

ORIGINAL ARTICLE

**The Activity of Antioxidant and Anaerobic Glycolysis Enzymes Under
Thermal Gradient Exposure in Palearctic Species *Lymnaea stagnalis***

Vereshchagina K.P.¹, Lubyaga J.A.¹, Gurkov A.N.¹,
Shchapova E.P.¹, Madyarova E.V.¹, Kondrat'eva E.M.¹,
Golubev A.P.², Timofeyev M.A.¹, Aksenov-Gribanov D.V.¹

¹ Irkutsk State University. 664003 Irkutsk, K. Marx str., 1, Russia

² International Sakharov Environmental University. 220070 Minsk, Dolgobrodskaya str., 23, Belarus

*Tel.: +7(3952) 600 893

*E-Mail: m.a.timofeyev@gmail.com

Received August 20, 2013

The aim of present study was the evaluation of antioxidant (peroxidase, catalase, glutathione S-transferase) and anaerobic glycolysis (lactate dehydrogenase) enzymes activity under thermal gradient in Palearctic species *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758). Activity of peroxidase, lactate dehydrogenase and glutathione S-transferase elevated in *L. stagnalis* under thermal exposure. Opposite to this, activity of catalase decreased in same condition. We demonstrated antioxidant and anaerobic glycolysis enzymes participation in adaptation mechanisms to environmental changes in gastropods *L. stagnalis*

Key words: Gastropods, glutathione S – transferase, catalase, lactate dehydrogenase, peroxidase

ORIGINAL ARTICLE

**Активность Ферментов Антиоксидантной Защиты и Анаэробного
Гликолиза в Условиях Температурного Градиента у
Палеарктического *Lymnaea stagnalis***

Верещагина К.П.¹, Лубяга Ю.А.¹, Гурков А.Н.¹, Щапова Е.П.¹,
Мадьярова Е.В.¹, Кондратьева Е.М.¹, Голубев А.П.²,
Тимофеев М.А.¹, Аксенов - Грибанов Д.В.¹

¹ ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет», 664003 г. Иркутск, РФ, ул. К. Маркса, 1

² Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова, 220070 г. Минск, Беларусь, ул. Долгобродская, 23.

*Tel.: +7(3952) 600 893

*E-Mail: m.a.timofeyev@gmail.com

Поступила в редакцию 20 августа 2013 г.

Целью настоящего исследования являлось проведение оценки активности ферментов антиоксидантной системы (пероксидазы, каталазы, глутатион S-трансферазы) и анаэробного гликолиза (лактатдегидрогеназы) в условиях температурного градиента у палеарктического вида гастропод *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758). В работе показано, что в условиях гипертермии у *L. stagnalis* происходит повышение активности пероксидазы, лактатдегидрогеназы и глутатион S-трансферазы, а также снижение активности каталазы. Таким образом, показано, что ферменты антиоксидантной системы (пероксидаза, каталаза, глутатион S-трансфераза) и анаэробного гликолиза (лактатдегидрогеназа) участвуют в механизмах адаптации у гастропод к меняющимся температурам среды.

Key words: гастроподы, глутатион S-трансфераза, каталаза, лактатдегидрогеназа, пероксидаза

Одним из наиболее значимых факторов среды является температура, изменения которой могут негативно сказаться на жизнедеятельности организмов. Особому влиянию изменения температуры подвержены гидробионты, поскольку уровень их жизнедеятельности напрямую зависит от термальных характеристик среды обитания (Константинов, 1986).

Распространенным методом оценки состояния окружающей среды является изучение структуры и состава природных популяций. Однако, такие исследования отражают уже причиненный экосистеме вред, в то время как молекулярные (биохимические) индикаторы стрессовых состояний могут обеспечить раннее обнаружение стрессового

воздействия.

