

## Особенности антиоксидантной активности тканей у представителей реофильного зообентоса по результатам хемилюминесцентного анализа

Г. В. МАКАРСКАЯ<sup>1,2</sup>, А. В. АНДРИАНОВА<sup>1,3</sup>, С. В. ТАРСКИХ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт вычислительного моделирования СО РАН  
660036, Красноярск, Академгородок, 50/44  
E-mail: [mgv@icm.krasn.ru](mailto:mgv@icm.krasn.ru)

<sup>2</sup> МНЦ ИЭСО при Президиуме КНЦ СО РАН  
660036, Красноярск, Академгородок, 50/44

<sup>3</sup> НИИЭРВ  
660097, Красноярск, ул. Парижской Коммуны, 33

Статья поступила 16.07.15

Принята к печати 15.02.16

### АННОТАЦИЯ

Адаптации живых организмов к условиям окружающей среды формируются и проявляются на самых различных уровнях – от молекулярного до биоценотического. В настоящее время метаболическая антиоксидантная система (АОС) считается ключевым звеном адаптационных процессов, а ее активация рассматривается как универсальный отклик биоты на негативное воздействие окружающей среды. Использование компонентов АОС в качестве биомаркеров стрессовых воздействий на гидробионтов активно внедряется и имеет большие перспективы в системе мониторинга водных экосистем. В данной работе проанализирована кинетика образования свободных радикалов у различных представителей зообентоса из р. Енисей (амфиподы, олигохеты, пиявки, хирономиды) и амфипод из р. Ус (малая горная река, приток Енисея). Параметры кинетики радикалообразования регистрировали методом люминолзависимой хемилюминесценции при иницировании оксидативного стресса перекисью водорода *in vitro* в гомогенатах тканей гидробионтов. Выявлено, что у амфипод, в отличие от других беспозвоночных, процесс антиоксидантной активности характеризуется двумя всплесками хемилюминесценции. Кроме того, у амфипод наблюдались межвидовые и возрастные отличия по параметрам кинетики генерации свободных радикалов. У *Gmelinoides fasciatus* Stebb. пик интенсивности генерации свободных радикалов и их общее количество за 60-минутный период регистрации достоверно превосходили данные показатели для *Gammarus* sp. и *Eulimnogammarus viridis* Dybowski. С возрастом наблюдалось увеличение объема продукции свободных радикалов у *E. viridis* и *Gammarus* sp. и снижение у *G. fasciatus*. Отмечено достоверно более высокое значение объема генерации свободных радикалов у *G. fasciatus* и *E. viridis*, обитающих в зоне р. Енисей с повышенной антропогенной нагрузкой.

**Ключевые слова:** р. Енисей, донные беспозвоночные, амфиподы, активные формы кислорода, антиоксидантная система, перекисное окисление липидов, хемилюминесцентный анализ.

Все живые организмы в той или иной степени зависят от факторов среды обитания, которые закономерно изменяются сезонно или непредвиденно по причине антропогенного влияния. Адаптации к условиям окружающей среды как универсальное биологи-

ческое явление формируются и проявляются на самых различных уровнях биологической организации – от молекулярного до биоценологического [Немова, Высоцкая, 2004]. Ведущую роль в этом ряду играют механизмы биохимических адаптаций, связанных с изменением количества уже имеющихся макромолекул в клетках или с образованием их новых типов, что реализуется на уровне изменений ферментативных систем, тонкой регуляции каталитической способности ферментов [Немова, Высоцкая, 2004]. Особое значение в поддержании гомеостаза живых организмов и проявлении у них адаптационного потенциала играют механизмы регуляции кислородного метаболизма, включающие в себя систему кооперативно действующих про- и антиоксидантных ферментов, витаминов, каротиноидов, металлов с переменной валентностью и устанавливающие строго определенный баланс между интенсивностью свободнорадикальных процессов, включая перекисное окисление липидов (ПОЛ), и антиоксидантной активностью (АОА) [Руднева, Шайда, 2012]. Антиоксидантный статус организма зависит как минимум от четырех факторов: строго определенной структурной организации липидов, активности антиоксидантных ферментов и ферментов, регулирующих обмен фосфолипидов клеточных мембран, а также от содержания низкомолекулярных антиоксидантов [Руднева, Шайда, 2012]. Сбои или отсутствие антиоксидантного статуса приводят к развитию окислительного стресса, возникновению и накоплению окислительных повреждений и, в конечном итоге, к возникновению патологических изменений [Меньщикова, Зенков, 1983]. В настоящее время метаболическая антиоксидантная система (АОС) считается ключевым звеном адаптационных процессов, а ее активация рассматривается как универсальный отклик биоты на негативное воздействие окружающей среды.

Использование компонентов АОС в качестве биомаркеров стрессовых воздействий на гидробионтов активно внедряется и имеет большие перспективы в системе мониторинга водных экосистем [Тимофеев, 2007; Шахматова, 2012; Lushchak, 2011]. Ранее нами проанализированы возрастные и сезонные

особенности иммуногематологических характеристик различных видов рыб, обитающих в разнотипных водных объектах [Макарская и др., 2003; 2006; Андрианова и др., 2013]. Имеются многочисленные сведения по определению антиоксидантного потенциала для нейтрализации активных форм кислорода в стрессовых условиях у разнообразных морских и пресноводных гидробионтов [Гордеева, Лабас, 2003; Livingstone, 2003; Amado et al., 2009; Lushchak, 2011; Руднева, Шайда, 2012; Gorokhova et. al., 2013]. Кроме того, некоторые клеточные механизмы стресс-ответа при интоксикации у амфипод, преимущественно байкальских эндемиков, освещены в работах группы российских ученых [Тимофеев, 2007; Тимофеев и др., 2008; Timofeyev et al., 2009; Шатилина и др., 2010].

