

УДК [599.323.4+594.3]:577.121

О. М. Балаева-Тихомирова¹, Е. И. Кацнельсон², А. С. Володько³¹канд. биол. наук, доц., зав. каф. химии*Витебского государственного университета имени П. М. Машерова*²преподаватель каф. химии*Витебского государственного университета имени П. М. Машерова*³магистрант биологического факультета*Витебского государственного университета имени П. М. Машерова*e-mail: kate_kaznelson@tut.by

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СВОБодно-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ У МОДЕЛЬНЫХ ТЕСТ-ОРГАНИЗМОВ НА ПРИМЕРЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРЫС И ЛЕГОЧНЫХ МОЛЛЮСКОВ

Одной из современных проблем лабораторной диагностики остается поиск альтернативных крысам живых организмов, позволяющих осуществлять диагностику окислительного стресса и проводить систематический мониторинг и скрининг состояния антиоксидантной системы и уровня свободно-радикального окисления в организме. Экспериментальные модели на моллюсках целесообразны по экономическим и этическим соображениям. Сходный обмен веществ моллюсков и беспозвоночных животных позволит использовать их в модельном эксперименте и мониторинге окружающей среды. Основными характеристиками моллюсков как тест-объектов, широко используемых в биомониторинге и биоиндикации, являются высокая чувствительность к загрязняющим агентам и ксенобиотикам, широкое распространение, легкость сбора и идентификации, короткий жизненный цикл. В статье сравниваются показатели антиоксидантной системы легочных пресноводных моллюсков и крыс в эксперименте.

Введение

Все живые организмы разными способами реагируют на изменения окружающей среды. Формирование защитных эффектов адаптации обеспечивается активацией генетического аппарата, изменением метаболизма клетки, а также изменением функционирования всех систем организма. При кратковременном действии стрессов умеренной интенсивности происходит усиление функционирования органов и мобилизация организма. При интенсивной или длительной стресс-реакции в клетках происходит активация процесса свободно-радикального окисления, угнетение энергопродукции, снижение синтеза белка. Активации систем стресса и реализации повреждающих эффектов препятствуют стресс-лимитирующие системы. Одним из возможных компонентов быстрой реакции на стресс является активация перекисного окисления липидов [1].

Продуктами перекисного окисления липидов (ПОЛ) являются реакционноспособные молекулы, которые спонтанно ускоряют цепные реакции и реагируют с биомолекулами, вызывая нарушения их функций. Первичными продуктами ПОЛ являются гидроперекиси и диеновые конъюгаты, которые очень нестабильны и при наличии металлов переменной валентности метаболизируются во вторичные и третичные продукты. Эти процессы протекают во всех клетках, однако наиболее активно идут в клетках крови и в гепатоцитах. Антиоксидантными свойствами обладает глутатион, который содержится в клетках в окисленной и восстановленной формах. Данные свойства основаны на способности окисленного глутатиона отдавать свой электрон в реакциях со свободными радикалами, предотвращая повреждение клетки. По соотношению окисленных и восстановленных молекул глутатиона в клетках определяют уровень протекающих окислительных реакций в организме. Глутатион также восстанавливает другие антиоксиданты, связывается с токсичными соединениями, нейтрализует их и способствует выведению из организма [2].

Эндогенные антиоксиданты формируются из поступающих с пищей молекул, обладающих способностью обезвреживать активные метаболиты кислорода (витамины С, А, Е, бета-каротин, липоевая кислота); из молекул обмена веществ (аминокислоты и их производные, пептиды, кофакторы ферментов и др.); продуктов распада макромолекул при окислительном стрессе (мочевая кислота, билирубин); индукторов экспрессии генов антиоксидантных ферментов; антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, каталаза и др.) [3; 4]. Биохимическими маркерами метаболических нарушений при действии различных экзогенных факторов могут служить содержание ТБК-позитивных веществ (ТБК-ПВ) и восстановленный глутатион (GSH).

Использование модельных организмов основано на том, что все живые существа имеют единое происхождение и сохраняют общие характеристики в механизмах хранения и реализации наследственной информации. Лабораторные исследования на позвоночных животных являются одним из важнейших видов исследований. К ним относятся крысы, мыши, кролики. Геном крысы имеет до 90 % сходства с геномом человека. Результаты исследований на животных имеют решающее значение для получения фундаментальных знаний и их практического применения [5].

