

УДК 546.48:577.115:594.1

Н. Н. Фокина, О. Б. Васильева, Т. Р. Руоколайнен

ОЦЕНКА СОСТАВА ЛИПИДОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ОКИСЛЕНИЯ В ГЕПАТОПАНКРЕАСЕ ANODONTA SPP. ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ КАДМИЯ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук

Россия, 185910, Петрозаводск, Пушкинская ул., дом 11

E-mail: fokinann@gmail.com

Исследовано экспериментальное воздействие кадмия в различных концентрациях (10, 50 и 100 мкг/л) в течение 1 и 3 суток на состав липидов и продуктов их перекисного окисления в гепатопанкреасе пресноводных моллюсков *Anodonta* spp. Показано повышение концентрации продуктов перекисного окисления липидов, уровня фосфолипидов, холестерина и триацилглицеринов на первые сутки эксперимента. На третьи сутки воздействия кадмия происходило накопление фосфатидилсерина. Обсуждается возможность использования исследованных показателей в качестве биомаркеров при индикации состояния моллюсков *Anodonta* spp. в условиях загрязнения окружающей среды.

Ключевые слова: фосфолипиды; триацилглицерины; малоновый диальдегид; двустворчатые моллюски; кадмий; токсикология.

EVALUATION OF THE LIPIDS AND THEIR PEROXIDATION PRODUCTS CONTENT IN THE DIGESTIVE GLANDS OF ANODONTA SPP. UNDER CADMIUM EFFECT

N. N. Fokina, O. B. Vasil'eva, T. R. Ruokolainen

Institute of Biology, Karelian Research Centre of Russian Academy of Sciences.

11, Pushkinskaya ul., Petrozavodsk, 185910, Russia

E-mail: fokinann@gmail.com

The effect of different cadmium concentrations (10, 50 and 100 µg/L) for 1 and 3 days on the content of lipids and of their peroxidation products in the digestive glands of freshwater bivalves *Anodonta* spp. was experimentally studied. Increases in the concentration of lipid peroxidation products, phospholipids, cholesterol and triacylglycerols were revealed after the first day of the experiment. On the third day of the cadmium exposure, accumulation of phosphatidylserine was observed. The suitability of the studied biochemical indices as biomarkers of the bivalves' health under environmental pollution was discussed.

Keywords: phospholipids; triacylglycerols; malonic dialdehyde; bivalves; cadmium; toxicology.

Среди большого числа токсикантов, поступающих в среду обитания гидробиотнотов, наибольшее внимание привлекают металлы. Их появление в окружающей среде связано не только с хозяйственной деятельностью человека, но и с некоторыми природными явлениями, в частности кадмий может попадать в водные экосистемы в результате вымывания из кадмий-обогащенных почв и пород, вулканической активности и других процессов [1]. При этом он накапливается в донных отложениях, оказывая токсическое действие на водные организмы [2]. Несмотря на то, что воздействие металлов на живые системы отражается на уровне популяции и экосистемы, первичные изменения происходят в организме, на биохимическом и молекулярном уровнях [3, 4]. Металлы могут изменять структуру

биологических мембран, активируя процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) [5–7]. Мембранные липиды, главным образом фосфолипиды и полиненасыщенные жирные кислоты в их составе, являются основной мишенью для действия активных форм кислорода [7]. При этом известно, что токсичность кадмия определяется не его непосредственным участием в образовании активных форм кислорода (реакции по типу Фентона), а в ингибировании активности антиоксидантных ферментов, стимулируя тем самым процессы ПОЛ [5, 7]. При окислении липидов образуются диеновые конъюгаты и диенкетоны, которые можно рассматривать как первичные продукты ПОЛ. Дальнейшее их окисление приводит к образованию широкого спектра соединений, в том числе и малонового диальдегида [8].