Известно, что зарегулирование одной из главных водных артерий Сибири – р. Енисей плотиной Красноярской ГЭС – привело к глобальным изменениям в гидробиологическом режиме реки, в частности, в донных сообществах. Количественные характеристики зообентоса существенно выросли, особенно на участке от плотины до устья р. Ангара: численность – более чем в 2 раза, биомасса – в 5 раз. Доля амфипод в биомассе зообентоса увеличилась более чем в 10 раз, хирономид – в 9 раз, олигохет – в 40 раз. Основу биомассы современного зообентоса составляют амфиподы байкальского происхождения, распространившиеся через р. Ангара вверх по течению Енисея [Гладышев, Москвичева, 2002; Андрианова, 2013]. Особый отпечаток на трансформацию биологических сообществ в Енисей накладывает увеличивающееся антропогенное загрязнение. Только в районе г. Красноярска ежегодно сбрасывается около 600 млн м<sup>3</sup> условно очищенных сточных вод и 200 млн м<sup>3</sup> сточных вод без всякой очистки.

В этой связи особенно актуальным представляется внедрение высокочувствительных и показательных биомаркеров, таких как компоненты АОС, для оценки стрессовых воздействий на гидробионтов бассейна Енисея. Однако этому должно предшествовать изучение функциональных особенностей АОА у отдельных видов [Тимофеев, 2007].

Среди множества методов определения АОА веществ одним из высокочувствительных считается метод, основанный на хемилюминесценции, позволяющий получить интегральную характеристику активности всего комплекса факторов системы контроля радикалообразования исследуемого объекта. При этом интенсивность хемилюминесценции является мерой количества радикалов; введение антиоксидантов уменьшает количество радикалов, а вместе с этим падает и интенсивность хемилюминесценции [Владимиров, Проскурнина, 2009].

Цель работы – оценить уровень активности свободно-радикальных процессов у представителей зообентоса из различных таксономических групп, а также выявить межвидовые и возрастные особенности антиокислительного баланса амфипод, обитающих в р. Енисей и его притоке при разной степени антропогенной нагрузки.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Донных беспозвоночных (амфиподы, олигохеты, пиявки, хирономиды) отлавливали в среднем течении р. Енисей в весенне-летний период 2014 г. и весной 2015 г. на двух участках в левобережной зоне: выше (28–30 км от плотины Красноярской ГЭС) и ниже г. Красноярска (136–138 км от плотины). На верхнем участке отсутствуют крупные промышленные и хозяйственные объекты, поэтому он выбран в качестве фонового. Участок ниже г. Красноярска испытывает воздействие промышленных и хозяйственно-бытовых стоков города и характеризуется повышенным содержанием в воде тяжелых металлов (Fe, Cu, Mn, Ni, Cr), нитратов, нитритов и фосфора по сравнению с фоновым участком; кроме того, здесь отмечено превышение установленных российских нормативов для Al, фенолов и нефтепродуктов [Гладышев и др., 2012].

В июле 2014 г. для анализа собирали амфипод из малой горной р. Ус, являющейся правобережным притоком Енисея в его верхнем течении. Скорость течения в р. Ус колеблется от 0,72 до 2,11 м/с; температура воды редко превышает 12 °С; содержание растворенного кислорода в воде составляет

7,8 мг/л. Водоток слабоминерализован – 50 мг/л в единицах NaCl. Концентрация растворенного органического вещества колеблется от 0,9 до 5,2 мг/л. Значение БПК<sub>5</sub> (1,45 мгО<sub>2</sub>/л) соответствует градации “удовлетворительной чистоты”, однако отмечается превышение ПДК для тяжелых металлов (Cu, Zn, Mn) и нефтепродуктов [Андреанова, 2015].

Сбор донных беспозвоночных осуществляли гидробиологическим скребком или пробоотборником, доставляли в лабораторию в речной воде и сразу же подвергали анализу живых особей.

Для оценки возможных возрастных различий в антиоксидантной активности амфипод исследовали два вида из р. Енисей – *Eulimnogammarus viridis* Dybowsky и *Gmelinoides fasciatus* Stebb., а также один палеарктический вид из р. Ус, таксономический статус которого до конца не определен. Данный вид принадлежит роду *Gammarus* и, согласно В. В. Тахтееву с соавт. [Takhteev et al., 2015], с большой долей вероятности относится к очень крупной группе *pulex*. Сопоставляли три условные размерно-возрастные группы амфипод: “взрослые”, “средние” и “молодь”. Размер тела определяли от кончика рострума до тельсона, согласно М. А. Тимофееву [2007]. Для *G. fasciatus* и *Gammarus* sp. длина особей “средней” возрастной группы составила 8–11 мм, для *E. viridis* – 11–14 мм. К “взрослым” особям и “молоди” относили экземпляры соответственно длиннее и короче среднего интервала.

Для оценки антиокислительного баланса использовали подход [Методические рекомендации..., 2006], основанный на регистрации и определении параметров кинетики процесса радикалообразования при исследовании индуцированной перекисью водорода люминолзависимой хемилюминесценции супернатантов гомогенатов тканей гидробионтов. Без активации наблюдалась низкая интенсивность собственной хемилюминесценции [Владимиров, Проскурнина, 2009].

Образцы для определения антиоксидантной активности готовили путем гомогенизирования отловленных особей гидробионтов с добавлением раствора Хенкса (рН 7,4), центрифугирования при 3000 об/мин в течение

10 мин и отбора супернатанта; затем выравнивали разведением раствором Хенкса до 3,3 мг/мл по сырой биомассе.

Хемилюминесцентный анализ генерации свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК) супернатантами гомогенатов недифференцированных тканей гидробионтов проводили на аппаратурно-программном комплексе 36-канального термостатируемого “Хемилюминометра CL-3604” (СКТБ “Наука” СО РАН, г. Красноярск) и ПЭВМ [Макарская и др., 2003, 2006]. Время записи хемилюминесцентной кривой составляло 1 ч при температуре в регистрационной камере +20 °С.

