

Научная статья
УДК 574.522
doi:10.37614/2949-1215.2023.14.4.033

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ТКАНЯХ ГИДРОБИОНТОВ КАК МАРКЕРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ БИОМОНИТОРИНГЕ АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ВОДНЫЕ ЭКОСИСТЕМЫ

**Ирина Константиновна Мирошниченко¹, Полина Викторовна Семёнова²,
Елена Владимировна Прибыткова³, Константин Юрьевич Терентьев⁴**

^{1, 2, 4}Северный Арктический федеральный университет имени М. В. Ломоносова, Архангельск, Россия

³Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика
Н. П. Лаверова Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, Россия

¹irina51region@gmail.com

²polinasemenova1999@gmail.com

³helengusakova@gmail.com

⁴k.terentev@narfu.ru

Аннотация

Приведены результаты исследования содержания малонового диальдегида (МДА), восстановленного глутатиона, активности глутатионредуктазы гидробионтов для идентификации окислительного стресса при воздействии экстракта донных грунтов реки Северной Двины. Были использованы ткани сига обыкновенного (*Coregonus lavaretus*) отобранного в рамках ежегодных мониторинговых исследований и образцы тест-культуры культуры данио (*Danio rerio*). Полученные результаты выявили различия в уровнях маркеров в различных тканях сига: наибольшие содержания маркеров зафиксированы в печени. Эксперимент с тест-культурой показал усиление окислительного стресса при воздействии экстрактов донных грунтов, проявившееся в изменении уровней маркерных показателей в рыбах данио.

Ключевые слова:

биотестирование, окислительный стресс, глутатионредуктаза, малоновый диальдегид, восстановленный глутатион

Благодарности:

авторы выражают благодарность коллективу лаборатории эволюционной экологии и геномики гидробионтов ИКИА ФИЦКИА УрО РАН за помощь в отборе биологических образцов и образцов донного грунта.

Для цитирования:

Биохимические процессы в тканях гидробионтов как маркеры окислительного стресса при биомониторинге антропогенного воздействия на водные экосистемы / И. К. Мирошниченко [и др.] // Труды Кольского научного центра РАН. Серия: Технические науки. 2023. Т. 14, № 4. С. 195–200. doi:10.37614/2949-1215.2023.14.4.033

Original article

BIOCHEMICAL PROCESSES IN THE TISSUES OF HYDROBIONTS AS MARKERS OF OXIDATIVE STRESS DURING BIOMONITORING OF ANTHROPOGENIC IMPACT ON AQUATIC ECOSYSTEMS

Irina K. Miroshnichenko¹, Polina V. Semenova², Elena V. Pribytkova³, Konstantin Yu. Terentyev⁴

^{1, 2, 4}Northern Arctic Federal University named after M. V. Lomonosov, Arkhangelsk, Russia

³N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia

¹irina51region@gmail.com

²polinasemenova1999@gmail.com

³helengusakova@gmail.com

⁴k.terentev@narfu.ru

Abstract

The results of the study of the content of malondialdehyde (MDA), reduced glutathione, the activity of glutathione reductase of hydrobionts for the identification of oxidative stress when exposed to the extract of bottom soils of the Northern Dvina River are presented. The tissues of the common whitefish (*Coregonus lavaretus*) selected as part of annual monitoring studies and samples of the test culture of the danio culture (*Danio rerio*) were used. The results revealed differences in the levels of markers in various whitefish tissues: the highest concentrations of markers were recorded in the liver. An experiment with a test culture showed an increase in oxidative stress when exposed to bottom soil extracts, manifested in a change in the levels of marker indicators in danio fish.

Keywords:

biotesting, oxidative stress, glutathione reductase, malondialdehyde, reduced glutathione

Acknowledgments:

the authors are grateful to the staff of the Laboratory of Evolutionary Ecology and Genomics of Hydrobionts of N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences for their assistance in the selection of biological and bottom sediment samples.

