

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ СОСТОЯНИЯ ГИГАНТСКОЙ УСТРИЦЫ (*CRASSOSTREA GIGAS*) ИЗ МАРИКУЛЬТУРНЫХ ХОЗЯЙСТВ ЧЕРНОГО МОРЯ

^{1,2,4}Войкина А.В., ^{1,3}Бугаев Л.А., ¹Зыкина В.В., ^{1,4}Кириченко О.В.

¹Азово-Черноморский филиал ФГБНУ «ВНИРО», г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

²Донской государственной технической университет, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

³Кубанский государственный университет, г. Краснодар, Российская Федерация

⁴Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Аннотация. В работе исследовано физиологическое состояние гигантской устрицы (*Crassostrea gigas*) из мидийно-устричных хозяйств черноморского побережья Крыма и Кавказа в весенне-летний период 2020-2021 гг. Физиолого-биохимический анализ показал, что общий антиоксидантный статус в гепатопанкреасе устриц был выше в весенний сезон, а в жабрах – в конце летнего сезона. Выявлено, что адаптационный статус характеризуется высокой вариабельностью показателей и зависит от интенсивности воздействия факторов экзо- и эндогенной природы.

Ключевые слова. гигантская устрица, антиоксидантный статус, активность ферментов, адаптация, малоновый диальдегид.

THE USE OF BIOCHEMICAL METHODS IN THE DIAGNOSIS OF THE CONDITION OF THE PACIFIC OYSTER (*CRASSOSTREA GIGAS*) FROM THE MARICULTURE FARMS OF THE BLACK SEA

^{1,2,4}Voykina A.V., ^{1,3}Bugaev L.A., ¹Zykina V.V., ^{1,4}Kirichenko O.V.

¹Azov-Black Sea Branch of the FSBSI "VNIRO", Rostov-on-Don, Russian Federation

²Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

³Kuban State University, Krasnodar, Russian Federation

⁴Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The physiological state of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from mussel and oyster farms of the Black Sea coast of Crimea and the Caucasus in the spring-summer period of 2020-2021 is studied. Physiological and biochemical analysis showed that the overall antioxidant status in the oyster hepatopancreas was higher in the spring season, and in the gills – at the end of the summer season. It was revealed that the adaptive status is characterized by high variability of indicators and depends on the intensity of the impact of exogenous and endogenous factors.

Keywords. Pacific oyster, antioxidant status, enzyme activity, adaptation, malondialdehyde.

Тихоокеанская (гигантская) устрица (*Crassostrea gigas*) была завезена в Черное море в 70-х годах прошлого века в качестве потенциального объекта промышленной аквакультуры. Многочисленные экспериментальные работы позволили разработать технологию выращивания этого вида устриц на искусственных коллекторах в толще воды. В настоящее время у черноморских берегов России функционируют несколько морских ферм, которые выращивают несколько сот тысяч товарных особей тихоокеанской устрицы в год [1].

Шельфовые зоны Черного моря характеризуются резкими сезонными сменами температурного и газового режимов. Высокие летние температуры и недостаток кислорода могут оказывать негативное влияние на интенсивность ростовых и физиологических процессов устриц, выращиваемых на прибрежных морских фермах [2]. Одним из критериев успешного развития марикультуры моллюсков в Черном море является адаптация к факторам среды обитания и устойчивость к различным заболеваниям.

За последние несколько лет двустворчатые моллюски *Crassostrea gigas* испытали массовые вспышки смертности во многих странах, что привело к значительным экономическим потерям для устричных хозяйств и отрасли в целом. Проведенные исследования указывали на многофакторную причину случаев смертности моллюсков, которая была связана с патогенами, загрязнением и генетическими факторами популяций устриц [3].

Адаптация к определённым условиям среды обитания включает совокупность морфологических и биохимических особенностей организма, которые обеспечивают его жизнедеятельность и репродуктивность. Большой интерес представляет изучение различий антиоксидантной активности у моллюсков, занимающих разные экологические ниши, а также исследование способности антиоксидантной системы обеспечивать жизнедеятельность видов в естественных и стрессовых условиях [4].

Целью данной работы являлась оценка состояния здоровья гигантской устрицы (*Crassostrea gigas*) из мидийно-устричных хозяйств Черного моря Крыма и Кавказа с использованием биохимических показателей.

Материалы и методы. Сбор биологического материала для исследований проводили в мае и августе 2020-2021 гг. в марикультурных хозяйствах, расположенных вдоль побережья юго-западной части Крыма и вдоль черноморского побережья Северного Кавказа.

Отбор проб биологического материала устриц для физиолого-биохимических исследований производился по методикам D.W. Howard и соавт. [5] и О.Н. Давыдова с соавтр. [6]. После снятия с коллекторов устриц препарировали на льду. Пробы биологических тканей (жабры и гепатопанкреас) транспортировались в криопробирках в лабораторию для дальнейших биохимических исследований в сосуде Дьюара с жидким азотом (температура -196°C).

