

**Использование показателей окислительного стресса  
двустворчатых пресноводных моллюсков  
*Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771)  
как биомаркеров для оценки воздействия  
хронического антропогенного загрязнения  
различных участков Рыбинского водохранилища**

Я. С. КЛИМОВА, Г. М. ЧУЙКО, М. В. ГАПЕЕВА, Д. С. ПЕСНЯ

Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН  
1525742, Ярославская обл., Некоузский р-н, пос. Борок  
E-mail: yna.klim@mail.ru

Статья поступила 16.05.2016

Принята к печати 30.09.2016

**АННОТАЦИЯ**

В тканях *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) исследованы биомаркеры окислительного стресса: активность каталазы (CAT), глутатион-S-трансферазы (GST), глутатионредуктазы (GR), содержание восстановленного глутатиона (GSH) и малонового диальдегида (MDA), а также концентрация тяжелых металлов (ТМ): Pb, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn и Cd. Моллюсков отбирали на трех станциях, расположенных на участках Рыбинского водохранилища с различным уровнем антропогенной нагрузки: наиболее загрязненные станции 1 и 2, а станцию 3 можно считать относительно чистой. На станциях 1 и 2 в тканях моллюсков выше концентрация ТМ (Pb, V, Cr, Mn, Ni, Cu, Mn), а ответная реакция на воздействие поллютантов выражалась в усилении процессов ПОЛ, активизации САТ, повышении уровня GHS.

**Ключевые слова:** тяжелые металлы, биомаркеры, *Dreissena polymorpha*, каталаза, глутатион-S-трансфераза, восстановленный глутатион, малоновый диальдегид.

Многие двустворчатые моллюски считаются чувствительными моделями в мониторинге загрязнения тяжелыми металлами (ТМ) антропогенного происхождения. Для пресноводных водоемов как модельный организм с конца 1970-х гг. активно используется *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) (Bivalvia: Dreissenidae). Моллюск широко распространен во внутренних водоемах России, Европы и Се-

верной Америки. Он ведет прикрепленный образ жизни и является активным фильтратором и биоаккумулятором минеральных и органических загрязняющих веществ (ЗВ) и быстро реагирует на воздействие токсикантов [Binelli et al., 2015].

Поскольку многие загрязняющие вещества (ЗВ), включая ТМ, в ряду других токсических эффектов стимулируют продукцию актив-

ных форм кислорода (АФК), то в качестве биомаркеров для оценки их хронического действия успешно применяются показатели “окислительного стресса” [Livingstone, 2001]. К ним относятся параметры системы антиоксидантной защиты (АОЗ) и продукты взаимодействия АФК с основными жизненно важными биомолекулами: белками, липидами и нуклеиновыми кислотами. Первые указывают на активность процессов детоксикации избыточного количества АФК и защиты от окислительных повреждений биомолекул, а вторые косвенно отражают интенсивность образования и степень повреждающего действия АФК [Меньщикова и др., 2006]. Таким образом, биомаркеры окислительного стресса предоставляют биологически более полную и адекватную информацию о воздействии токсичных ЗВ на организм [Biomarkers..., 1992].

Оценка уровня биоаккумуляции ЗВ гидробионтами также широко используется в экотоксикологии в качестве биомаркера, так как отражает их биодоступность в экосистеме [Phillips, Rainbow, 1993].

Цель работы – изучение развития окислительного стресса у *D. polymorpha* при воздействии хронического антропогенного загрязнения в условиях естественной среды и сопоставление показателей окислительного стресса с биоаккумуляцией в тканях ТМ.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Отбор проб проводили на трех станциях Рыбинского водохранилища в июне 2013 г. При выборе мест отлова моллюсков исходили

ли из уровня антропогенной нагрузки на участках водохранилища. Ранее выявлено, что станции 1 и 2, характеризуются самой высокой степенью загрязнения компонентов экосистемы [Баканов и др., 2000; Флеров и др., 2000; Чуйко и др., 2010; Гапеева, 2013] (табл. 1).

