеличению активности МДГ, и, как следствие, — к росту индекса МДГ/ЛДГ в 2 раза в мышечной ткани анадары, а затем — к снижению этого индекса к 65-м сут голодания. Это указывает на постепенное истощение энергетических резервов моллюска при длительном голодании и подтверждает общую тенденцию к адаптации к стрессорному воздействию, в том числе к пищевой депривации.

У брюхоногого моллюска *Nacella concinna* после 1 мес. голодания также отмечали рост АО показателей — активности СОД, каталазы и ресурса GSH. Примечательно, что существенный рост уровня ПОЛ и содержания белка у моллюска наблюдали только в течение первой недели голодания, а затем данные показатели вернулись к исходным значениям (Ansaldi et al., 2007). Это позволяет предположить, что активация АО комплекса в таких условиях, вероятно, сдерживала рост ПОЛ и способствовала поддержанию АО-прооксидантного баланса. Сходные результаты в изменении общего содержания белка и интенсивности его синтеза в тканях в условиях пищевой депривации получены и для анадары (Андреев и др., 2009; Shcherban, 2012).

Подобные процессы при голодании у моллюсков подтверждены и в ряде других исследований. У пресноводного моллюска *Pila globosa* (Swainson, 1822) в периоды гипометаболизма (летняя спячка, пробуждение, голодание) общее число гемоцитов было выше, чем во время обычной активности, при этом в тканях моллюска отмечали высокий уровень генерации O_2^- и оксида азота. В гемоцитах голодавших моллюсков была выявлена наибольшая активность СОД и каталазы, несмотря на снижение уровня белка (Bhunja et al., 2016). Это может быть связано с тем, что гемоциты моллюсков генерируют ряд цитотоксических молекул, таких как O_2^- и оксид азота, необходимых для осуществления фагоцитоза — важнейшего процесса иммунной защиты (Manduzio et al., 2005; Bhunja et al., 2016). Данные защитные реакции особенно важны при стрессе, в том числе в условиях голодания. Очевидно, что интенсивнее

они могут протекать в гепатопанкреасе исследованной нами анадары, где высока общая метаболическая активность. При голодании в гепатопанкреасе усиливаются процессы катаболизма многих веществ и структур клетки, что также ведет к росту уровня АФК (Manduzio et al., 2005). Эти процессы (иммунные и детоксикации) могут объяснить выявленный нами в гепатопанкреасе голодавшей анадары рост активности СОД и каталазы, которые регулируют уровень O_2^- и пероксида водорода в клетке, а также защищают ткани от окислительного повреждения.

Необходимо рассмотреть и усиление активности отдельных АО ферментов, выявленное нами при голодании у анадары. Так, рост активности ГР в гепатопанкреасе и ноге моллюска может быть обусловлен ростом активности основного фермента пентозофосфатного шунта — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ). Г6ФДГ поддерживает клеточный пул НАДФН, необходимый в работе ГР по восстановлению глутатиона — ключевого низкомолекулярного антиоксиданта. Усиление активности Г6ФДГ при голодании показано в гепатопанкреасе наземного моллюска *Olivella lactea*: обнаружено две изоформы этого фермента, одна из которых более активна у питающихся моллюсков, а другая — у голодающих (Ramnanan, Storey, 2006). К сожалению, подобная информация о морских моллюсках отсутствует. Если допустить наличие особой изоформы Г6ФДГ и в тканях анадары при голодании, то это может прямо влиять на активность ГР и обеспечивать в условиях стресса рост ее активности. Это необходимо для поддержания ресурса GSH, критически важного для АО-прооксидантного равновесия в клетке. Дополнительным аргументом в пользу активации Г6ФДГ могут служить и изменения в углеводном метаболизме. Как известно, во время голодания содержание глюкозы в тканях снижается (Зайчик, Чурилов, 2001; Shikata, Shimeno, 1997). Для восполнения дефицита глюкозы активизируются процессы глюконеогенеза с участием свободных аминокислот. Так, у черноморской анадары *Anadara inaequalis* (Bruguiera, 1789), голодавшей 18 сут, уровень свободных аминокислот снижался, что связывают отчасти и с глюконеогенезом (Андреев и др., 2009).