В состав опытных образцов входили: 200 мкл супернатанта биологической ткани, 200 мкл  $2,2 \times 10^{-4}$  М люминола в растворе Хенкса (рН 7,2) и 200 мкл 10%-й  $H_2O_2$ . В контрольные регистрационные кюветы вместо биологического супернатанта добавляли 200 мкл раствора Хенкса.

О кинетике генерации свободных радикалов судили по кинетике хемилюминесцентной кривой, принимая во внимание наиболее информативные параметры: амплитуду максимальной активности хемилюминесцентной реакции ( $I_{max}$ , имп./с), время достижения максимальной величины хемилюминесценции ( $T_1$ , мин) и площадь под кривой хемилюминесценции ( $S$ , имп./ч), определяющей общее количество квантов, регистрируемых за время записи хемилюминесцентной кривой [Методические рекомендации..., 2006; Владимиров, Проскурнина, 2009].

Добавление гидроперекиси в биологические образцы инициировало перекисное окисление липидов и активацию метаболической АОС как универсального отклика на оксидативный стресс [Шахматова, 2012; Winston, Di-Giulio, 1991]. Хемилюминесцентный способ отслеживания процесса радикалообразования и их дисмутации позволил оценить адаптационные возможности кооперативного действия всей совокупности компонентов АОС при стресс-воздействии [Владимиров, Проскурнина, 2009].

Кинетика хемилюминесценции представляет собой двухфазную кривую, состоящую из быстрой фазы нарастания интенсивности свечения, характеризующей образование сво-

бодных радикалов из перекиси, т. е. прооксидантный эффект, и медленной фазы снижения интенсивности свечения при взаимодействии свободных радикалов с люминолом, характер которой в то же время зависит от присутствия и количественного содержания антиоксидантов определенного вида [Измайлов и др., 2011]. Наиболее значимая роль антиоксидантов заключается в подавлении образования липидных и липоперекисных радикалов, участвующих в цепных реакциях перекисного окисления липидов. Люминолзависимая хемилюминесцентная кинетика, являясь результатом интеграции про- и антиоксидантных растворимых компонентов тканей гидробионтов, демонстрирует, как на протяжении периода развития оксидативного стресса изменяется скорость образования и дисмутации свободных радикалов, взаимодействующих с люминолом [Владимиров, Проскурнина, 2009; Измайлов и др., 2011].

Методом хемилюминесцентного анализа обследовано 132 пробы донных беспозвоночных. На каждый тест отбирали не менее трех особей. Все полученные результаты обработаны статистически с использованием пакета программ Excel и STATISTICA 9. На графиках представлены средние значения и доверительные интервалы. Для сопоставления данных использовали  $t$ -критерий Стьюдента при вероятности 95 % ( $p = 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В обследованных образцах амфиподы сем. Gammaridae представлены тремя видами (*E. viridis*, *G. fasciatus*, *Pallasea cancelloides* Gerstfeldt) из р. Енисей и одним видом из р. Ус (*Gammarus* sp.). Малоцетинковые черви (олигохеты) сем. Lumbriculidae *Lumbriculus variegatus* O. F. Muller, пиявки сем. Erpobdellidae *Erpobdella octoculata* Linne, двукрылые личинки сем. Chironomidae *Diamesa baicalensis* Tshernovskij собраны в р. Енисей.

Из нескольких видов амфипод, обитающих в Енисее на участке от плотины Красноярской ГЭС до устья Ангары, наиболее распространены *E. viridis* и *G. fasciatus* Stebb. [Андрианова, 2013; Гладышев, Москвичева, 2002]. *P. cancelloides* на исследованном участ-

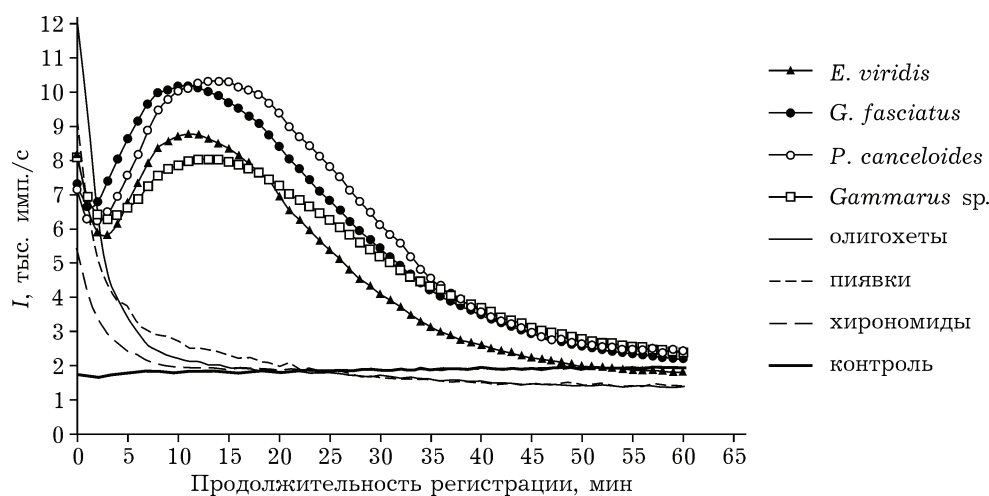


Рис. 1. Хемилюминесцентная кинетика радикалообразования в тканях представителей зообентоса при инициации оксидативного стресса

ке р. Енисей встречается локально и в небольших количествах, в связи с чем не представлялось возможным собрать необходимое количество материала для разделения на размерно-возрастные группы.

**Кинетика генерации АФК и свободных радикалов у представителей зообентоса из различных таксономических групп.** Регистрация хемилюминесцентной кинетики образования свободных радикалов показала явное отличие процесса антиокислительной активности между амфиподами и другими беспозвоночными (рис. 1). На начальном этапе введение в кювету с биологическим образцом перекиси водорода у всех животных сопровождалось всплеском хемилюминесцентной активности в течение 1 мин, указывающим на интенсивность радикалообразования в реакциях, подобных реакции Фентона. Величина первого пика характеризует интенсивность окисления люминола образующимися активными формами кислорода [Владимиров, Проскурина, 2009]. Этот всплеск в 3–6,5 раза превосходил уровень свечения в контрольной кювете.