Ст. 1 – Череповец (59°08'38" с. ш., 37°58'23" в. д.), находилась на наиболее загрязненном участке Рыбинского водохранилища в Шекснинском плесе вблизи промышленного комплекса г. Череповца. Стоки города привносят в окружающую среду различные ЗВ. В этом районе относительно других частей водохранилища наблюдались повышенные концентрации ТМ в воде: Cr, Cu, Ni, Zn, Cd, Pb. При этом превышение ПДК р/х отмечено для Cu, Zn, Pb [Гапеева, 2013]. В компонентах экосистемы (вода, донные отложения (ДО), бентос, рыбы) обнаружены как СОЗ – полихлорированные бифенилы (ПХБ) и хлорорганические пестициды (ХОП), так и металлы – Cd, Zn, Cu, Pb [Баканов и др., 2000; Флеров и др., 2000; Чуйко и др., 2010].

Ст. 2 – Коприно (58°04'09" с. ш., 38°17'17" в. д.), располагалась в Волжском плесе у поселка Коприно. В этом районе в ДО выявлено загрязнение ТМ: Zn, Cd, Cr, Cu [Баканов и др., 2000].

Ст. 3 – г. Весьегонск (58°41'32" с. ш., 37°10'6" в. д.) находилась в Моложском плесе, на относительно чистом участке водохранилища, здесь наименьшие содержания в ДО ТМ и СОЗ. Эта станция выбрана контрольной [Флеров, 2000; Чуйко и др., 2010].

Моллюсков *D. polymorpha* сразу после вылова замораживали при –195 °С и транспортировали для дальнейшей камеральной

Т а б л и ц а 1

Содержание ТМ и суммарный индекс токсичности (СИТ ДО) в ДО на станциях Рыбинского водохранилища

Станция	Содержание ТМ в донных отложениях (ДО) мкг/г сух. массы						Суммарный индекс токсичности (СИТ ДО) на <i>Ceriodaphnia affinis</i> и <i>Chironomus riparius</i>	Источник
	Pb	Cr	Zn	Cu	Cd	Ni		
1	12,3	34,0	96	20	14	27	0,43	[Баканов и др., 2000]
	15,5	–	45,0	5,5	1,6	–	0,32	[Флеров и др., 2000]
2	12,2	27,3	133	20	6,7	24	–	[Баканов и др., 2000]
3	1,5	–	15,0	4,5	0,6		Токсичности нет	[Флеров и др., 2000]

П р и м е ч а н и е. Станции: 1 – г. Череповец, 2 – Коприно, 3 – Весьегонск.

обработки в сосуде Дьюара СД-50 с жидким азотом. В лабораторных условиях на ледяном столике производили отбор моллюсков с длиной раковины 20 мм. С каждой станции отбирали в среднем по 96 моллюсков для анализа биохимических показателей и содержания ТМ в их тканях. В каждую пробу (на ТМ и на биохимические показатели) входили объединенные мягкие ткани от 6–8 моллюсков. Для каждой станции обрабатывали по 12 проб.

Исследованы биомаркеры оксидативного стресса, такие как антиоксидантные ферменты: каталаза – пероксид : пероксид оксидоредуктаза, САТ, Е.С. 1.11.1.6, участвует в утилизации  $H_2O_2$ ; глутатионредуктаза – НАД(Ф)Н: окисленный глутатион оксидоредуктаза, GR, Е.С.1.8.1.7. участвует в восстановлении окисленного глутатиона [Canesi et al., 1999]; глутатион-S-трансфераза, GST, Е.С. 2.5.1.18, фермент II фазы биотрансформации ксенобиотиков [Richardson et al., 2008] и принимающий участие в нейтрализации органических гидроперекисей [Меньщикова и др., 2006], а также уровень низкомолекулярного антиоксиданта – восстановленного глутатиона (GSH), и маркер перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малоновый диальдегид (MDA) [Halliwell, Gutteridge, 1999]. В мягких тканях *D. Polymorpha* определяли концентрацию ТМ: Pb, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn и Cd.