For citation:

Biochemical processes in the tissues of hydrobionts as markers of oxidative stress during biomonitoring of anthropogenic impact on aquatic ecosystems / I. K. Miroshnichenko [et al.] // Transactions of the Kola Science Centre of RAS. Series: Engineering Sciences. 2023. Vol. 14, No. 4. P. 195–200. doi:10.37614/2949-1215.2023.14.4.033

Введение

Современные уровни антропогенного воздействия на водные экосистемы серьезно влияют на их общее состояние, разнообразие и продуктивность населяющих их сообществ. В результате этого возникают сложные комплексные проблемы, в том числе связанные с истощением и потерей качества сырьевой базы (в частности, ихтиофауны) для перерабатывающих производств. Оценка состояния качества водных экосистем предполагает комплексный подход, связанный с использованием химических, физико-химических и биологических методов анализа. Среди биологических методов наиболее показательными для оценки токсического воздействия среды являются биоиндикационные исследования и биотестирование, в том числе с использованием различных гидробионтов: бентосных сообществ, фото- и зоопланктона, водных растений, беспозвоночных и рыб. Использование рыб для аналитических целей является показательными, что связано с их положением в трофических цепях и наличием эффектов биоаккумуляции и биомагнификации. Изменение качества воды способно усиливать окислительный стресс у гидробионтов, который можно отслеживать с помощью различных показательных маркеров [1–6].

Целью данной работы было сравнить два подхода по использованию маркеров окислительного стресса для оценки уровня антропогенного воздействия на водные экосистемы (на примере реки Северная Двина): анализ маркерных показателей тканей диких особей рыб и биотестирование образцов донного грунта на тест-объектах. В качестве маркерных показателей использовали содержание в тканях малонового диальдегида (МДА), восстановленного глутатиона и активности глутатионредуктазы.

Материалы и методы

В процессе эксперимента использовали экстракт, полученный из образцов донных грунтов Северной Двины, отобранных в районе городской агломерации Архангельска (64°31'21" N 40°32'7" E). Образцы донных грунтов консервировались путем охлаждения, а после непродолжительного хранения при температуре +2 ... +4 °C экстрагировались [7].

Биоиндикационные исследования проводились на тканях сига (*Coregonus lavaretus*). Три образца мужского пола и примерно одного возраста были отловлены в дельте реки Северная Двина. Из сига были извлечены печень, жабры и мышцы и сразу заморожены путем помещения в жидкий азот. В дальнейшем ткани хранились при -80 °C. Биотестирование проводили с использованием культуры данио (*Danio rerio*), которую в течение года выращивали и поддерживали в стационарных условиях. Были отобраны 10 особей рыб *Danio rerio* одного возраста, мужского пола, примерно одного размера и веса без видимых отклонений в развитии. Их экспонировали в течение 5 сут в двух аквариумах на 4,5 л по 5 особей в каждом с соблюдением всех условий, привычных особям (продолжительность светового дня, аэрация, кормление, уборка дна, контроль уровня азота и pH). Первый (контрольный) аквариум наполняли фильтрованной отстоянной водой, а во второй (опытный) вносили смесь профильтрованного стерилизованного автоклавируемого экстракта донного грунта (121 °C, 15 мин) и фильтрованной отстоянной воды в соотношении 1 : 5. По истечении времени экспонирования рыб помещали в чистую воду, далее подвергали процедуре безболезненной эвтаназии с использованием трикаина метансульфоната [8], после чего их замораживали и хранили при -80 °C.

Для дальнейших экспериментов образцы тканей сига и тела данио целиком измельчали в среде фосфатного буфера pH 8,0 на ледяной бане (+2 ... +4 °C) с использованием гомогенизатора, центрифугировали с охлаждением при 14 тыс. об/мин в течение 20 мин, в экстракте определяли содержание белка спектрофотометрически по методу Бредфорда [9], содержание восстановленного глутатиона определяли по реакции с реактивом Элмана [10], содержание МДА — по цветной реакции

с 2-тиобарбитуровой кислотой [11]. Определение активности глутатионредуктазы (ЕС 1.6.4.2) проводили, восстанавливая окисленную форму глутатиона с использованием НАДФН. Подсчет активности фермента вели по изменению экстинкции при λ 340 нм на начальном этапе реакции, выражая результат в наномолях окисленного НАДФ+/мин/мг белка. Все показатели выражали в удельном виде — относительно содержания белка в ткани. Все численные данные представляют собой среднее значение для трех экспериментов $\pm$ стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

Биомониторинговый подход с отбором образцов ихтиофауны на анализ широко используется в оценке состояния водной среды. Результаты, полученные нами при анализе тканей сигов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты исследования *Coregonus lavaretus*

Образец ткани	Глутатион восстановленный, нмоль/мг белка	МДА, нмоль/мг белка	Активность глутатионредуктазы, нмоль/мин/мг белка
Печень	$3,3 \pm 0,28$	175 ± 43	$28,7 \pm 2,14$
Жабры	$0,9 \pm 0,19$	—	$2,4 \pm 0,19$
Мышцы	$0,5 \pm 0,12$	52 ± 8	$2,4 \pm 0,15$