Очевидно, запуск реакций Фентона связан с присутствием в биологических образцах металлов с переменной валентностью (Fe, Cu, Mn, Cr). Имеются сведения, что катионы  $Cu^{2+}$  могут способствовать, подобно ионам  $Fe^{3+}$ , и даже более эффективно, образованию ОН-радикалов и иницированию ПОЛ [Владимиров, Проскурина, 2009; Lushchak,

2011; Перевозкина, 2014]. Большинство бентосных организмов накапливают Zn, Mn и Cu, что, вероятно, обусловлено особой ролью этих металлов в ферментативных процессах и гликолизе. По литературным данным, в тканях гаммарид, ручейников и хирономид, обитающих на исследованном нами участке Енисея, концентрация Fe находится примерно на одном уровне, однако ручейники в большей степени содержат Mn, а хирономиды — Cr и Cd. Следует отметить, что содержание Cu в тканях амфипод *E. viridis* из р. Енисей в несколько раз выше, чем у хирономид и ручейников, при этом только амфиподы аккумулировали Cu из фитоперифитона [Анищенко и др., 2009; Гладышев и др., 2012].

У олигохет, хирономид и пиявок к 18–24-й минуте регистрации интенсивность хемилюминесценции снижалась до уровня контроля (см. рис. 1), что свидетельствует о поглощении образовавшихся свободных радикалов присутствующими в биологических образцах антиоксидантами [Владимиров, Проскурина, 2009].

Иная кинетика радикалообразования характерна для амфипод. После первичного всплеска в течение 3–4 мин регистрировался спад хемилюминесцентной активности до уровня, в 3–4 раза выше контрольного, с последующим этапом медленной вспышки, завершающимся к 53-й минуте у *E. viridis* и *Gammarus* sp. и к 60-й минуте у *G. fasciatus*

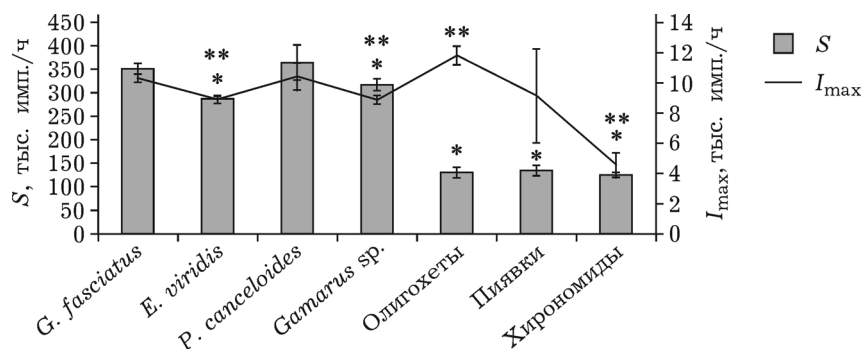


Рис. 2. Величина общего объема за весь период регистрации в 1 ч ( $S$ ) и максимальной интенсивности ( $I_{\max}$ ) радикалообразования у представителей зообентоса при инициации оксидативного стресса.

\* – достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) от *G. fasciatus* по параметру  $S$ ; \*\* – достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) от *G. fasciatus* по параметру  $I_{\max}$

и *P. cancelloides*. При этом величина второго максимума хемилюминесцентной кривой для всех видов амфипод превышала величину первого.

Появление второго максимума обусловлено образованием в пробе вторичных радикалов в результате развития цепной реакции [Владимиров, Проскурина, 2009], включая радикалы липидов, в появлении которых особую роль может играть комплекс цитохрома С и кислых фосфолипидов [Измайлов и др., 2011].

По величине общего объема генерированных свободных радикалов, определяемого площадью под хемилюминесцентной кривой ( $S$ ), амфиподы достоверно превосходили олигохет, пиявок и хирономид (рис. 2). Полученные хемилюминесцентные кинетики оксидативного стресса свидетельствуют о расхождении в скорости реакции и восприимчивости липидов мембран и липопротеидов к действию прооксиданта  $H_2O_2$  у различных таксономических групп зообентоса.

Особенности полученной хемилюминесцентной кинетики образования и нейтрализации активных кислородных радикалов в исследованных образцах разных видов гидробионтов определяются про- и антиоксидантной активностью ферментативного, липидно-белкового и минерального составов супернатанта.

Антиоксидантную функцию наряду со специфическими антиоксидантными ферментами выполняют и компоненты липидных структур, каротиноиды. Биологические ткани ам-

фипод содержат значительное количество веществ антиоксидантного действия: полиненасыщенные жирные кислоты, в том числе и эссенциальные эйкозапентаеновую и докозагексаеновую, каротиноид астаксантин [Подкорытова и др., 2010]. Именно их количественное содержание и функциональная активность определяют хемилюминесцентную кинетику продукции и дисмутации АФК и липидных радикалов при инициации окислительного стресса  $H_2O_2$  в супернатантах гомогенатов тканей гидробионтов. Отличия в содержании полиненасыщенных жирных кислот, которые в первую очередь подвергаются окислению, в тканях различных таксономических групп зообентоса р. Енисей выявлены на уровне содержания олеиновой, арахидоновой, докозагексаеновой кислот (во всех липидах) и эйкозапентаеновой (только в полярных липидах) с уменьшением от максимального у гаммарид, средним у хирономид и меньшим у олигохет [Sushchick et al., 2003; Калачева и др., 2013].