Для биохимического анализа мягкие ткани *D. polymorpha* гомогенизировали при помощи диспергатора Ultra-TurraxT10 (IKA Labortechnik, Germany) в 0,1М фосфатном буфере (рН 7,5). Все измерения концентрации и активности ферментов проводили спектрофотометрическим методом на аналитическом спектрофотометре LAMBDA 25 (Perkin Elmer, USA). В цельном гомогенате определяли содержание восстановленного глутатиона (GHS) по реакции с 5,5'-дитио(бис)-2-нитробензойной при  $\lambda = 412$  нм [Moron et al., 1979], малонового диальдегида (MDA) – по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой при  $\lambda = 532$  нм [Стальная, Гаришвили, 1977]. Оставшийся гомогенат центрифугировали при 22 000 g в течение 40 мин при 0 °С на центрифуге Mikro-22R (Hettich Zentrifugen, Germany). В супернатанте определяли активность ферментов: каталазы (САТ) – по убыли пе-

рекси водорода при 25 °С и длине волны  $\lambda = 410$  нм [Королюк и др., 1988], глутатионредуктазы (GR) – по убыли NADPH при 25 °С и  $\lambda = 349$  нм [Carlberg, Mannervik, 1985], глутатион-S-трансферазы (GST) – по реакции с 1-хлор-2,4-динитробензолом при 27 °С и  $\lambda = 349$  нм [Habig et al., 1974]. Концентрацию белка в пробах измеряли методом Брэдфорд с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта [Bradford, 1976].

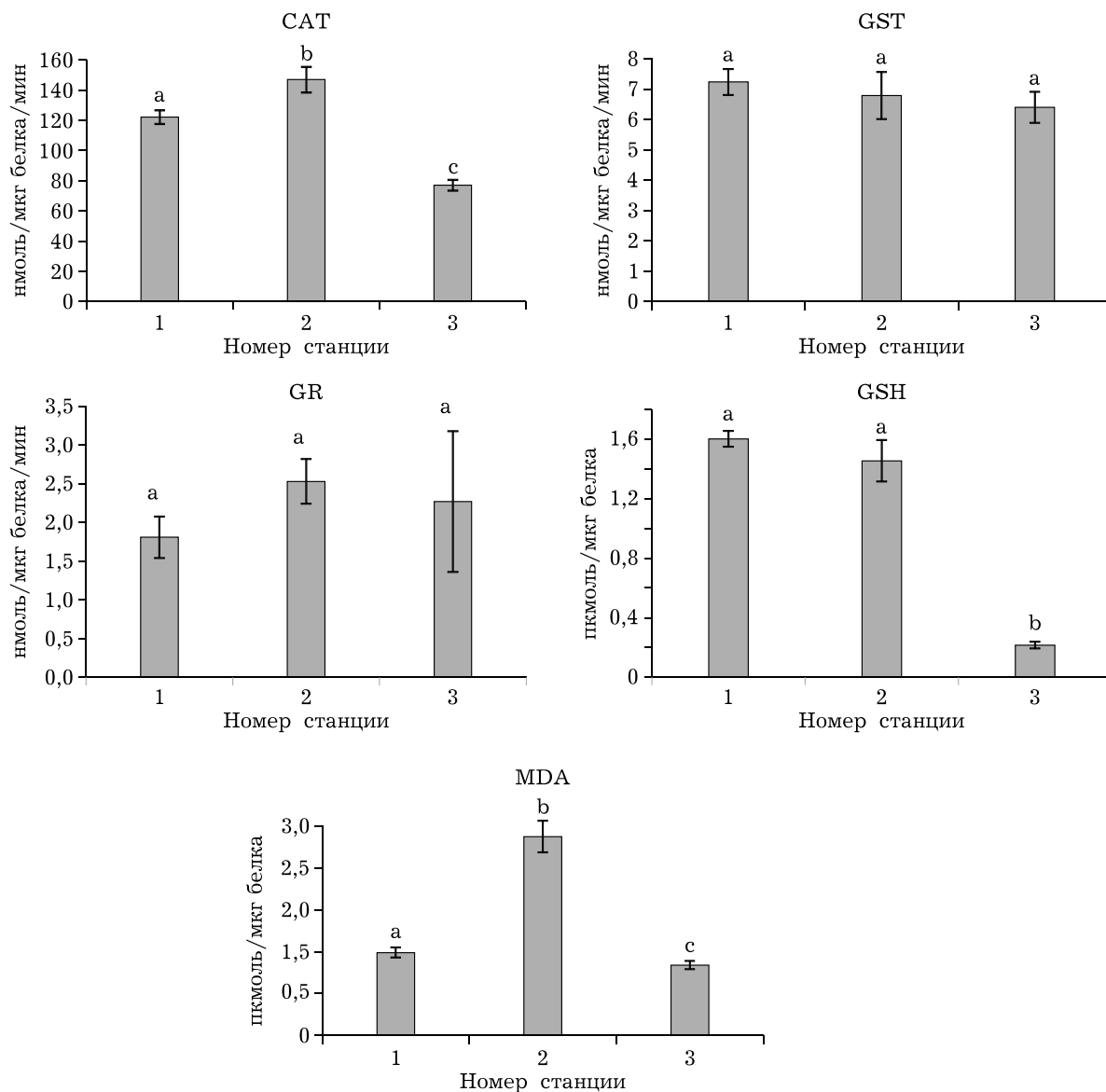
В мягких тканях моллюсков определяли содержание металлов: Pb, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn и Cd. Навеску 2 г сырой массы мягких тканей помещали в тefлоновые пробирки-автоклавы и добавляли 5 мл смеси 65 %  $HNO_3$  (осч) и 30 %  $H_2O_2$  (осч) в соотношении 3 : 2. Разложение проб проводили в СВЧ-печи Speed Ware MWS-3<sup>+</sup> (Berghof GmbH, Germany) в течение 20 мин при температуре 200 °С согласно рекомендуемой программе по протоколу EPA Method 3050B. Содержание ТМ в растворе определялось на масс-спектрометре ELAN DRC-e (Perkin Elmer, USA) с использованием внешних стандартов и внутреннего стандарта In. Результаты представлены в мкг на 1 г сырой массы (с.м.).