Избыточная активация процессов свободно радикального окисления липидов может привести к накоплению токсичных продуктов окисления и, как следствие, повреждению и увеличению проницаемости клеточных мембран, окислительной модификации структурных белков, ферментов, биологически активных веществ [9]. Согласно общепринятым концепциям, высокая скорость ПОЛ является основным универсальным механизмом повреждения и гибели клеток. Продукты перекисного окисления липидов широко используются в экологических исследованиях в качестве биомаркеров окислительного стресса при оценке влияния различных токсикантов, в том числе и тяжелых металлов [8, 10–12]. К тому же воздействие поллютантов различной природы, в том числе металлов, приводит к накоплению нейтральных липидов (триацилглицеринов) в тканях водных организмов. Накопление триацилглицеринов в гепатопанкреасе гидробионтов также служит биомаркером загрязнения среды обитания и свидетельствует о протекании процессов аутофагии [13]. В связи с этим, исследование состава липидов (триацилглицеринов, холестерина и индивидуальных фракций фосфолипидов), а также продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов, диенкетонов и малонового диальдегида) в гепатопанкреасе пресноводных моллюсков *Anodonta* spp. позволит выявить биохимические маркеры, характеризующие токсическое действие кадмия на них. Поскольку двустворчатые моллюски накапливают из окружающей среды высокие концентрации загрязняющих веществ различной природы, они используются в качестве вида-индикатора в биомониторинговых исследованиях состояния акваторий, а также в экотоксикологических исследованиях биологических эффектов накопления металлов в организме [14].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали моллюсков рода *Anodonta* spp. (Сем. *Unionidae*), собранных на реке Суна (Кондопожский район, Республика Карелия), размер составлял 71.7 ± 3.8 мм. На базе аквариального комплекса ИБ КарНЦ РАН (г. Петрозаводск) был проведен эксперимент по изучению влияния кадмия в различных концентрациях на моллюсков *Anodonta* spp. В ходе эксперимента моллюски содержались в аквариумах с различной концентрацией ионов кадмия: 10, 50 и 100 мкг/л. Для создания нужной концентрации ионов кадмия в аквариумы вносили рассчитанное количество водорастворимой соли хлорида кадмия (II). Контрольные моллюски находились в тех же лабораторных условиях, но не подвергались

воздействию кадмия. В ходе эксперимента моллюсков не кормили. По истечении времени эксперимента (24 и 72 часа) мягкие ткани *Anodonta* spp. ($n = 7$) фиксировали для проведения дальнейшего биохимического анализа. Образцы тканей, предназначенных для анализа продуктов перекисного окисления липидов, замораживали и хранили при температуре -80 °С. Для анализа состава липидов образцы тканей моллюсков фиксировали в 97 % этиловом спирте и хранили при $+4$ °С.

Биохимические исследования проводили с использованием оборудования центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН (г. Петрозаводск). Определение концентрации основных классов липидов и их отдельных фракций в мягких тканях *Anodonta* spp. проводили методами тонкослойной [15] и высокоэффективной жидкостной [16] хроматографии, а также спектрофотометрии [15, 17]. Содержание диеновых конъюгатов (ДК) и диенкетонов (Д) оценивали используя методику Гаврилова и др. [18]: ДК и Д экстрагировали смесью гептан: изопропиловый спирт (1:1) и затем фотометрировали гептановую фракцию. Концентрацию диеновых конъюгатов и диенкетонов рассчитывали с учетом разведения с использованием молярного коэффициента. Концентрацию малонового диальдегида определяли по методике Стальной и Гаришвили [19] путем взаимодействия гомогената тканей исследуемых образцов с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) в кислой среде. Экспозиция опыта составляла 45 минут при температуре 100 °С. Количественное содержание экстрагированных бутанолом ТБК-продуктов оценивали спектрофотометрически и рассчитывали с учетом разведения и коэффициента пересчета. Концентрацию продуктов ПОЛ выражали в нмоль/г ткани.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) носят общебиологический характер и являются необходимым звеном в метаболических процессах у гидробионтов [20]. Непременным условием осуществления ПОЛ и начальным этапом его развития служит образование активных форм кислорода. Мембранные липиды, главным образом, фосфолипиды представляют собой основную мишень для действия активных форм кислорода [9]. Как правило, ответная реакция на токсическое действие сопровождается увеличением интенсивности перекисных процессов, оце-