**Межвидовые и возрастные различия параметров кинетики генерации АФК и свободных радикалов у амфипод.** Хемилюминесцентная кинетика оксидативного стресса у четырех исследованных видов амфипод имела выраженные отличия, связанные прежде всего с максимумом интенсивности радикалообразования  $I_{\max}$  (см. рис. 1). У енисейского *G. fasciatus* пик генерации АФК составил 10,3 тыс. имп./с и достоверно превосходил пики усинского *Gammarus sp.* и енисейского *E. viridis* – 8 и 8,8 тыс. имп./с соот-

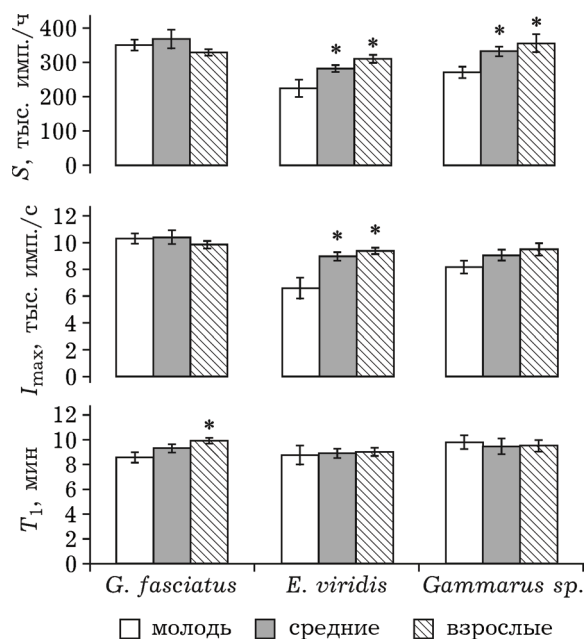


Рис. 3. Величина общего объема за весь период регистрации в 1 ч ( $S$ ), максимальной интенсивности ( $I_{\max}$ ) радикалообразования и времени ее достижения ( $T_1$ ) у амфипод различных размерно-возрастных групп при инициации оксидативного стресса.

\* – достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) от группы “молодь”

ответственно (см. рис. 2). Аналогичное межвидовое распределение выявлено и для показателя величины общего объема радикалообразования ( $S$ ) (см. рис. 2), который у *Gammarus sp.* и *E. viridis* достоверно не различался ( $317 \pm 13$  и  $287 \pm 8$  тыс. имп./ч соответственно) и оказался ниже, чем у *G. fasciatus* (350 тыс. имп./ч).

Видовая специфика кинетики радикалообразования при оксидативном стрессе у гаммарид может определяться (или определять) степенью адаптированности вида к функционированию в определенных экологических условиях. На первый взгляд, судя по объему и максимальной интенсивности образующихся радикалов, у *E. viridis* и *Gammarus sp.* система антиоксидантной защиты надежнее контролирует всплеск образования АФК в тканях, чем у *G. fasciatus*. Однако следует учесть возможную возрастную специфику функционирования АОС у различных амфипод, чтобы избежать ошибочных выводов при оценке результатов исследований.

Возрастная динамика процессов генерации свободных радикалов более выражена у *E. viridis* и *Gammarus sp.*, при этом с возрастом наблюдалось увеличение объема генерации свободных радикалов при оксидативном стрессе (рис. 3). Показатели  $S$  и  $I_{\max}$  у “молодых” особей *E. viridis* достоверно отличались от “средних” и “взрослых”; у *Gammarus sp.* достоверность различий подтвердилась только для значений  $S$ .

Возрастная динамика хемилюминесцентной кинетики у *G. fasciatus* носила иной характер (см. рис. 3). При этом достоверных отличий  $S$  и  $I_{\max}$  между возрастными группами не выявлено, однако у “взрослых” особей наблюдалась тенденция их снижения. Кроме того, отличительной чертой кинетики оксидативного стресса *G. fasciatus* от других видов является увеличение с возрастом времени достижения максимума интенсивности хемилюминесценции  $T_1$  (см. рис. 3), статистически значимы различия между группами “молодь” и “взрослые”. Данный параметр отражает баланс про- и антиоксидантов в биосреде [Методические рекомендации..., 2006]. При его увеличении в совокупности со снижением  $S$  и  $I_{\max}$  хемилюминесцентная кривая на графике сдвигается в правую часть, что указывает на увеличение антиоксидантной активности [Владимиров, Проскурнина, 2009; Измайлов и др., 2011]. Вероятно, “взрослые” особи *G. fasciatus*, в отличие от *E. viridis* и *Gammarus sp.*, обладают более устойчивой АОС, позволяющей им эффективнее справляться с неблагоприятными условиями среды обитания.

Ранее уже проводили оценку размерно-возрастной зависимости нескольких ключевых компонентов АОС у байкальских и палеарктических амфипод [Тимофеев, 2007]. При этом исследовали активность антиоксидантных ферментов пероксидазы, каталазы и глутатион S-трансферазы. Причины возрастных изменений в активности исследованных ферментов остались до конца не выяснены. Однако наблюдалось возрастание активности пероксидазы у байкальских видов и повышение каталазы на фоне снижения пероксидазы у палеарктических гаммарид. Активность глутатион S-трансферазы с возрастом не изменялась. Известно, что именно пероксида-

за имеет более универсальное значение в системе защиты от АФК как эндогенного, так и экзогенного происхождения [Тимофеев, 2007]. Увеличение ее активности с возрастом у байкальских амфипод согласуется с полученной нами закономерностью кинетики оксидативного стресса для *E. viridis*, но имеет обратную направленность для палеарктического *Gammarus* sp. Возможно, возрастное повышение интенсивности кинетики оксидативного стресса у *Gammarus* sp. объясняется увеличением активности каталазы, которая имеет функциональное значение в основном по отношению к АФК эндогенного происхождения [Тимофеев, 2007].