Выявленное нами увеличение активности ряда АО ферментов у анадары при голодании может быть и результатом дефицита в рационе питания низкомолекулярных веществ, таких как аскорбиновая кислота, α -токоферол и каротиноиды, которые являются хорошо известными антиоксидантами. Дефицит этих соединений может стать критическим фактором для АО статуса голодающих животных (Albentosa et al., 2007). Анадара *A. kagoshimensis* отличается высоким содержанием и разнообразием каротиноидов, особенно в

ноге (Golovina et al., 2016). Как ранее показал корреляционный анализ, каротиноиды, обладающие АО действием, в тканях анадары проявляют положительную взаимосвязь с уровнем GSH, но отрицательную — с активностью ГП, ГР, СОД и каталазы, что может быть обусловлено конкурентными отношениями этих двух систем за одни и те же субстраты (Gostyukhina et al., 2013). Возможно, снижение уровня каротиноидов и других низкомолекулярных антиоксидантов в отсутствие пищи приводит к компенсаторной активации АО ферментов, утилизирующих те же виды АФК, что и каротиноиды. Это позволяет моллюску поддерживать в тканях необходимый АО-прооксидантный баланс. Ранее нами показано, что в тканях анадары подобный баланс поддерживается благодаря эффективному взаимодействию и частично-му замещению функций друг друга компонентами низкомолекулярного и ферментного звена АО комплекса (Гостюхина, Андреев, 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в тканях двустворчатого моллюска-вселенца *Anadara kagoshimensis* в условиях 30-суточного голодания реакции АО комплекса и ПОЛ имели тканевую специфику. Интенсивность ПОЛ снижалась в гепатопанкреасе и ноге, тогда как в жабрах оставалась неизменной. Наиболее выраженные реакции АО комплекса выявлены в гепатопанкреасе, что проявлялось в росте активности всех исследованных ферментов и ресурса глутатиона. В ноге анадары отмечено увеличение уровня глутатиона и активности ГП и ГР. В жабрах моллюска, в отличие от гепатопанкреаса и ноги, отмечено увеличение только активности ГП и уровня глутатиона на фоне постоянного уровня ПОЛ. В антиоксидантных реакциях в тканях голодавших моллюсков преобладали глутатион и ферменты глутатионовой системы. Выявленные реакции АО комплекса и ПОЛ у анадары при 30-суточном голодании свидетельствуют об устойчивом антиоксидантно-прооксидантном равновесии в тканях моллюска в этих условиях. Полученные результаты расширяют представления о функциональном разнообразии адаптационных реакций *A. kagoshimensis* при голодании.

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 подготовлена по темам государственного задания ФИЦ ИнБЮМ “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” (№ 0556-2021-0003) № гос. регистрации 121041400077-1 на 2022–2023 гг. и “Закономерности организации иммунной системы промысловых гидробионтов и исследование влияния факторов внешней среды на функционирование их защитных систем”, № гос. регистрации 121102500161-4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреев Т.И., Солдатов А.А., Головина И.В. Особенности реорганизации тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* (Bruguiere, 1778) в условиях экспериментального голодания // Мор. экол. журн. 2009. Т. 8. № 3. С. 15–24.
- Анистратенко В.В., Халиман И.А. Двустворчатый моллюск *Anadara inaequalis* (Bivalvia, Arcidae) в северной части Азовского моря: завершение колонизации Азово-Черноморского бассейна // Вестн. зоологии. 2006. Т. 40. № 6. С. 505–511.
- Головина И.В. Устойчивость к негативным воздействиям и соотношение активности ферментов энергетического обмена в тканях черноморских моллюсков *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 и *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // Мор. биол. журн. 2019. Т. 4. № 3. С. 37–47.
- Горомосова С.А., Шапиро А.З. Основные черты биохимии энергетического обмена у мидий. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1984. 120 с.
- Гостюхина О.Л., Андреев Т.И. Тканевый обмен и состояние антиоксидантного комплекса у черноморских моллюсков *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 и *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) с разной устойчивостью к окислительному стрессу // Биол. моря. 2019. Т. 45. С. 197–207.
- Гостюхина О.Л., Головина И.В. Особенности системы антиоксидантной защиты тканей черноморской камбалы калкан при кратковременном голодании // Доповіді НАН України. 2011. № 4. С. 143–147.
- Истомина А.А., Челомин В.П. Влияние совместного действия голодания и меди на антиоксидантную систему *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) // Изв. Самарского научного центра РАН. 2018. Т. 20. № 5. С. 97–103.
- Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Основы патохимии. В 3 т.: Т. 2. Патофизиология. СПб.: ЭЛБИ. 2001. 687 с.
- Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Под ред. Е.Б. Меньшиковой, В.З. Ланкина, И.А. Бондарь и др. М.: Фирма “Слово”. 2006. 556 с.
- Путилина Ф.Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях // Методы биохимических исследований. Л.: Изд-во ЛГУ. 1982. С. 183–187.
- Ревков Н.К. Особенности колонизации Черного моря недавним вселенцем — двустворчатым моллюском