нить которую можно по накоплению первичных продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов (ДК) и диенкетонов (Д), и одного из вторичных метаболитов ПОЛ — малонового диальдегида (МДА). В результате проведенного исследования установлено возрастание уровня продуктов ПОЛ в гепатопанкреасе моллюсков в ответ на действие кадмия в различных концентрациях (рис. 1). При этом на первые сутки эксперимента содержание диеновых конъюгатов, диенкетонов и малонового диальдегида было ниже при концентрации кадмия 100 мкг/л по сравнению с другими опытными вариантами (рис. 1). Вероятно, это указывает на активацию антиоксидантной системы (АОС) у моллюсков из данного аквариума в условиях суточного воздействия кадмия. В ранее проведенных исследованиях была установлена

компенсаторная роль ключевых ферментов АОС у моллюсков при индуцированном кадмием окислительном стрессе [21–23]. К третьим суткам эксперимента меняется характер распределения исследуемых показателей: уровень продуктов ПОЛ у моллюсков из аквариумов с концентрацией кадмия 10 и 50 мкг/л снижается (за исключением содержания ДК при 10 мкг/л) (рис. 1). И, напротив, наблюдаются более высокие концентрации ДК, Д и МДА у моллюсков из аквариума с концентрацией кадмия 100 мкг/л. Возможно, для интенсификации окислительного стресса, и, как следствие, накопления продуктов ПОЛ в гепатопанкреасе, определяющее значение имеет сочетанное влияние длительности воздействия и его интенсивности (в данном случае — концентрации ионов кадмия).