Статистический анализ проводился в программе Statistica 6 (StatSoft Inc., USA). Для сравнения содержания ТМ в тканях *D. polymorpha* на разных станциях применили U-критерий Манна – Уитни при  $p = 0,05$ . Для выявления отличий между показателями окислительного стресса использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и наименьшую существенную разницу Фишера (Fisher's LSD) для 5%-го уровня значимости. Для выявления корреляции между показателями окислительного стресса и содержанием ТМ в мягких тканях моллюсков использовали коэффициент корреляции R Пирсона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Моллюски *D. polymorpha* с разных участков водохранилища имели достоверные отличия по показателям окислительного стресса (см. рисунок) и содержанием в тканях тяжелых металлов (табл. 2).

Минимальный уровень исследуемых показателей окислительного стресса и минимальные концентрации ТМ зафиксированы у



Показатели окислительного стресса у *D. polymorpha* из районов Рыбинского водохранилища с разной степенью антропогенного загрязнения.

Активность ферментов АОЗ, нмоль/мкг белка/мин: CAT – каталазы, GST – глутатион-S-трансферазы, GR – глутатионредуктазы. Содержание, пкмоль/мкг белка: GSH – восстановленного глутатиона, MDA – малонового диальдегида. Станции: 1 – г. Череповец, 2 – Коприно, 3 – Весьегонск. Строчными буквами отмечены достоверные различия между станциями при  $p \leq 0,05$ .

*D. polymorpha* на относительно чистой станции Весьегонск.

Выявлено, что в тканях у *D. polymorpha* на загрязненных станциях Череповец и Коприно по сравнению с относительно чистой станцией Весьегонск, достоверно выше концентрация многих измеряемых ТМ: Pb, V, Cr, Ni, Cu, Mn, Zn, Cd (см. табл. 2). На ст. 1 содержание ТМ в тканях моллюсков достоверно выше по сравнению с относительно

незагрязненной ст. 3: Pb в 6 раз, V – в 12,5 раза, Cr – в 6,3 раза, Mn – в 2,6 раза, Ni – в 3,4 раза, Zn и Cu – в 2 раза. На ст. 2 содержание ТМ в тканях моллюсков также достоверно выше по сравнению со ст. 3 по следующим ТМ: V в 9,5 раза, Cr – в 5,7 раза, Mn – в 6 раз, Cd – в 3,4 раза, Ni и Pb – в 1,5 раза, Cu – в 1,8 раза. Таким образом, в тканях моллюсков на обеих более загрязненных станциях (1, 2) отмечено повышенное