В последние десятилетия активно осуществляется поиск альтернативных живых организмов, опыты на которых целесообразны по экономическим и этическим соображениям. Часто используют два широко распространенных вида легочных пресноводных моллюска *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) и *Planorbarius corneus* (катушка роговая) [6; 7]. Первый из них признан модельным организмом для исследования действия водорастворимых химических агентов в ЕЭС в 2010 г. [8].

Цель исследования – сравнить некоторые показатели антиоксидантной активности печени крыс и гепатопанкреаса моллюсков в эксперименте.

Материал и методы

Объектами исследования являлись крысы линии Вистар и легочные пресноводные моллюски – прудовик обыкновенный (*Lymnaea stagnalis*) и катушка роговая (*Planorbarius corneus*). На данных объектах проводился модельный эксперимент, по результатам которого в печени крыс и гепатопанкреасе моллюсков определялись показатели свободно-радикального окисления – содержание ТБК-ПВ и восстановленного глутатиона. Устанавливалось корригирующее действие экстракта куколок дубового шелкопряда (ЭКДШ) при развитии инсулинорезистентности, гиперхолестеролемии и гипергликемии. У крыс в печени концентрацию восстановленного глутатиона определяли по методу Sedlak и Lindsay [9], содержание ТБК-ПВ определяли по методу Стальной и Гаришвили [10]. У моллюсков количественное установление продуктов перекисного окисления липидов (ТБК-ПВ) проводили по методу Uchiyama и Mihara [11], определение GSH проводили по методу Beutler [12]. Математическую обработку полученных результатов проводили методами параметрической и непараметрической статистики с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2012, STATISTICA 6.0.

Ранее на кафедре химии ВГУ имени П. М. Машерова исследовались гемолимфа куколок дубового шелкопряда и полученный из нее экстракт куколок дубового шелкопряда [13]. Установлено, что гемолимфа куколок дубового шелкопряда формируется в процессе запрограммированной гибели клеток и в периоде диапаузы накапливает антиоксидантный потенциал за счет увеличения количества мочевой кислоты, свободных аминокислот. Эндогенная антиоксидантная система гемолимфы содержит витамины С, А, Е, мочевую кислоту, аминокислоты, глутатион, биофлавоноиды. Антиоксидантная активность экстракта проявляется в разведениях $1:10^4$ – $1:10^5$. Поэтому в модельных

экспериментах в качестве фактора, снижающего негативное воздействие на исследуемые объекты, использовался ЭКДШ [14]. В экспериментальных моделях животным вводили экстракт куколок дубового шелкопряда. Стандартизацию флаконов с экстрактом куколок дубового шелкопряда проводили по сумме свободных аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в лаборатории Института органической химии. Установлено, что содержание суммы свободных аминокислот колебалось в пределах 550–850 мг/л.

Характеристика моделей

1. Для моделирования инсулинорезистентности (ИР) в эксперименте были выбраны крысы-самки (157) линии Вистар массой 180–250. Инсулинорезистентность воспроизводили содержанием животных на высокожировой диете (ВЖД) по Либеру-Де Карли в течение 2 и 3 месяцев [15]. Для создания высокожировой диеты к базовой диете производства Ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Германия) добавляли кукурузное масло в количестве 40 г на 1 кг диеты, согласно оригинальной прописи авторов [16]. ВЖД готовили ежедневно путем смешивания ингредиентов с помощью блендера в течение 15–30 с. Животным давали жидкую диету в бутылках, снабженных особыми крышками, без ограничений. Потребление пищи животными ежедневно регистрировалось.

Крысы были разделены на пять групп: 1 группа – контроль (n = 10); 2 группа – ВЖД 2 месяца (n = 10); 3 группа – ВЖД 3 месяца (n = 10); 4 группа – ВЖД 3 месяца + ЭКДШ ежедневно в течение последнего месяца ВЖД в дозе 7 мкг свободных аминокислот / 100 г массы тела (n = 9); 5 группа – ВЖД 3 месяца + ЭКДШ ежедневно в течение последнего месяца ВЖД в дозе 70 мкг свободных аминокислот / 100 г массы тела (n = 10). Водный экстракт куколок дубового шелкопряда получали по методу Трокоза [17]. Выбор доз основан на опыте использования жидкого содержимого ЭКДШ в ветеринарии согласно патенту Трокоза. Контрольной группе вводили эквивалентное количество дистиллированной воды. Декапитация животных проводилась через 24 часа после последнего введения препаратов.