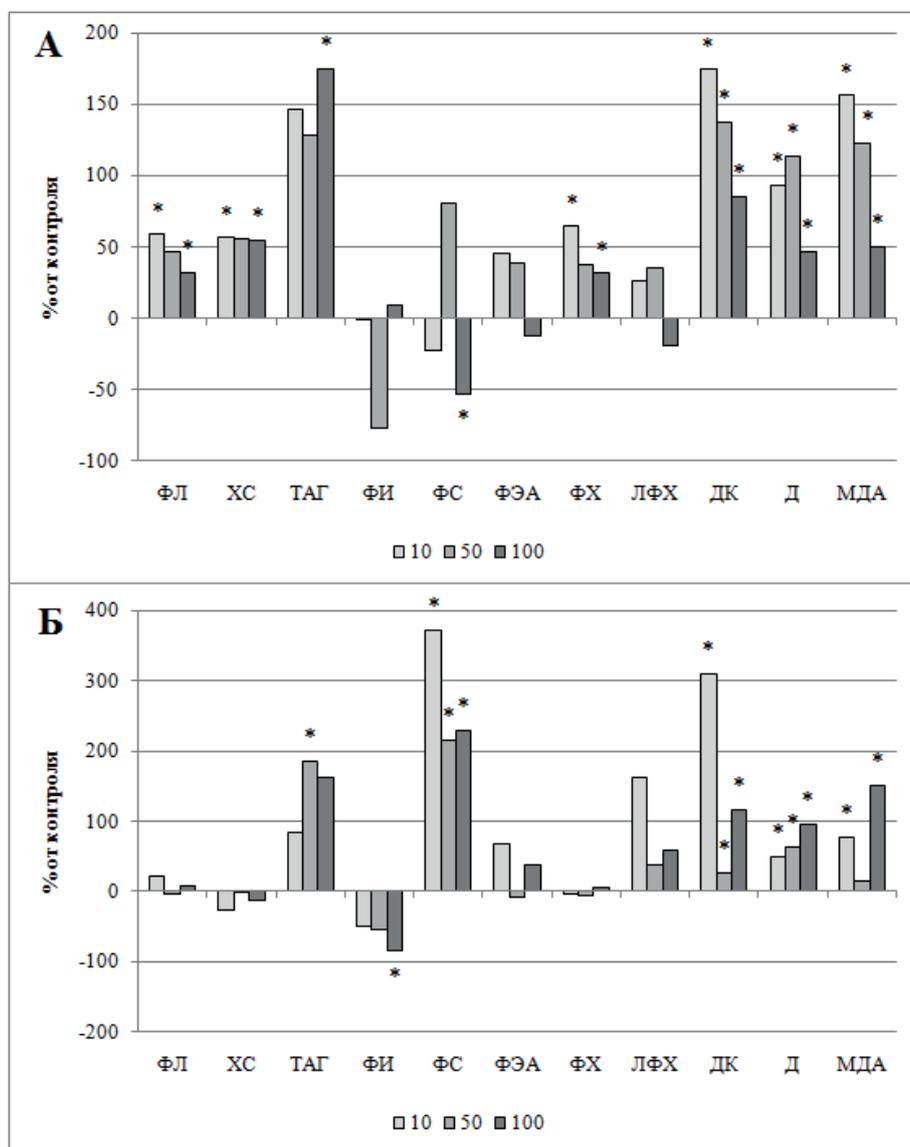


Рис. 1. Изменение содержания липидов и продуктов их окисления (% от контроля) в гепатопанкреасе моллюсков *Anodonta* spp. в ответ на действие различных концентраций кадмия (10, 50 и 100 мкг/л) на протяжении 1 (А) и 3 (Б) суток.

Несмотря на выявленную активацию процессов ПОЛ в гепатопанкреасе *Anodonta* spp. уже на первые сутки воздействия кадмия в различных концентрациях, у них было выявлено повышение концентрации фосфолипидов (ФЛ), главным образом доминирующего фосфолипида мембран — фосфатидилхолина (ФХ) (рис. 1), при влиянии 10 и 100 мкг/л кадмия. При этом отмечалось повышение концентрации холестерина (ХС), который может быть необходим клеткам для регуляции проницаемости мембран. Как известно, вследствие активации процессов ПОЛ нарушается структура мембранных фосфолипидов и повышается проницаемость мембран [9]. Необходимо отметить, что ранее нами было показано значительное снижение концентрации ХС и ФХ в гепатопанкреасе морских мидий *Mytilus edulis* уже на первые сутки воздействия кадмия, что свидетельствовало о деструктивных изменениях в структуре мембран [24]. Вероятно, пресноводные моллюски *Anodonta* spp. обладают адаптивными биохимическими механизмами, направленными на поддержание структурной целостности мембран при токсическом действии кадмия, в отличие от морских моллюсков. Однако, на первые сутки эксперимента (при влиянии 100 мкг/л кадмия) в гепатопанкреасе *Anodonta* spp. установлено снижение концентрации фосфатидилсерина (ФС), которая в дальнейшем (на третьи сутки эксперимента) значительно увеличивалась (при влиянии 10, 50 и 100 мкг/л кадмия). Подобный эффект накопления ФС в ответ на токсическое действие металлов был отмечен нами у мидий *Mytilus edulis*, главным образом в жабрах, при влиянии кадмия и меди [24]. Учитывая важную роль ФС в регуляции активности мембранно-связанных ферментов, в том числе Na^+K^+ -АТФазы

[25], индуцированное кадмием накопление данного ФЛ в составе мембран позволяет использовать ФС в качестве универсального биомаркера, изменение концентрации которого отражает негативное воздействие среды обитания как на морских, так и на пресноводных моллюсков.

Нами установлено, что воздействие кадмия на моллюсков *Anodonta* spp. определялось не только модификацией изученных мембранных компонентов, но также затрагивало изменения в содержании энергетических (запасных) липидов. Выявлено накопление триацилглицеринов (ТАГ) в гепатопанкреасе *Anodonta* spp. на первые и третьи сутки эксперимента, главным образом при влиянии 50 (3 сутки) и 100 (1 сутки) мкг/л кадмия свидетельствует об активации процессов аутофагии. Считается, что повышение уровня ТАГ может быть вызвано увеличением числа лизосом и/или аутофагосом, обеспечивающих процессы аутофагии в клетках гепатопанкреаса [13]. Подобные стресс-индуцируемые изменения в этих клетках были отмечены у моллюсков в условиях антропогенного воздействия [13, 24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, обнаруженные изменения изученных биохимических показателей в гепатопанкреасе *Anodonta* spp. в условиях аквариального эксперимента указывают на развитие ответной реакции организма на действие ионов кадмия в различной концентрации. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования липидов и продуктов их перекисного окисления в качестве биомаркеров при индикации состояния моллюсков в условиях загрязнения окружающей среды.