Биохимический статус определяли по ряду показателей: содержание малонового диальдегида (MDA) и восстановленного глутатиона (GSH), активность ферментов ацетилэстеразы (AcEs, КФ 3.1.1.6) супероксиддисмутаза (SOD, КФ 1.15.1.1), каталаза (CAT, КФ 1.11.1.6) глутатион-S-трансфераза (GST, КФ 2.5.1.18), глутатионредуктаза (GR, КФ 1.8.1.7) и глутатионпероксидаза (GP, КФ 1.11.1.9) согласно общепринятым методикам [7-13].

Результаты исследования были обработаны статистически и выражены в форме $M \pm m$ (M — средняя величина, m — ошибка среднего значения). Расчеты производились с помощью программы Statistica v 10.0. Сравнение количественных показателей производилось с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия между анализируемыми выборками считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследований. Устойчивость гидробионтов к действию неблагоприятных факторов водной среды в значительной мере определяется состоянием систем неспецифической защиты от окислительного стресса, и в том числе антиоксидантной системы. Несмотря на универсальный характер действия таких систем, они могут иметь специфику в зависимости от видовых, эволюционных, экологических особенностей организма. Особый интерес представляет изучение антиоксидантных систем двустворчатых моллюсков-фильтраторов, испытывающих влияние множества неблагоприятных факторов и частых флуктуаций параметров водной среды [14].

Резкие изменения факторов среды обитания как внешнего, так и внутреннего характера приводят к нарушениям гомеостаза важнейших клеточных функций. Инициаторами данных нарушений являются активные формы кислорода различной модификации. В норме концентрация активных форм кислорода невысока, но при воздействии неблагоприятных факторов их концентрация может увеличиваться и, как следствие, происходит инициация окислительной деструкции основных классов биомолекул, так называемый «окислительный стресс». Для противостояния окислительному стрессу в биологической системе функционирует защитная антиоксидантная система, которая представлена низкомолекулярными компонентами и антиоксидантными ферментами [15].

Наше исследование показало, что у устриц наблюдаются большие вариации в количественном соотношении различных антиоксидантов, которые обусловлены особенностями жизненного цикла моллюсков. В весенний сезон общий антиоксидантный статус в гепатопанкреасе у устриц был выше, чем в конце летнего периода. Вероятно, это связано с преднерестовым состоянием устриц, в процессе которого происходит активизация пластического и энергетического обменов в пищеварительной железе, что приводит к усилению метаболизма и росту активности ферментов антиоксидантной системы, а также росту интенсивности перекисных процессов. В жабрах наблюдалась противоположная картина – общий антиоксидантный статус был выше в конце летнего периода. Можно предположить, что активизация антиоксидантных процессов в данном органе связана с влиянием среды обитания устриц, в частности с высокими температурами воды и меньшим по сравнению с весной содержанием растворенного в воде кислорода.

Исследования показали, что наибольшее содержание восстановленного глутатиона - низкомолекулярного звена системы антиоксидантной защиты – было обнаружено в гепатопанкреасе в весенний сезон, а в жабрах – в летний сезон (таблица 1). Наиболее выраженные различия между сезонами по этому показателю были установлены в гепатопанкреасе устриц – в весенний сезон содержание GSH было в 4 раза выше ($p \leq 0,05$).

Активность глутатионредуктазы в разные сезоны наблюдения проявлялась одинаково, уровень активности этого показателя в жабрах и гепатопанкреасе в весенний сезон был в 2 и в 3 раз выше, соответственно, чем в летний сезон.

В отличие от глутатионредуктазы, активность глутатионпероксидазы в летний сезон была в 2 раза выше в гепатопанкреасе и в жабрах по сравнению с весенним сезоном.

Высокая активность фермента по нейтрализации супероксид-аниона O_2^- – супероксиддисмутаза – наблюдалась в весенний сезон в гепатопанкреасе устриц по сравнению с летним периодом. В жабрах статистически значимых различий в активности данного показателя не было отмечено.

Уровень активности каталазы в гепатопанкреасе устриц был в 3-5 раз выше, чем в жабрах. Если рассматривать активность данного фермента в сезонном аспекте, то уровень каталазы в гепатопанкреасе был выше в весенний сезон ($p \leq 0,05$).

Исследования динамики сезонных изменений активности глутатион-S-трансферазы – фермента, способствующего процессам детоксикации – показали, что уровень данного показателя был в 3 раза выше в жабрах, чем в гепатопанкреасе устриц во все сезоны наблюдения.

Таблица 1 - Показатели антиоксидантной системы защиты гигантской устрицы (*Crassostrea gigas*) в весенне-летний период 2020-2021 гг.