Известно, что байкальские амфиподы интродуцированы во многие водоемы за пределами Байкала. Наиболее широко расселен именно *G. fasciatus*, который отличается чрезвычайной эврибионтностью, высокой продуктивностью и способностью к активному саморасселению. В наших исследованиях показаны отличительные свойства *G. fasciatus* в хемилюминесцентной кинетике оксидативного стресса. В то же время имеются свидетельства специфичности механизмов активации ферментов каталазы и пероксидазы у *G. fasciatus* в условиях повышенных температур [Тимофеев и др., 2008]. Возможно, особенность функционирования АОС *G. fasciatus* является одной из причин, объясняющей его высокие адаптивные способности.

**Параметры кинетики генерации АФК и свободных радикалов у амфипод Енисея, обитающих на участках с разной степенью антропогенной нагрузки,** представлены на рис. 4. У особей *G. fasciatus* во всех возрастных группах ниже города зарегистрирован достоверно более высокий уровень продукции свободных радикалов (значения  $S$  и  $I_{\max}$ ), чем у особей из района выше города. Для *E. viridis* также отмечена подобная тенденция, однако статистически достоверные отличия между участками выявлены только по значениям  $I_{\max}$  для младшей и средней возрастных групп и для всей выборки. Таким образом, амфиподы, обитающие ниже г. Красноярска, характеризуются более слабой антиоксидантной активностью по сравнению с верхним участком.

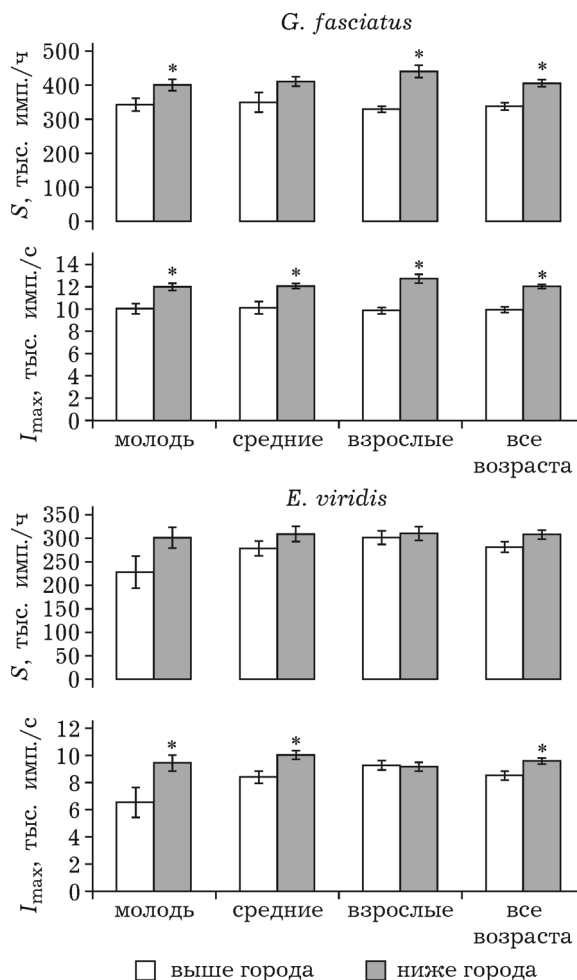


Рис. 4. Величина общего объема за весь период регистрации в 1 час ( $S$ ) и максимальной интенсивности ( $I_{\max}$ ) генерации свободных радикалов у разновозрастных особей амфипод из р. Енисей выше и ниже г. Красноярска.

\* – достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) от показателей выше города)

Выявленные нами особенности хемилюминесцентной кинетики генерации АФК у амфипод при разной антропогенной нагрузке согласуются с результатами исследований, проведенных на этих же участках Енисея. Обнаружено, что антропогенное загрязнение вызывает снижение содержания полиненасыщенных жирных кислот (эйкозапентаеновой и докозагексаеновой) в тканях амфипод, в частности *E. viridis* [Гладышев и др., 2012]. Вероятно, в условиях антропогенного загрязнения происходит более интенсивное окисление липидов в ситуации оксидативного стресса [Богдан и др., 2005; Ткач, Высоцкая,



2007], что, в свою очередь, находит отражение в снижении антиоксидантной активности. В результате параметры хемилюминесцентной кривой  $S$  и  $I_{\max}$  повышаются.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регистрация хемилюминесцентной кинетики образования АФК показала явное отличие процесса антиокислительной активности между амфиподами и другими беспозвоночными. У олигохет, хирономид и пиявок к 25-й минуте регистрации процесс образования АФК прекращался, тогда как у всех видов амфипод на 3–4-й минуте он начинался вновь с повышенной интенсивностью и длился в течение 1 ч. Выявленные отличия, вероятно, связаны с особенностями липидно-белкового, ферментативного состава гомогенатов тканей гидробионтов. В гомогенатах тканей амфипод присутствуют в значимом количестве липиды и цитохромы, активно участвующие как в элиминации, так и в образовании свободных радикалов, в результате развивается цепная реакция, приводящая к появлению второй вспышки хемилюминесценции.

Хемилюминесцентная кинетика оксидативного стресса у четырех исследованных видов амфипод имела выраженные отличия. У енисейского вида *G. fasciatus* пик генерации свободных радикалов ( $I_{\max}$ ) достоверно превосходил пики палеарктического *Gammarus* sp. из р. Ус и *E. viridis* из Енисея. Аналогичное межвидовое распределение выявлено и для показателя  $S$ , который у *Gammarus* sp. и *E. viridis* достоверно не отличался и оказался ниже, чем у других амфипод.

Возрастная динамика процессов генерации свободных радикалов более выражена у *E. viridis* и *Gammarus* sp., при этом с возрастом при оксидативном стрессе наблюдалось увеличение объема генерации свободных радикалов. В то же время у *G. fasciatus*, напротив, отмечена тенденция к снижению объема генерации свободных радикалов у “взрослых” особей. Вероятно, “взрослые” особи *G. fasciatus*, в отличие от *E. viridis* и *Gammarus* sp., обладают более устойчивой АОС, позволяющей им эффективнее справляться с неблагоприятными условиями среды обитания.