Целью настоящего исследования была оценка активности ферментов антиоксидантной системы (пероксидазы, каталазы, глутатион S-трансферазы) и анаэробного гликолиза (лактатдегидрогеназы) в условиях температурного градиента у палеарктического *Lymnaea stagnalis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны палеарктические брюхоногие моллюски, получившие широкое распространение в Прибайкальском регионе - *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758). Данный вид широко распространён не только в водоемах Палеарктики, но и населяет ряд изолированных мелководных заливов (соров) Байкала. Представители *L. stagnalis* предпочитают заросшие участки водоемов, встречается на растениях, вблизи от поверхности воды (Беркин и др., 2009; Тимошкин, 2009).

Гастроподы были собраны в водоеме, расположенном в черте г. Иркутска (N 52°26.83', E 104°28.13'). Перед экспериментом гастропод содержали в аэрируемых термостатах при температуре +6 (±0,5) °C в течение 7 суток. Содержание в лабораторных условиях не являлось стрессовым, гибель моллюсков в это время не отмечали. Во всех экспериментах использовали здоровых и активных особей.

В экспериментальном исследовании проведена экспозиция гастропод в условиях градиентной гипертермии от 6°C (средняя температура среды водоема, в котором проводили отлов моллюсков) до температуры, при которой отмечали гибель 50% особей (30°). Скорость изменения температуры составила

1°C•ч⁻¹. Фиксацию материалов проводили в жидком азоте каждые 5°C (5 часов). Контрольные образцы зафиксированы непосредственно перед экспериментом при температуре акклимации (6°C).

Оценку активности ферментов антиоксидантной системы (пероксидазы, каталазы и глутатион S-трансферазы) проводили согласно модифицированным спектрофотометрическим методикам Drotar (1985), Aebi (1984) и Habig (1974) соответственно (Тимофеев, 2006; 2010). Определение активности лактатдегидрогеназы проводили энзиматическим спектрофотометрическим методом с применением стандарт-набора «ЛДГ-вита» (Vital-Diagnostics Spb).

Измерения проводили на спектрофотометре Cary 50 (Varian, США) при λ=340 нм для пероксидазы и лактатдегидрогеназы, при λ=240 нм для каталазы и при λ=436 нм для глутатион S- трансферазы. Все эксперименты проведены в 5 биологических параллелях. Биохимический анализ каждой пробы проведен в 3-х аналитических измерениях. Оценку достоверности проводили, используя двувыворочный u-критерий Манна-Уитни. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования представлены на рис. 1. Согласно полученным данным, активность пероксидазы у палеарктического *L. stagnalis* в контрольной группе составила 0,29 ±0,03 нКат/мг белка. В условиях повышения температуры среды у *L. stagnalis* отмечали повышение активности до

0,45 $\pm$ 0,051 нКат/мг белка при достижении температуры среды 30°C.

Активность каталазы в контрольных образцах *L. stagnalis* составила 369,32 $\pm$ 50,07 нКат/мг белка. При воздействии повышенной температуры на гастропод, у *L. stagnalis* происходило снижение активности каталазы при 10°C до 156,1 $\pm$ 45,14 нКат/мг белка и при 25-30°C до 179,6 $\pm$ 48,38 нКат/мг белка.

Как следует из представленных материалов, у *L. stagnalis* активность глутатион S-трансферазы в контрольных образцах составила 19,7 $\pm$ 2,16 нКат/мг белка. При экспозиции гастропод *L. stagnalis* в условиях температурного градиента наблюдали увеличение активности фермента относительно контрольных значений при повышении температуры с 15 до 30°C. Максимальная активность глутатион S-трансферазы составила 26,5 $\pm$ 2,39 нКат/мг белка и была отмечена при достижении температуры 25°C.

Согласно полученным материалам по оценке активности лактатдегидрогеназы, в контрольных образцах у палеарктического *L. stagnalis* активность фермента составила 0,017 $\pm$ 0,003 нКат/мг белка. Максимальная активность лактатдегидрогеназы - 0,024 $\pm$ 0,002 нКат/мг белка отмечена при температуре 20°C, после чего происходило снижение активности фермента до контрольных значений.