Содержание ТМ (мкг/г сырой массы) в мягких тканях *D. polymorpha*

Станция	Pb	V	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	Cd
1	0,25 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,1 <sup>a</sup>	42 ± 12,8 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,49 ± 0,39 <sup>a</sup>	1,82 ± 0,15 <sup>a</sup>	17,6 ± 1,57 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,002 <sup>a</sup>
2	0,07 ± 0,005 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,09 <sup>a</sup>	94 ± 19,9 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,15 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,63 ± 0,12 <sup>a</sup>	9,3 ± 0,65 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,04 <sup>b</sup>
3	0,04 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,08 ± 0,006 <sup>c</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>b</sup>	16,5 ± 1,3 <sup>c</sup>	0,15 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,93 ± 0,09 <sup>b</sup>	7,8 ± 0,54 <sup>c</sup>	0,02 ± 0,003 <sup>c</sup>

Примечание. Результаты представлены в виде средних и их стандартных ошибок ( $x \pm SE$ ), различия ( $U$ -критерий Манна - Уитни) между станциями отмечены строчными буквами при  $p \leq 0,05$ ,  $N = 12$ . Станции: 1 - г. Череповец, 2 - Коприно, 3 - Вельетонск.

содержание V и Cr. Кроме того, на ст. 1 выше содержание Pb и Ni, а на ст. 2 - Cd и Mn.

Показатели окислительного стресса MDA, CAT и GSH также имеют наибольшие значения у *D. polymorpha* на ст. 1 и 2, по сравнению с относительно чистой ст. 3, где эти значения минимальны (см. рисунок).

Так, CAT и MDA в тканях *D. polymorpha* со ст. 2 достоверно выше по сравнению со ст. 3 в 1,9 и 2,8 раза соответственно. На ст. 1 активность KAT и содержание MDA в тканях *D. polymorpha* достоверно выше, чем на ст. 3 в 1,6 и 1,9 раза соответственно. При этом содержание GSH у моллюсков на обеих загрязненных станциях (1, 2) в 7 раз выше по сравнению со ст. 3. Различий в активности GST и GR между исследованными станциями не обнаружено (см. рисунок).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Моллюски *D. polymorpha*, отобранные на ст. 1, вблизи промышленного кластера и на удаленной от него ст. 2, подвергаются воздействию ТМ. В тканях моллюсков, отобранных на этих станциях, накапливаются большие концентрации ТМ (Pb, V, Cr, Ni, Cu, Mn, Zn, Cd), которые превышают в 1,5–12,5 раза аналогичные концентрации ТМ на условно чистой ст. 3. Несмотря на то, что на обеих загрязненных станциях на первом месте по содержанию в тканях моллюсков стоит V, следует учитывать, что токсические эффекты будут вызваны не отдельно взятым металлом, а суммарной токсической активностью всей совокупности ТМ. Известно, что различные ТМ в смеси могут оказывать синергическое действие, что приводит к значительно более выраженным и разнообразным токсическим эффектам, чем при воздействии по отдельности [Winston, Di Giulio, 1991]. Среди наиболее токсичных металлов для пресноводных двустворчатых моллюсков можно выделить Hg, Cd, Cu и Zn [Gupta, Singh, 2011].

Повышение концентрации ТМ привело к усилению процессов окисления и, как следствие, нарастанию концентрации MDA у *D. polymorpha* на загрязненных станциях. Многие из измеренных металлов прооксиданты. Они стимулируют процессы ПОЛ и развитие окислительного стресса [Livingstone,

2003]. Металлы с переменной валентностью (Mn, Cu, Zn) катализируют продукцию АФК по реакции Фентона [Vlahogianni, Valavanidis, 2007]. Многие другие металлы (V, Ni, Pd, Cd) способствуют нарастанию процессов окисления путем различных токсичных механизмов. Например Cd, который нарушает мембранный баланс клеток и дезорганизует метаболизм  $Ca^{2+}$  [Suzuki et al., 2004; Navarro et al., 2011]. Поэтому продукты ПОЛ являются важным диагностическим показателем повышенного образования АФК [Huggett et al., 1992]. Результаты других исследований также демонстрировали чувствительность такого биомаркера, как MDA, к воздействию ТМ. Например, рост содержания MDA отмечал Y. de Lafontaine et al. [2000] у *D. polymorpha* на станциях с загрязненными ТМ.