Выявлено, что с увеличением антропогенной нагрузки в р. Енисей у амфипод (*G. fasciatus* и *E. viridis*) наблюдается повышение параметров хемилюминесцентной кинетики генерации АФК ( $S$  и  $I_{\max}$ ) в биосреде. Вероятно, амфиподы, обитающие ниже г. Красноярска, характеризуются более слабой антиоксидантной активностью по сравнению с верхним участком. Возможно, следствием этого является снижение содержания полиненасыщенных жирных кислот, которые в первую очередь подвергаются перекисному окислению.

Работа частично выполнена при финансовой и технической поддержке СКТБ “Наука” СО РАН в рамках комплексных исследований программы по поддержке стационаров институтов СО РАН.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Андрианова А. В. Биотические индексы и метрики в оценке качества воды малых рек на территории природного парка “Ергаки” (юг Красноярского края) // Сиб. экол. журн. 2015. № 3. С. 439–451 [Andrianova A. V. Biotic indices and metrics in assessment of the water quality of small rivers on the territory of Ergaki nature park (south of Krasnoyarsk krai) // Contemporary Problems of Ecol. 2015. Vol. 8, N 3. P. 358–367].
- Андрианова А. В. Динамика развития енисейского зообентоса в нижнем бьефе Красноярской ГЭС // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2013. № 1 (21). С. 74–88.
- Андрианова А. В., Апонасенко А. Д., Макарская Г. В., Пономарева Ю. А. Комплексная оценка состояния экосистемы малой горной реки в районе строительства железнодорожной магистрали // Вестн. КрасГАУ. 2013. Вып. 8. С. 97–103.
- Анищенко О. В., Гладышев М. И., Кравчук Е. С., Суцник Н. Н., Грибовская И. В. Распределение и миграция металлов в трофических цепях экосистемы реки Енисей в районе г. Красноярска // Водн. рес. 2009. Т. 36, № 5. С. 623–632.
- Богдан В. В., Немова Н. Н., Руколайнен Т. Р., Шкляревич Г. А. Липидный состав амфипод Белого моря при разных типах антропогенного воздействия // Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря: мат-лы IX Междунар. конф. 11–14 октября 2004 г., Петрозаводск, Карелия. Петрозаводск, 2005. С. 47–50.
- Владимиров Ю. А., Проскура Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи совр. биол. химии. 2009. Т. 49. С. 341–388.
- Гладышев М. И., Анищенко О. В., Суцник Н. Н., Калачёва Г. С., Грибовская И. В., Агеев А. В. Влияние антропогенного загрязнения на содержание неза-

- менимых полиненасыщенных жирных кислот в звеньях трофической цепи речной экосистемы // Сиб. экол. журн. 2012. № 4. С. 511–521 [Gladyshev M. I., Anishchenko O. V., Sushchnik N. N., Kalacheva G. S., Gribovskaya I. V., Ageev A. V. Influence of anthropogenic pollution on content of essential polyunsaturated fatty acids in links of food chain of river ecosystem // Contemporary Problems of Ecol. 2012. Vol. 5, N 4. P. 376–385].
- Гладышев М. И., Москвичева А. В. Байкальские вселенцы заняли доминирующее положение в бентофауне верхнего Енисея // ДАН. 2002. Т. 383, № 4. С. 568–570 [Gladyshev M. I., Moskvicheva A. V. Baikal invaders have become dominant in the upper Yenisei benthofauna // Dokl. Biol. Sci. 2002. Vol. 383, N 4. С. 138–140].
- Гордеева А. В., Лабас Ю. А. Генерация активных форм кислорода наружными поверхностями водных организмов // Цитология. 2003. Т. 45, № 3. С. 284–289.
- Измайлов Д. Ю., Демин Е. М., Владимиров Ю. А. Определение активности антиоксидантов методом измерения кинетики хемилюминесценции // Фотобиология и фотомедицина. 2011. Т. VII, № 2. С. 70–76.
- Калачева Г. С., Гладышев М. И., Сущик Н. Н., Дубовская О. П., Шулепина С. П., Агеев А. В. Продукция полиненасыщенных жирных кислот зообентосом в реках с разной температурой воды // ДАН. 2013. Т. 453, № 5. С. 567–570.
- Макарская Г. В., Лопатин И. Н., Тарских С. В. Хемилюминесцентный анализ функциональной активности фагоцитирующих клеток крови рыб // Там же. 2003. Т. 390, № 3. С. 420–422.
- Макарская Г. В., Тарских С. В., Лопатин В. Н., Долгих П. М., Коваленко В. В., Пряжина Л. А., Ананьев В. В. Функциональная активность клеток крови рыб, обитающих в условиях влияния стоков радиохимического производства // Там же. 2006. Т. 407, № 1. С. 133–137.
- Меньщикова Е. Б., Зенков Н. К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи совр. биологии. 1983. Т. 113, вып. 4. С. 442–445.
- Методические рекомендации МР 1.2.2028-05. Использование неинвазивных методов контроля антиокислительного баланса организма в мониторинговых гигиенических исследованиях. Москва, 2006 // Портал нормативных документов www.OpenGost.ru.
- Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 215 с.
- Перевозкина М. Г. Тестирование антиоксидантной активности полифункциональных соединений кинетическими методами. Новосибирск: СибАК, 2014. 240 с.
- Подкорытова А. В., Строкова Н. Г., Семикова Н. В., Литвиненко А. И., Козлов О. В. Гаммарус – перспективный источник биологически активных веществ // Рыбпром. 2010. № 4. С. 60–63.
- Руднева И. И., Шайда В. Г. Механизмы адаптации ранних онтогенетических стадий рыб к окислительному стрессу // Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов: мат-лы Всерос. конф. с междунар. участием (Борок, 22–27 сентября 2012 г). Борок: ФГБУН ИБВВ, 2012. С. 312–315.
- Тимофеев М. А. Изучение активности некоторых антиоксидантных ферментов у байкальских амфипод, локализация и размерно-возрастная зависимость // Сиб. экол. журн. 2007. № 4. С. 521–526.
- Тимофеев М. А., Шатилина Ж. М., Бедулина Д. С., Протопопова М. В., Павличенко В. В., Колесниченко А. В. Сравнительное исследование клеточных механизмов терморезистентности у байкальского и палеарктического видов эврибионтных амфипод // Сиб. экол. журн. 2008. № 1. С. 23–29 [Timofeev M. A., Shatilina Zh. M., Bedulina D. S., Protopopova M. V., Pavlichenko V. V., Kolesnichenko A. V. Comparative investigation of the cellular mechanisms of thermoresistivity in the baikal and palaeartic species of eurybiont amphipoda // Contemporary Problems of Ecol. 2008. N 1. P. 23–29].
- Ткач Н. П., Высоцкая Р. У. Влияние нефтяного загрязнения на липидный состав амфипод // Фундаментальные исследования. 2007. № 2. С. 143–144.
- Шатилина Ж. М., Губанов М. В., Задереев Е. С., Павличенко В. В., Аксёнов-Грибанов Д. В., Сапожникова Е. А., Протопопова М. В., Бедулина Д. С., Тимофеев М. А. Сравнительное исследование клеточных механизмов термоустойчивости у представителей популяций *Gammarus lacustris* Sars, населяющих соленое озеро Шира (республика Хакасия) и пресный водоем Прибайкалья // ДАН. 2010. Т. 434, № 6. С. 846–849.
- Шахматова О. А. Отклик гидробионтов на стрессовые факторы морских экосистем // Экосистемы, их оптимизация и охрана. Симферополь: ТНУ, 2012. Вып. 7. С. 98–113.
- Amado L. L., Garcia M. L., Ramos P. B., Freitas R. F., Zafalon B., Ferreira J. L. R., Yunes J. S., Monserrat J. M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity // Sci. Total Environ. 2009. N 407. P. 2115–2123.
- Gorokhova E., Lof M., Reutgarda M., Lindstrom M., Sundelin B. Exposure to contaminants exacerbates oxidative stress in amphipod *Monoporeia affinis* subjected to fluctuating hypoxia // Aquat. Toxicol. 2013. N 127. P. 46–53.
- Livingstone D. R. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture // Revue Med. Vet. 2003. N 154. P. 427–430.
- Lushchak V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals // Aquat. Toxicol. 2011. Vol. 101. P. 13–30.
- Sushchick N. N., Gladyshev M. I., Moskvichova A. V., Makhutova O. N., Kalachova G. S. Comparison of fatty acid composition in major lipid classes of the dominant benthic invertebrates of the Yenisei river // Comparative Biochem. and Physiol. Part B. 2003. Vol. 134. P. 111–122.