Благодарности

Авторы выражают благодарность с. н. с. лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН к. б. н. И. В. Суховской за помощь в постановке эксперимента. Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств проекта РФФИ №17-04-01431_a.

Литература

1. Ravera O. Cadmium in freshwater ecosystems // Cellular and Molecular Life Sciences. 1984. Vol. 40. No. 1. P. 1–14.
2. Macklin M. G. The significance of pollution from historic metal mining in the Pennine orefields on river sediment contaminant fluxes to the North Sea / M. G. Macklin, K. A. Hudson-Edwards, E. J. Dawson // Science of the total Environment. 1997. Vol. 194. P. 391–397.
3. Немова Н. Н. Биохимическая индикация состояния рыб / Н. Н. Немова, Р. У. Высоцкая. М.: Наука. 2004. 215 с.
4. Немова Н. Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб. М.: Наука. 2005. 164 с.
5. Viarengo A. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level // CRC Crit. Rev. Aquat. Sci. 1989. Vol.1. P. 295–317.
6. Челомин В. П. Биохимические механизмы адаптации мидии *Mytilus trossulus* к ионам кадмия и меди / В. П. Челомин, Н. Н. Бельчева, М. В. Захарцев // Биология моря. 1998. Т. 24. №. 5. С. 319–325.
7. Valko M. Metals, toxicity and oxidative stress / Valko M., Morris H., Cronin M. T. D. // Current Medicinal Chemistry. 2005. Vol. 12. No. 10. P. 1161–1208.