Из результатов исследования видно, что усиление интенсивности процессов окисления у *D. polymorpha* на загрязненных станциях (1, 2) повлекло за собой активизацию различных механизмов системы АОЗ: повышение активности САТ и рост уровня GSH. Своевременная индукция антиоксидантных ферментов является важной защитной реакцией при развитии окислительного стресса, вызванного антропогенным загрязнением [Sole, 2000]. САТ, так же как и MDA, – маркер окислительных поражений, причинами которого могут быть СОЗ и ТМ [Binelli et al., 2015]. У *D. polymorpha* одновременное повышение уровня MDA и САТ также наблюдалось и в лабораторных экспериментах при воздействии Cd (34 мг/л) [Faria et al., 2009].

На ст. 1 продукцию АФК у *D. polymorpha*, возможно, стимулировал комплекс ТМ (Pb, V, Cr, Ni, Cu, Zn) техногенного происхождения. Источником их поступления в экосистему Рыбинского водохранилища являются промышленные предприятия г. Череповец [Флеров и др., 2000]. На ст. 2 к нарастанию процессов ПОЛ могли привести Mn и Cd, так как здесь в моллюсках обнаружена их максимальная концентрация. Возможно, это связано с биодоступностью данных элементов. Марганец – металл с выраженными окислительными свойствами [Leonard et al., 2004], а кадмий известен другими множественными токсическими эффектами [Son et al., 2001]. Их совместное действие вдвойне усиливает образование АФК.

Подобные результаты получены на *D. polymorpha* в полевых исследованиях [Faria et al., 2010]. На загрязненных станциях моллюски накапливали более высокие концентрации ТМ (Ni, Zn, Cd, Pb, As), ответная реакция системы АОЗ при этом коррелировала с нашими данными: активировались некоторые ферменты АОЗ, включая САТ, а изменений в активности GST и GR не наблюдалось. Рост активности САТ описан многими авторами для некоторых видов рыб и беспозвоночных, отобранных в районах, загрязненных ТМ [Huggett et al., 1992].

Как известно восстановленный GSH обезвреживает металлы, СОЗ и нейтрализует АФК, поэтому составляет первую линию защиты от их токсического воздействия [Regoli, Principato, 1995; Vocchetti et al., 2008]. В представленном исследовании уровень GSH в 7 раз выше у особей *D. polymorpha*, отобранных с загрязненных ст. 1, 2. Это связано с тем, что здесь моллюски аккумулировали большее количество ТМ (Pb, V, Zn, Mn, V, Cd). Исследуемые металлы могли оказаться причиной повышения уровня GSH. Подобная тенденция GSH обнаружена у черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* в естественной среде на загрязненных станциях при накоплении ей металлов: Cr, Fe и Mn [Regoli et al., 2004]. Ранее, в других исследованиях на двустворчатых моллюсках (*M. galloprovincialis*) и рыбах (*Dicentrarchus labrax*, *Abramis brama*), описывалось снижение содержания GSH при воздействии ТМ и СОЗ как в лабораторных, так и в полевых условиях [Regoli, Principato, 1995; Viarengo et al., 1997; Morozov et al., 2012]. В некоторых работах сообщалось о кратковременном увеличении содержания GSH и последующем его истощении у различных видов животных и растений [Huggett et al., 1992]. Из анализа литературных данных и результатов настоящего исследования можно заключить, что изменение уровня GSH зависит от концентрации различных загрязнителей и времени экспозиции. Все это затрудняет интерпретацию результатов, полученных в полевых условиях. В период исследования при длительном действии хронического загрязнения у *D. polymorpha* в сравнении с относительно чистой станцией уровень GSH не снижался, а даже наоборот, оказался выше в 5 раз, что является

сы адаптивной реакцией на действие ТМ. Так как эндогенный синтез глутатиона осуществляется ферментами  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазой и глутатионсинтетазой [Canesi et al., 1999], а GR восстанавливает его окисленную форму [Carlberg, Mannervik, 1985]. Можно предположить, что данные ферменты на момент исследования совместно обеспечивали достаточное возобновление клеточного ресурса, восстановленного GSH в тканях моллюсков, подверженных загрязнению [Faria et al., 2009].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воздействие хронического антропогенного загрязнения ТМ стимулировало образование АФК и усиление процессов ПОЛ у *D. polymorpha*. Это предполагает, что система АОЗ не способна устранять эндогенно продуцируемый ксенобиотиками избыток АФК, что приводит к окислительным повреждениям липидов. Однако при этом окислительные процессы не настолько интенсивны, чтобы инактивировать антиоксидантные ферменты. Как следствие, произошли изменения в функционировании системы АОЗ (активизация САТ и рост уровня GSH), что является адаптивным компенсаторным механизмом на хроническое воздействие ТМ.