Содержание восстановленного глутатиона на максимальном уровне было зафиксировано в печени, более низкие уровни — в жабрах и мышцах. Схожие тенденции в уровнях глутатиона в тканях этих органов наблюдали в своих исследованиях S. Pandey с коллегами [3]. При анализе их образцов было установлено, что содержание восстановленного глутатиона в печени на 23 % выше, чем в других тканях. В работе [1] закономерности подтвердились для *Channa punctatus* при воздействии мышьяка: содержание глутатиона в печени возросло на 31 %, в жабрах и других тканях — только на 14 %. В статье [2] в эксперименте на тест-объекте (*Danio rerio*) авторы подтвердили эту же закономерность: содержание восстановленного глутатиона в мышечной ткани и жабрах практически не изменилось, тогда как в печени увеличилось примерно в 2 раза по сравнению с контрольным образцом. Схожие тенденции нами были обнаружены и для уровня другого маркерного показателя — малонового диальдегида. Его содержание в печени более чем в 3 раза превышало уровень в мышечной ткани. Это согласуется с данными авторов [12], которые в своих исследованиях показали, что содержание МДА и других продуктов перекисного окисления липидов в печени щуки и плотвы выше, чем в мышцах. Анализируя ферментативную активность глутатионредуктазы установили, что в печени она была значительно выше, чем в тканях жабр и мышц. Эта закономерность согласуется с наблюдениями, сделанными в работах [1–3], где активность глутатионредуктазы также была значительно выше, чем в других тканях.

Несмотря на полученные результаты, согласующиеся с данными литературных источников, можно отметить, что подход, основанный на определении маркерных показателей в таких образцах, имеет ряд недостатков. В частности, причиной появления окислительного стресса может быть широкий спектр изменения различных факторов окружающей среды, в том числе не только химических. Для получения результата, четко отражающего влияние некоего фактора, важно иметь контрольный образец, содержащийся в «идеальных» условиях, исключающих лишь исследуемый фактор, что в естественной среде практически невозможно. Однако данный подход, безусловно, является целесообразным в случае, когда он производится в рамках регулярного мониторинга в широкой временной перспективе, что позволяет отслеживать тенденции изменения контролируемых маркерных параметров у выбранных представителей водной фауны.

Одним из вариантов устранения недостатков биоиндикационного подхода является использование процедуры биотестирования на тест-объектах, например, данио. Данные рыбки выращены в стабильных лабораторных условиях, где поддерживался постоянный уровень температуры, в воду подавалось достаточное количество кислорода, качество и количество воды тоже отслеживалось. Они имели один возраст, являлись потомками одной пары особей. Результаты, полученные нами при анализе рыб данио представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты исследования *Danio rerio*

Образец	Глутатион восстановленный, нмоль/мг белка	МДА, нмоль/мг белка	Активность глутатионредуктазы, нмоль/мин/мг белка
Контроль	8,6 ± 0,69	1,91 ± 0,12	2,2 ± 0,15
Опыт	31,8 ± 1,07	2,14 ± 0,03	1,8 ± 0,11

Как видно из представленных результатов, уровень восстановленного глутатиона у рыб, выдержанных в экстракте донных грунтов, значительно выше, чем у рыб, которые были в контроле. Похожий результат наблюдали в работе [2] при воздействии на *Danio rerio* активного агента в разной концентрации, общее содержание восстановленного глутатиона в образце значительно увеличилось по сравнению с контрольным. В работе [13] при исследовании пресноводных двустворчатых моллюсков *Dreissena polymorpha*, содержание глутатиона в образце, отобранном из наиболее загрязненного водоема, также было выше, чем у образца из условно чистого. Авторы объясняли это тем, что различные загрязнения гидросферы, в которой обитают гидробионты, вызывают окислительный стресс и образование активных форм кислорода, которые, в свою очередь, вызывают различные физиологические и клеточные изменения, включая воспаление, повреждение ДНК и апоптоз. Для борьбы с этим явлением в качестве адаптационного механизма увеличивается содержание в тканях восстановленного глутатиона. При воздействии на организм загрязненной воды уровень малонового диальдегида в организме рыб в целом оказался примерно на 13 % выше по сравнению с контрольным образцом. Это подтверждает негативное влияние комплекса загрязнителей на организм, проявляющееся, в частности, в усилении процессов перекисного окисления липидов. Удельная активность глутатионредуктазы у рыб в контроле оказалась примерно на 12 % выше, чем в экстракте донных грунтов. Схожие тенденции по активности глутатионредуктазы рыб в загрязненных и «чистых» средах наблюдали в работе [4]. Там в эксперименте на *Carassius auratus*, которых выдерживали в воде, обогащенной Cr^{3+} , активность данного фермента снизилась примерно на 35 % по сравнению с контрольными образцами. В работе [5] исследовали двустворчатых моллюсков *Mytilus galloprovincialis*, выращенных в местах выше и ниже от промышленного предприятия. Авторы установили, что активность фермента была значительно ниже у образцов из более загрязненного места отбора проб.