Показатели	Вид тканей			
	Гепатопанкреас		Жабры	
	Май	Август	Май	Август
MDA, мкмоль/мг белка	2,52±0,07*	1,08±0,03	4,79±0,16*	3,44±0,08
SOD, у.е./мин/мг белка	9,61±0,62*	3,05±0,13	12,01±1,05	9,88±0,99
CAT, мкмоль/мин/мг белка	310,19±19,3*	159,91±6,24	63,87±9,72	47,72±2,79
AcEs, нмоль/мин/мг белка	19±0,6	33,9±1,0*	9,1±0,4	16,2±0,3*
GSH, нмоль/мин/мг белка	453,5±38,2*	112,4±3,0	346,1±13,3	579,1±48,4*
GST, нмоль/мин/мг белка	234,32±17,12	212,86±8,09	818,29±47,12*	638,13±27,84
GR, нмоль/мин/мг белка	6,0±0,6*	2,2±0,5	6,1±0,8*	2,5±0,3
GP, нмоль/мин/мг белка	124,6±10,4	242,9±10,1*	187,8±31,2	469,1±42,1*
GSH/MDA	0,23±0,02*	0,11±0,01	0,07±0,01	0,15±0,01*

Примечание: * - статистически значимые различия ($p \leq 0,05$)

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о высокой вариабельности количественных показателей ферментативной активности антиоксидантной системы моллюсков. Можно предполагать, что в конце лета факторы оказывают более существенное влияние на адаптационные системы поддержания гомеостаза в организме устриц. Полученные данные позволяют предположить, что адаптационный потенциал как в весенний, так и в летний периоды находился на высоком уровне и позволял компенсировать лабильность факторов среды обитания. Кроме того, одним из существенных эндогенных факторов, оказавших влияние на уровень активности антиоксидантов и активацию процессов перекисного окисления липидов, являлась стадия репродуктивного цикла, а именно готовность моллюсков к нересту.

Список использованных источников

1. Переладов М.В. Природные поселения тихоокеанской (гигантской) устрицы *Crassostrea gigas* в Чёрном море: современное состояние и перспективы экспансии // Экологическая безопасность территорий и акваторий: региональные и глобальные проблемы: Сборник трудов региональной научно-практической конференции (Керчь, 24-28 октября 2016 г.) / под общ. ред. проф. Масюткина Е.П. - Керчь: ФГБОУ ВО «КГМУ», 2016. – С.343-347.
2. Вялова О.Ю., Столбов А.Я. Особенности энергетического обмена диплоидных и триплоидных устриц *Crassostrea gigas*, как объектов марикультуры / Актуальные проблемы аквакультуры в

современный период: Материалы международной научной конференции (Ростов-на-Дону, 28 сентября – 2 октября 2015 г.). – Ростов-на-Дону, ФГБНУ «АЗНИИРХ», 2015. – С.25-27.

3. Войкина А.В., Бугаев Л.А., Морозова М.А. Результаты клинических исследований устричных хозяйств Северного Кавказа и Крыма в весенне-летний период 2020 г. / Сборник научных трудов XXIV Международной научно-практической конференции «Интерагромаш». – ДГТУ. 2021. С. 153-156.

4. Истомина А.А. Антиоксидантная активность различных видов дальневосточных двустворчатых моллюсков из естественной среды обитания / Материалы международной научной конференции, посвящённой 150-летию Севастопольской биологической станции — Института биологии южных морей имени А.О. Ковалевского и 45-летию НИС «Профессор Водяницкий: Изучение водных и наземных экосистем: история и современность. – 2021 г. С. 378-379.

5. Howard Dorothy W., Lewis Earl J., Keller B. Jane and Smith Cecelia S. Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans /NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5, 2004. – 218 pp.

6. Давыдов О.Н., Абрамов А.В., Темниханов Т.В. Ветеринарно-санитарный контроль пищевых гидробионтов. – 2007. – 421 с.

7. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249, no. 22. P. 7130–7139.

8. Fried R. Enzymatic & non-enzymatic assay of superoxidedismutase // Biochem.–1975. – 57, №5. –P.657–660.

9. Moron M.S., Depierre J.W., Mannervik B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione-S-transferase activities in rat lung and liver. Biochem Biophys Acta. 1979, 82: 67-78.

10. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело., 1988, № 1, с. 16-19.

11. Покровский А.А., Арчаков А.И. // Современные методы в биохимии. – М.: "Медицина" –1968. – С. 50 – 51.

12. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.

13. Юсупов Л.Б. О повышении точности определения активности глутатионпероксидазы эритроцитов. // Лабораторное дело. 1989. №4. С.100-101.

14. Гостюхина О.Л., Андреев Т.И. Ферментное и низкомолекулярное звенья антиоксидантного комплекса двух видов черноморских моллюсков с разной устойчивостью к окислительному стрессу: *Mytilus galloprovincialis* Lam. и *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // Журнал общей биологии. 2018 – Том 79. № 6. – С. 482-492.

15. Истомина А.А., Челомин В.П., Довженко Н.В., Куриленко В.В., Федорец Ю.В., Бельчева Н.Н. Активность антиоксидантных ферментов и содержание глутатиона в пищеварительных органах морских беспозвоночных из залива Посьета Японского моря // Биология моря, 2018, том 44, № 4, с. 290–296.