- Anadara kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae) // Мор. биол. журн. 2016. Т. 1. № 2. С. 3–17.
- Солдатов А.А., Андреев Т.И., Головина И.В., Столбов А.Я. Особенности организации тканевого метаболизма у моллюсков с различной толерантностью к внешней гипоксии // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2010. Т. 46. № 4. С. 341–349.
- Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. Роль каротиноидов в профилактике наиболее распространенных заболеваний // Рос. биотерапевт. журн. 2010. Т. 9. № 1. С. 77–86.
- Albentosa M., Fernandez-Reiriz M.J., Labarta U., Pérez-Camacho A. Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: physiological and biochemical parameters // Comp. Biochem. Physiol. 2007. V. 146. № 2. P. 241–249.
- Almeid A.E., Di Mascio P. Hypometabolism and antioxidative defense systems in marine invertebrates // Hypometabolism: Strategies of Survival in Vertebrates and Invertebrates. ISBN: 978-81-308-0471-2 / Ed. A. Nowakowska. Moscow: Caputa, 2011, P. 39–55.
- Ansaldo M., Sacristan H., Wider E. Does starvation influence the antioxidant status of the digestive gland of *Nacella concinna* in experimental conditions? // Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol. 2007. V. 146. № 1–2. P. 118–123.
- Bhunja A.S., Mukherjee S., Bhunia N.S. et al. Immunological resilience of a freshwater Indian mollusk during aestivation and starvation // Aquacult. Rep. 2016. V. 3. P. 1–11.
- Gao L., Chen L., Song B. Effect of starvation and compensatory growth on feeding, growth and body biochemical composition in *Acipenser schrenckii* juveniles // J. Fish. China. 2004. V. 28. № 3. P. 279–284.
- Golovina I.V., Gostyukhina O.L., Andreyenko T.I. Specific metabolic features in tissues of ark clam *Anadara kagoshimensis* Tokunaga, 1906 (Bivalvia: Arcidae), a Black Sea invader // Russ. J. Biol. Invasions. 2016. V. 7. № 2. P. 137–145.
- Gostiukhina O.L., Golovina I.V. Comparative analysis of antioxidant complex of the Black Sea mollusks *Mytilus galloprovincialis*, *Anadara inaequivalvis* and *Crassostrea gigas* // Hydrobiol. J. 2013. V. 49. № 3. P. 77–84.
- Gostyukhina O.L., Soldatov A.A., Golovina I.V., Borodina A.V. Content of carotenoids and the state of tissue antioxidant enzymatic complex in bivalve mollusc *Anadara inaequivalvis* Br. // J. Evol. Biochem. Physiol. 2013. V. 49. № 3. С. 309–315.
- Goth L.A. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range // Clin. Chim. Acta. 1991. V. 196. № 2–3. P. 143–151.
- Hermes-Lima M., Storey K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail // Am. J. Physiol., Regular, Integrated and Comp. Physiol. 1995. V. 268. № 6. P. 1386–1393.
- Husmann G., Abele D., Rosenstiel P. et al. Age-dependent expression of stress and antimicrobial genes in the hemocytes and siphon tissue of the Antarctic bivalve, *Laternula elliptica*, exposed to injury and starvation // Cell Stress and Chaperones. 2014. V. 19. № 1. P. 15–32.
- Manduzio H., Rocher B., Durand F. et al. The point about oxidative stress in mollusks: A review // ISJ. 2005. V. 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. № 4. P. 664–676.
- Miyamoto Y., Iwanaga C. Effects of sulphide on anoxia-driven mortality and anaerobic metabolism in the ark shell *Anadara kagoshimensis* // J. Mar. Biol. Association UK. 2017. V. 97. № 2. P. 329–336.
- Moore M.N., Viarengo A., Donkin P., Hawkins A.J. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels // Aquat. Toxicol. 2007. V. 84. № 1. P. 80–91.
- 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. № 2. P. 849–854.
- Novitskaya V.N., Soldatov A.A. Peculiarities of functional morphology of erythroid elements of hemolymph of the Bivalve mollusk *Anadara inaequivalvis*, the Black Sea // Hydrobiol. J. 2013. V. 49. № 6. P. 64–71.
- Nowakowska A., Swiderska-Kolacz G., Rogalska J., Caputa M. Antioxidants and oxidative stress in *Helix pomatia* snails during estivation // Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol. 2009. V. 150. № 4. P. 481–486.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Anal. Biochem. 1979. V. 95. № 2. 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. № 1. P. 158–169.
- Ramnanan C.J., Storey K.B. Glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation during hypometabolism // Biochem. Biophys. Res. Com. 2006. V. 339. № 1. P. 7–16.
- Ramos-Vasconcelos G.R., Hermes-Lima M. Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa* // J. Exp. Biol. 2003. V. 206. № 4. P. 675–685.
- Sidorov A.V., Maslova G.T. Antioxidant defense in the central nervous ganglions of mollusk *Lymnaea stagnalis* // Proc. Natl. Acad. Sci., Belarus, Biol. ser. 2009. № 1. P. 91–95.
- Shcherban S.A. Tissue peculiarities of the protein anabolism in bivalve mollusk *Anadara inaequivalvis* in norm, under food deficit and anoxia // Hydrobiol. J. 2012. V. 48. № 2. P. 21–29.
- Shikata T., Shimeno S. Effects of feed restriction and starvation on fatty acid synthesis and oxidation of glucose and alanine in carp hepatopancreas // Fish. Sci. Tokyo. 1997. V. 63. № 2. P. 301–303.
- 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. 105–119.
- Zhang C.J., Liu J., Chen J.H. et al. Effects of starvation and refeeding on digestive enzyme activity and antioxidative capacity of razor clam (*Sinonovacula constricta*) // J. Fish. China. 2010. V. 34. № 7. P. 1106–1112.