Заключение и выводы

В ходе биоиндикационных исследований антропогенного воздействия при анализе мягких тканей *Coregonus lavaretus* установили, что в печени содержание восстановленного глутатиона примерно в 3 раза выше, чем в жабрах, и в 6 раз выше, чем в мышцах. Уровень малонового диальдегида в печени более чем в 3 раза выше, чем в мышечных тканях, активность глутатионредуктазы в печени более чем в 10 раз выше, чем в жабрах и мышцах. Печень является наиболее показательным органом для анализа определяемых маркеров. Однако установленные нами уровни показателей не дают объективной картины состояния как отдельных особей, так и влияния именно антропогенных факторов на них ввиду невозможности сравнения результатов с образцом, не подвергнутым таковому влиянию.

При применении метода биотестирования экстрактов донных грунтов Северной Двины на *Danio rerio* установили, что содержание восстановленного глутатиона более чем в 3 раза выше в сравнении с контрольным образцом, уровень малонового диальдегида повышен на 13 %, удельная активность глутатионредуктазы была снижена на 12 %. Данный подход, в сравнении с предыдущим, решает проблему отсутствия образца сравнения, однако накладывает ограничения, связанные с различиями в организации тест-объекта и реальных представителей ихтиофауны, а также не учитывает весь комплекс иных естественных внешних факторов, присутствующих в экосистеме.

Обобщая результаты исследований, можно сделать вывод, что использование обоих подходов имеет свои преимущества и недостатки, которые можно в значительной степени устранить при сочетании обоих в рамках комплексного подхода при систематическом мониторинге.

Список источников

1. Allen T., Rana S. V. S. Effect of arsenic (As III) on glutathione-dependent enzymes in liver and kidney of the freshwater fish *Channa punctatus* // *Biological trace element research*. 2004. V. 100. P. 39–48.
2. Ramesh, R. Alteration of antioxidant enzymes and impairment of DNA in the SiO₂ nanoparticles exposed zebra fish (*Danio rerio*). *Environmental Monitoring and Assessment* / Ramesh R., Kavitha P., Kanipandian N. 2013. P. 5873–5881.
3. Pandey S. et al. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.) // *Science of the total environment*. 2003. V. 309, No. 1–3. P. 105–115.
4. Lushchak V. et al. Chromium (III) induces oxidative stress in goldfish liver and kidney // *Aquatic Toxicology*. 2009. V. 93, No. 1. P. 45–52.
5. Gostyukhina O. L. et al. Content of carotenoids and the state of tissue antioxidant enzymatic complex in bivalve mollusc *Anadara inaequalis* Br // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2013. V. 49, No. 3. P. 309–315.
6. Dalle-Donne I. et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease // *Clinical chemistry*. 2006. V. 52, No. 4. P. 601–623.
7. Томилина И. И., Гапеева М. В., Ложкина Р. А. Оценка качества воды и донных отложений каскада водохранилищ реки Волга по показателям токсичности и химического состава // *Труды Института биологии внутренних вод РАН*. 2018. № 82 (85). С. 106–130.
8. Strykowski J. L., Schech J. M. Effectiveness of recommended euthanasia methods in larval zebrafish (*Danio rerio*) // *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2015. V. 54, No. 1. P. 81–84.
9. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical biochemistry*. 1976. V. 72, No. 1–2. P. 248–254.
10. Соколова М. Л. Метрологическая характеристика методики определения восстановленного глутатиона методом спектрофотометрии // *Современные научные исследования и разработки*. 2017. № 4. С. 487–489.
11. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // *Современные методы в биохимии*. 1977. Т. 2, № 3. С. 66–68.
12. Васильева О. Б., Назарова М. А., Немова Н. Н. Оценка перекисного окисления липидов в тканях рыб из озера системы реки Кент, Республика Карелия // *Труды Карельского научного центра Российской академии наук*. 2020. № 3. С. 87–94.
13. Klimova Y. S., Ivanova E. S. Use of Oxidative Stress Indices of Freshwater Bivalve *Dreissena polymorpha* (Pallas) as Biomarkers of Anthropogenic Pollution of Rybinsk Reservoir // *Inland Water Biology*. 2018. V. 11, No. 3. P. 374–376.