Изменение биомаркеров окислительного стресса достоверно коррелирует с повышением концентраций ТМ в тканях моллюска *D. polymorpha*. Таким образом, ТМ играют важную роль в индуцировании процессов окислительного стресса.

Биомаркеры окислительного стресса пресноводных двустворчатых моллюсков, на примере *D. polymorpha* являются чувствительными показателями в условиях загрязнения ТМ и рекомендуются для токсикологических исследований пресноводных экосистем.

### ЛИТЕРАТУРА

- Баканов А. И. Оценка качества донных отложений водохранилищ Верхней Волги использованием элементов триадного подхода // Биол. внутр. вод. 2000. № 1. С. 102–109.
- Гапеева М. В. Тяжелые металлы в воде и донных отложениях Рыбинского водохранилища // Вода: химия и экология. 2013. № 5. С. 3–7.
- Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.
- Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К., Бондарь И. А., Круговых Н. Ф., Труфакин В. А. Окислительный стресс. Проантиоксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. С. 556.
- Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Методы определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. С. 392.
- Флеров Б. А., Томилина И. И., Кливленд Л., Баканов А. И., Гапеева М. В. Комплексная оценка состояния донных отложений Рыбинского водохранилища // Биол. внутр. вод. 2000. № 2. С. 148–155.
- Чуйко Г. М., Законов В. В., Морозов А. А., Бродский Е. С., Шелепчиков А. А., Фешин Д. Б. Пространственное распределение и качественный состав полихлорированных бифенилов (ПХБ) хлорорганических пестицидов (ХОП) в донных отложениях и леще (*Abramis brama* L.) Рыбинского водохранилища // Биол. внутр. вод. 2010. № 2. С. 98–108.
- Binelli C., Della Torre S., Magni M., Parolini M. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review // Environ. Pollution. 2015. Vol. 196. P. 386–403.
- Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. SETAC special publication series / eds. R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle, H. L. Bergman. Boca Raton; Ann Arbor; London; Tokyo: Lewis Publishers, 1992. P. 347.
- Bocchetti R., Fattorini D., Pisanelli B., Macchia S., Oliviero L., Pilato F., Pellegrini D., Regoli F. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas // Aquat. Toxicol. 2008. Vol. 89. P. 257–266.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
- Canesi L., Viarengo A., Leonzio C., Filippelli M., Gallo G. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues // Aquat. Toxicol. 1999. Vol. 46. P. 67–76.
- Carlberg I., Mannervik B. Glutathione reductase // Methods in Enzymology / eds. E. Meister. San Diego: Academic Press, 1985. Vol. 113. P. 484–489.
- Faria M., Carrasco L., Diez S., Riva M. C., Bayona J. M., Barata C. Multibiомarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals // Comp. Biochem. Physiol. 2009. Vol. 149. P. 281–288.
- Faria M., Huertas D., Soto D. X., Grimalt J. O., Catalan J., Riva M. C., Barata C. Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain) // Chemosphere. 2010. Vol. 78. P. 232–240.
- Gupta S. K., Singh J. Evaluation of mollusk as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: a review // The IIOAB Journ. 2011. Vol. 2. P. 49–57.
- Habig W. H., Pabst M. J., Jacoby W. B. Glutathion-S-transferase: the first step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. P. 7130–7139.