The Effect of Starvation on the Antioxidant Complex of the Bivalve Mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) from the Black Sea

O. L. Gostyukhina^a and A. A. Soldatov^{a, b}

^a*A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia*

^b*Sevastopol State University, Sevastopol 299053, Russia*

The effect of 30-day starvation on the state of the antioxidant complex and lipid peroxidation in the tissues of the Black Sea bivalve mollusks *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) was studied. Mollusks were collected on a mussel and oyster farm near the village Katsiveli (the Southern coast of Crimea, the Black Sea) on April 2020. The mollusks were kept in aquariums with a closed water exchange system with biofiltration of water. The mollusks of the experimental group were not fed for 30 days. The activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase, catalase, the content of reduced glutathione and TBA-reactive products were determined. It was found that under fasting conditions the content of TBA-reactive products decreased in the hepatopancreas and the foot of the mollusk, and did not change in the gills. The most pronounced changes in the AO complex – an increase in all the studied parameters – were detected in the hepatopancreas. An increase only in the parameters of the antioxidant glutathione system was found in the foot, and an increase only in the activity of glutathione peroxidase and in the content of reduced glutathione was found in the gills. The results obtained in the study have shown a stable antioxidant-prooxidant balance in the bivalve mollusk *A. kagoshimensis* under starvation conditions.

Keywords: starvation, fasting (food deprivation), glutathione peroxidase, glutathione reductase, reduced glutathione, superoxide dismutase, catalase, lipid peroxidation, *Anadara kagoshimensis*