References

1. Allen T., Rana S. V. S. Effect of arsenic (As III) on glutathione-dependent enzymes in liver and kidney of the freshwater fish *Channa punctatus*. *Biological trace element research*, 2004, v. 100, pp. 39–48.
2. Ramesh, R. Alteration of antioxidant enzymes and impairment of DNA in the SiO₂ nanoparticles exposed zebra fish (*Danio rerio*). *Environmental Monitoring and Assessment*. Ramesh R., Kavitha P., Kanipandian N., 2013, pp. 5873–5881.
3. Pandey S. et al. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Science of the total environment*, 2003, vol. 309, no. 1–3, pp. 105–115.
4. Lushchak V. et al. Chromium (III) induces oxidative stress in goldfish liver and kidney. *Aquatic Toxicology*, 2009, vol. 93, no. 1, pp. 45–52.
5. Gostyukhina O. L. et al. Content of carotenoids and the state of tissue antioxidant enzymatic complex in bivalve mollusc *Anadara inaequalis* Br. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2013, vol. 49, no. 3, pp. 309–315.
6. Dalle-Donne I. et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry*, 2006, vol. 52, no. 4, pp. 601–623.
7. Tomilina I. I., Gapeeva M. V., Lozhkina R. A. Ocenka kachestva vody i donnyh otlozhenij kaskada vodohranilishch reki Volga po pokazatelyam toksichnosti i himicheskogo sostava [Assessment of water quality and bottom sediments of the Volga river reservoir cascade by toxicity and chemical composition indicators]. *Trudy Instituta biologii vnutrennih vod RAN* [Proceedings of the Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences], 2018, no. 82(85), pp. 106–130. (In Russ.).
8. Strykowski J. L., Schech J. M. Effectiveness of recommended euthanasia methods in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2015, vol. 54, no. 1, pp. 81–84.
9. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 1976, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254.
10. Sokolova M. L. Metrologicheskaya harakteristika metodiki opredeleniya vosstanovlennogo glutatiuna metodom spektrofotometrii [Metrological characteristics of the method of determination of reduced glutathione by spectrophotometry]. *Sovremennye metody v biohimii* [Modern scientific research and development], 2017, no. 4, pp. 487–489. (In Russ.).
11. Stalnaya I. D., Garishvili T. G. Metod opredeleniya malonovogo dial'degida s pomoshch'yu tiobarbiturovoj kisloty [Method of determination of malonic dialdehyde using thiobarbituric acid]. *Sovremennye metody v biohimii* [Modern methods in biochemistry], 1977, vol. 2, no. 3, pp. 66–68. (In Russ.).

12. Vasilyeva O. B., Nazarova M. A., Nemova N. N. Ocenka perekisnogo okisleniya lipidov v tkanyah ryb iz ozer sistemy reki Kenti, Respublika Kareliya [Assessment of lipid peroxidation in fish tissues from lakes of the Kenti river system, Republic of Karelia]. *Trudy Karel'skogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk* [Transactions of the Kola Science Centre of RAS], 2020, no. 3, pp. 87–94. (In Russ.).
13. Klimova Y. S., Ivanova E. S. Use of Oxidative Stress Indices of Freshwater Bivalve *Dreissena polymorpha* (Pallas) as Biomarkers of Anthropogenic Pollution of Rybinsk Reservoir. *Inland Water Biology*, 2018, vol. 11, no. 3, pp. 374–376.

Информация об авторах

И. К. Мирошниченко — магистрант;

П. В. Семёнова — бакалавр;

Е. В. Прибыткова — научный сотрудник;

К. Ю. Терентьев — кандидат технических наук, доцент кафедры.

Information about the authors

I. K. Miroshnichenko — Master's student;

P. V. Semenova — Bachelor;

E. V. Pribytkova — Research Associate;

K. Yu. Terentyev — Candidate of Technical Sciences, Associate Professor of the Department.

Статья поступила в редакцию 31.01.2023; одобрена после рецензирования 31.01.2023; принята к публикации 01.02.2023.

The article was submitted 31.01.2023; approved after reviewing 31.01.2023; accepted for publication 01.02.2023.