Таким образом, в работе показано, что в условиях температурного градиента у исследуемых гастропод происходят изменения активности ферментов антиоксидантной системы и анаэробного гликолиза. При гипертермии у *L. stagnalis* происходит повышение активности пероксидазы,

лактатдегидрогеназы и глутатион S-трансферазы, и снижение активности каталазы. Это свидетельствует об активации антиоксидантной системы, необходимой для элиминации активных форм кислорода, интенсивно образующихся при стрессовых условиях. Причины снижения активности каталазы у палеарктического *L. stagnalis*, учитывая экологические характеристики вида и высокие показатели терморезистентности, вероятно связаны с попыткой организма перейти на менее энергозатратные механизмы поддержания жизнедеятельности.

Повышение температуры приводит к ряду структурно – функциональных перестроек клеточных мембран, что сопровождается накоплением вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ -триеновых конъюгатов, альдегидов и кетонов), на что косвенно указывает увеличение активности фермента глутатион-S-трансферазы у *L. stagnalis*. Это вероятно свидетельствует об усилении выведения токсичных продуктов ПОЛ, и поддержании внутриклеточной защиты от повреждения мембран (Реннес, 2003).

Повреждение мембран напрямую влияет на состояние энергетического обмена организмов. Так, при нарушении структуры мембран обеспечение работы электрон-транспортной цепи митохондрий становится невозможно, что заставляет организмы переходить на менее эффективные метаболические пути получения энергии. В частности – путь анаэробного гликолиза, одним из маркеров которого является активность фермента лактатдегидрогеназы. Увеличение активности лактатдегидрогеназы, сопровождающееся накоплением лактата, указывает на

интенсификацию утилизации лактата с целью получения энергии на фоне общего угнетения метаболизма. В текущей работе, на примере *L. stagnalis* показано, что переключение метаболизма с эффективного аэробного на менее эффективный анаэробный является компенсаторным механизмом получения энергии в условиях энергодефицита (Тимофеев, 2010).

Из сравнения показателей активности у ранее исследованного байкальского *Benedictia ongurensis* (Axenov-Gribanov et al., 2013) и у палеарктического *L. stagnalis* установлено, что у гастропод разных экологических групп отличаются базовые (контрольные) показатели активности ферментов антиоксидантной системы и анаэробного гликолиза. Так,

установлено, что активность каталазы и лактатдегидрогеназы у *L. stagnalis* значительно ниже, а активность пероксидазы и глутатион S – трансферазы, напротив, значительно выше, чем у байкальского *B. ongurensis*. Вероятно, это может быть связано с контрастно отличающимися условиями обитания и экологическими характеристиками исследованных видов.

Таким образом, в работе показано, что ферменты антиоксидантной системы (пероксидаза, каталаза, глутатион S-трансфераза) и анаэробного гликолиза (лактатдегидрогеназа) участвуют в механизмах стресс-адаптации у палеарктических гастропод при меняющейся температуре среды.