Takhteev V. V., Berezina N. A., Sidorov D. A. Checklist of the Amphipoda (Crustacea) from continental waters of Russia, with data on alien species // *Arthropoda Selecta*. 2015. Vol. 24, N 3. P. 335–370.

Timofeyev M., Protopopova M., Pavlichenko V., Steinberg C. Can acclimation of amphipods change their

antioxidative response? // *Aquat. Ecol.* 2009. Vol. 43. P. 1041–1045.

Winstone G. W., Di-Giulio R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms // *Ibid.* 1991. Vol. 19, N 2. P. 137–161.

## Features of Antioxidant Activity of Tissues of Reophil Zoobenthos Representatives Based on the Chemiluminescent Analysis

G. V. MAKARSKAYA<sup>1,2</sup>, A. V. ANDRIANOVA<sup>1,3</sup>, S. V. TARSKIKH<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Computational Modeling, SB RAS  
660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/44  
E-mail: mgv@icm.krasn.ru*

<sup>2</sup> *International scientific centre for organism extreme conditions research  
at Presidium of Krasnoyarsk science centre, SB RAS  
660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/44*

<sup>3</sup> *Federal state budgetary scientific establishment Scientific Research Institute  
of Ecology of Fishery Reservoirs  
660097, Krasnoyarsk, Parizhskoi Kommuny str., 33*

The adaptation of living organisms to the environmental conditions is formed and manifested at different levels – from the molecular to the biocenotic. Nowadays, the metabolic antioxidant system (AOS) is considered to be the key part of adaptive processes, and its activation is regarded as a general response of biota to the negative impact of the environment. The usage of AOS components as biomarkers of stressful influence on hydrobionts has good prospects and is actively applied in the monitoring system of aquatic ecosystems. In this paper the kinetics of free radical formation in various zoobenthos representatives from the Yenisei River (amphipods, oligochaetes, leeches, chironomids) and in amphipods from the Us River (a small mountain river, the Yenisei tributary) is analyzed. Parameters of kinetics of radical formation were registered using the method of luminol-dependent chemoluminescence under the initiation of oxidative stress with hydric dioxide *in vitro* in homogenates of hydrobionts tissues. It was revealed that in amphipodes, as opposed to other invertebrates, the process of antioxidative activity is characterized by two chemiluminescent flashes. What is more, interspecies and age-related differences in parameters of the kinetics of free radicals formation were noticed in amphipodes. In *Gmelinoides fasciatus* Stebb. the intension peak of the formation of free radicals and their total number during the 60-minute registration period authentically exceeded these parameters for *Gammarus sp.* and *Eulimnogammarus viridis* Dybowski. With age, the increase in volume of production of free radicals in *E. viridis* and *Gammarus sp.* and its decrease in *G. fasciatus* were observed. The authentically higher value of volume of production of free radicals in *G. fasciatus* and *E. viridis* inhabiting the zone of the Yenisei River with heightened anthropogenic load was marked.

**Key words:** the Yenisei River, benthic invertebrates, amphipods, reactive oxygen species, antioxidative system, lipid peroxidation, chemiluminescent analysis.