8. *Del Rio D.* A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress / *Del Rio D., Stewart A. J., Pellegrini N.* // *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2005. Vol. 15. No. 4. P. 316–28.
9. *Ayala A.* Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal / *Ayala A., Munoz M. F., Arguelles S.* // Hindawi Publishing Corporation, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014. Article ID 360438. 31 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>.
10. *Risso-de Faverney C.* An ecotoxicological approach with transplanted mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for assessing the impact of tyre reefs immersed along the NW Mediterranean Sea / *Risso-de Faverney C., Guibbolini-Sabatier M. E., Francour P.* // *Marine Environmental Research*. 2010. Vol. 70. P. 87–94.
11. *Belcheva N.* Using heavy metal content and lipid peroxidation indicators in the tissues of the mussel *Crenomytilus grayanus* for pollution assessment after marine environmental remediation / *Belcheva N., Istomina A., Dovzhenko N., Lishavskaya T., Chelomin V.* // *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 2015. Vol. 95. I. 4. P. 481–487.
12. *Hermenean A.* Histopathological alterations and oxidative stress in liver and kidney of *Leuciscus cephalus* following exposure to heavy metals in the Tur River, North Western Romania / *Hermenean A., Damache G., Albu P. et al.* // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015. Vol. 119. P. 198–205.
13. *Koukouzika N.* Aspects of the usefulness of five marine pollution biomarkers, with emphasis on MN and lipid content / *Koukouzika N., Dimitriadis V.K.* // *Marine Pollution Bulletin*. 2008. Vol. 56. No. 5. P. 941–949.
14. *Wadige C. P. M.* Exposure–dose–response relationships of the freshwater bivalve *Hyridella australis* to cadmium spiked sediments / *Wadige C. P. M., Maher W. A., Taylor A. M., Krikowa F.* // *Aquatic Toxicology*. 2014. Vol. 152. P. 361–371.
15. *Сидоров В. С.* Липиды рыб. 1. Методы анализа / *В. С. Сидоров, Е. И. Лизенко, О. М. Болгова, З. А. Нефедова* // Лососевые (*Salmonidae*) Карелии. Вып.1. Экология. Паразитофауна. Биохимия. Петрозаводск: КФАН СССР. 1972. С. 150–163.
16. *Arduini A.* High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies / *Arduini A., Peschechera A., Dottori S., Sciarroni A. F., Serafini F., Calvani M.* // *Journal of Lipid Research*. 1996. Vol. 37. P. 684–689.
17. *Engelbrecht F. M.* Cholesterol. Determination in Serum. A Rapid Direction Method / *Engelbrecht F.M., Mari F., Anderson J. T.* // *S.A. Med. J.* 1974. Vol. 48 (7). P. 250–256.
18. *Гаврилов В. Б.* Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой / *В. Б. Гаврилов, А. П. Гаврилова, Л. М. Мажуль* // *Вопросы медицинской химии*. 1987. № 1. С. 118–121.
19. *Стальная И. Д.* Метод определения малонового диальдегида / *И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили* // *Современные методы в биохимии под ред. Ореховича В. Н.* 1997. С. 66–68.
20. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems* / ed. by *Abele, D., Vázquez-Medina, J. P., Zenteno-Savín, T.*, Chichester: Wiley-Blackwell, 2012. 524 p.
21. *Dovzhenko N. V.* Cadmium-induced oxidative stress in the bivalve mollusk *Modiolus modiolus* / *Dovzhenko N. V., Kurilenko A.V., Bel'cheva N.N., Chelomin V.P.* // *Russian Journal of Marine Biology*. 2005. Vol. 31. No. 5. P. 309–313.
22. *Jena K.B.* Application of oxidative stress indices in natural populations of *Perna viridis* as biomarker of environmental pollution / *Jena K. B., Verlecar X. N., Chainyb G. B. N.* // *Marine Pollution Bulletin*. 2009. Vol. 58. No. 1. P. 107–113.
23. *Klimova Y. S.* The use of biomarkers of oxidative stress in zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) for chronic anthropogenic pollution assessment of the Rybinsk reservoir / *Klimova Y. S., Chuiko G. M., Gapeeva M. V., Pesnya D. S.* // *Contemporary Problems of Ecology*. 2017. Vol. 10. No. 2. P. 178–183.
24. *Fokina N. N.* Changes of blue mussels *Mytilus edulis* L. lipid composition under cadmium and copper toxic effect / *Fokina N. N., Ruokolainen T. R., Nemova N. N., Bakhmet I. N.* // *Biological Trace Element Research*. 2013. Vol. 154. No. 2. P. 217–225.
25. *Болдырев А. А.* Na/K-АТФаза — свойства и биологическая роль / *А. А. Болдырев* // *Соросовский образовательный журнал*. 1998. № 4. С. 2–9.

Краткая информация об авторах:

Фокина Наталья Николаевна, к. б. н.

Старший научный сотрудник, лаборатории экологической биохимии

Специализация: исследование состава липидов и их жирных кислот у морских и пресноводных двусторчатых моллюсков, экологическая биохимия

E-mail: fokinann@gmail.com

Fokina N. N., PhD (Biol.).

Senior Researcher, Laboratory of Environmental Biochemistry

Areas of interests: lipid and fatty acid composition of marine and freshwater bivalves, environmental biochemistry

E-mail: fokinann@gmail.com

Васильева Ольга Борисовна, к. б. н.

Старший научный сотрудник, лаборатории экологической биохимии

Специализация: исследование состава липидов и их жирных кислот у водных организмов, перекисное окисление липидов, экологическая биохимия

E-mail: olga_4428@mail.ru

Vasil'eva O. B., PhD (Biol.).

Senior Researcher, Laboratory of Environmental Biochemistry

Areas of interests: lipid and fatty acid composition of hydrobionts, products of lipid peroxidation, environmental biochemistry

E-mail: olga_4428@mail.ru

Руоколайнен Татьяна Рудольфовна, к. б. н.

Ведущий научный сотрудник, лаборатории экологической биохимии

Специализация: исследование фракционного состава фосфолипидов у водных организмов, экологическая биохимия

E-mail: truok@krc.karelia.ru

Ruokolainen T. R., PhD (Biol.).

Leading Researcher, Laboratory of Environmental Biochemistry

Areas of interests: phospholipid fraction composition of hydrobionts, environmental biochemistry

E-mail: truok@krc.karelia.ru