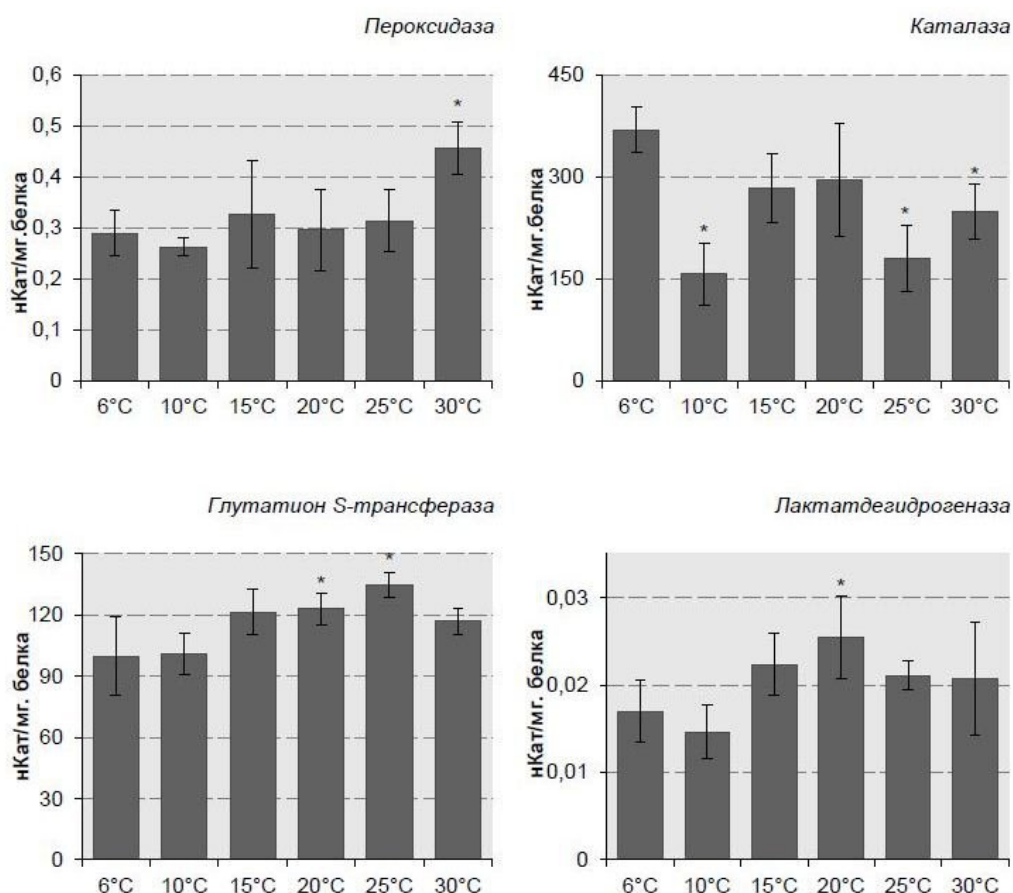


Рисунок 1. Активность ферментов антиоксидантной системы и анаэробного гликолиза у *L. stagnalis* в норме и при экспозиции в условиях температурного градиента (в нКат/мг белка).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ (12-04-31767 мол_а, 12-04-90039 Бел_а, 12-04-98062-р_сибирь_а, 11-04-91321-СИГ_а), грантов Президента РФ МК-5466.2012.4, МД-2063.2012.4, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», а также программы стратегического развития ИГУ. Авторы выражают особую благодарность Шахтановой Надежде Сергеевне за помощь в проведении данного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126.
- Axenov-Gribanov, D.V., Bedulina, D.S., Shatilina, Zh.M., Lubyaga, Y.A., Vereshchagina, K.P., Timofeyev, M.A. (2013) A cellular and metabolic assessment of the thermal stress responses in the endemic gastropod *Benedictia limnaeoides ongurensis* from Lake Baikal. *J. Comparative biochemistry and physiology.* (submitted)
- Drotar, A., Phelps, P., and Fall, R. (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci.* **42**, 35–40.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130–7139.
- Le Pennec, G., & Le Pennec, M. (2003). Induction of glutathione S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* L.: application of a new cellular model in biomonitoring studies. *Aquatic toxicology*, **64**(2), 131-142.
- Linnaeus C. (1758) *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis.* 10th edition. Vermes. Testacea: 700-781. Holmiae. (Salvius).
- Беркин, Н.С. И, Макаров, А.А., Русинек, О.Т. (2009) Байкаловедение. Иркутск: Изд-во Ирк. гос. ун-та, 291 с.
- Константинов, А.С. (1986). Общая гидробиология. М.:ВШ. 4-е изд. 483с.
- Тимофеев М.А. (2010) Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод: Дис. ... Д-р. биол. Наук. ТГУ, Томск, 384с.
- Тимошкин О. А., Провиз В. И., Ситникова Т. Я. (2009) Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. В 2 т. Новосибирск: Наука, 1083 с.