- Halliwell B. Gutteridge J. M. C. Free radicals in biology and medicine. L.: Oxford University Press, 1999. 936 p.
- Lafontaine Y. de, Gagner F., Blaise C., Costan G., Gagnon P., Chan H. M. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada) // *Aquat. Toxicol.* 2000. Vol. 50. P. 51–71.
- Leonard S. S., Harris G. K., Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction // *Free Radic. Biol. Med.* 2004. Vol. 37. P. 19–21.
- Livingstone D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms // *Mar. Pollut.* 2001. Vol. 42. P. 656–666.
- Livingstone D. R. Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Pollution and Aquaculture // *Revue Méd. Vét.* 2003. Vol. 154 (6). P. 427–430.
- Moron M. S., Depierre J. W., Mannervik B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione-S-transferase activities in rat lung and liver // *Biochim. Biophys. Acta.* 1979. Vol. 582. P. 67–78.
- Morozov A. A., Chuiko G. M., Brodskii E. S. Functional state of the liver antioxidant system of the Bream *Abramis brama* (L.) from Rybinsk reservoir regions with different anthropogenic loads // *Inland Water Biol.* 2012. Vol. 5, N 1. P. 147–152.
- Navarro A., Faria M., Barata C., Piña B. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults // *Environ. Pollution.* 2011. Vol. 159. P. 100–107.
- Phillips D. J. H., Rainbow P. S. Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants. First edition. Environmental Management Series. L.: Elsevier Applied Science, 1993. P. 371.
- Regoli F., Frenzilli G., Bocchetti R., Annarumma F., Scarcelli V., Fattorini D., Nigro M. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment // *Aquat. Toxicol.* 2004. Vol. 68. P. 167–178.
- Regoli F., Principato G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers // *Ibid.* 1995. Vol. 31. P. 143–164.
- Richardson B. J., Mak E., de Luca-Abbott S. B., Martin M., McClellan K., Lam P. K. S. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses? // *Marine Pollut. Bull.* 2008. Vol. 57. P. 503–514.
- Sole M. Assessment of the results of chemical analyses combined with the biological effects of organic pollution on mussels // *Trends in Analyt. Chem.* 2000. Vol. 19. P. 1–9.
- Son M. H., Kanga K. W., Lee C. H., Kim S. G. Potentiation of cadmium-induced cytotoxicity by sulfur amino acid deprivation through activation of extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) in conjunction with p38 kinase or c-jun N-terminal kinase (JNK) Complete inhibition of the potentiated toxicity by U0126 an ERK1/2 and p38 kinase inhibitor // *Biochem. Pharmacol.* 2001. Vol. 62. P. 1379–1390.
- Suzuki N., Yamamoto M., Watanabe K., Kambegawa A., Hattori A. Both mercury and cadmium directly influence calcium homeostasis resulting from the suppression of scale bone cells: the scale is a good model for the evaluation of heavy metals in bone metabolism // *J. Bone. Miner. Metab.* 2004. Vol. 22. P. 439–446.
- Viarengo A., Bettella E., Fabbri R., Burlando B., Lafaurie M. Heavy Metal inhibition of EROD activity in liver vicomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: role of GSH in the reduction of heavy metal effects // *Marine Environ. Res.* 1997. Vol. 44, N 1. P. 1–11.
- Vlahogianni T. H., Valavanidis A. Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis* // *Chem. Ecol.* 2007. Vol. 23, N 5. P. 361–371.
- Winston G. W., Di Giulio R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms // *Aquat. Toxicol.* 1991. Vol. 19. P. 137–161.

## **Indices of Oxidative Stress in Zebra Mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) as Biomarkers for Chronic Anthropogenic Pollution Assessment in Different Parts of the Rybinsk Reservoir**

Y. S. KLIMOVA, G. M. CHUIKO, M. V. GAPEEVA, D. S. PESNYA

*Papanin Institute of Biology of Inland Waters, RAS  
1525742, Yaroslavl'skaya Oblast, Nekouz'sky Region, s. Borok  
E-mail: yna.klim@mail.ru*

The following biomarkers of oxidative stress: catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), glutathione and reductase (GR) activities as well as malondialdehyde and reduced glutathione content and heavy metal concentrations (HM) were studied in *Dreissena polymorpha* tissues. Mussels were collected on three sites located in the Rybinsk reservoir differing in the levels of anthropogenic load: more polluted sites 1 and 2 and relatively clean site 3. Mussels from sites 1 and 2 had higher concentrations of HM and their response to pollutants' action was manifested in increased processes of LPO, activation of CAT and elevated level of GHS.

**Key words:** heavy metal, biomarkers, *Dreissena polymorpha*, catalase, glutathione-S-transferase, glutathionreductase, malondialdehyde glutathione.