2. Моделирование алиментарной гиперхолестеролемии проводили внутрижелудочным введением через зонд холестерина в дозе 40 мг/кг и эргокальциферола 350 000 ед/кг в подсолнечном масле [18; 19]. Животные были разделены на 7 групп: 1 группа – контроль (n = 10); 2 группа – алиментарная ГХ 5 суток (n = 13); 3 группа – алиментарная ГХ 5 суток + ЭКДШ 7 мкг свободных аминокислот / 100 г массы тела 5 суток (n = 8); 4 группа – алиментарная ГХ 5 суток + ЭКДШ 70 мкг свободных аминокислот / 100 г массы тела 5 суток (n = 8); 5 группа – алиментарная ГХ 10 суток (n = 7); 6 группа – алиментарная ГХ 10 суток с параллельным введением с 6-х по 10-е сутки эксперимента ЭКДШ 7 мкг свободных аминокислот / 100 г массы тела (n = 6); 7 группа – алиментарная ГХ 10 суток с параллельным введением с 6-х по 10-е сутки эксперимента ЭКДШ 70 мкг свободных аминокислот / 100 г массы тела (n = 6). Контрольным животным вводили эквивалентное количество дистиллированной воды.

3. Моделирование гипергликемии проводили в эксперименте на 144 особях легочных пресноводных моллюсков – *Lymnaea stagnalis* и *Planorbarius corneus*, разделенных на 18 групп по 8 моллюсков в каждой. Стрептозотонин готовили на 1М цитратном буфере и вводили в ногу животного с помощью инсулинового шприца в количестве 65 мкг/г тела животного; ЭКДШ вводили аналогично в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела [20]. Для исследований использовали гомогенат гепатопанкреаса моллюсков, приготовленный на холоде в 0,025М трис-НСl буфере (pH 7,4). Контрольным животным вводили эквивалентное количество дистиллированной воды.

4. Моделирование влияния солей тяжелых металлов различной концентрации исследовали на примере воздействия сульфата меди (II). Эксперимент проводили

на 72 особях – *Lymnaea stagnalis* и *Planorbarius corneus*, разделенных на 8 групп по 9 моллюсков в каждой. Моллюсков собирали осенью (сентябрь–октябрь) в оз. Вордовье в окрестностях д. Ляды Дубровенского района Витебской области.

Содержание ионов меди (Cu^{2+}) выбрано с учетом значений предельно допустимых концентраций, установленных для водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения. Моллюсков распределяли на 4 группы. Моллюски в первых трех группах подвергались воздействию сульфата меди в концентрациях 0,01 мг/л, 0,1 мг/л и 1 мг/л. Животные контрольной группы находились в емкости с водопроводной водой.

Lymnaea stagnalis и *Planorbarius corneus* в ходе проведения эксперимента размещались в сосудах с одинаковым объемом. Плотность посадки моллюсков 3 экз/л. Температура воды – 20–22 °С. Экспозиция длилась двое суток. Через каждые сутки использованные растворы заменяли свежеприготовленными. Освещение менялось с естественным ходом дня и ночи. Моллюски питались листьями одуванчика.

5. Мониторинг состояния водных экосистем был проведен на 324 легочных пресноводных моллюсках, разделенных на две группы: 162 особи *Lymnaea stagnalis* и 162 особи *Planorbarius corneus*. Моллюски собирались весной (апрель – май), летом (июль) и осенью (сентябрь–октябрь) из водоемов шести районов Витебской области (Витебский, Дубровенский, Бешенковичский, Ушачский, Шумилинский и Сенненский районы). В каждой исследовательской подгруппе содержалось по 9 моллюсков.

Результаты и их обсуждение

Воспроизведение инсулинорезистентности по Либери – Де Карли является одной из наиболее распространенных экспериментальных моделей для воспроизведения ИР и неалкогольного стеатогепатита: высокая сбалансированность (за исключением жирового компонента) нутриентов, что обусловлено высокотехнологичным приготовлением диеты в промышленных условиях. Данная модель патогенетически более близка аналогичной патологии у человека. Выявлен положительный эффект ЭКДШ, который можно объяснить его антиоксидантными свойствами, поскольку известно, что в основе развития стеатогепатоза при ИР лежит активация процессов свободно-радикального окисления. Установлено, что содержание животных на ВЖД вызвало достоверное увеличение содержания ТБК-ПВ в печени на 35 % через 2 месяца диеты и на 96 % через 3 и снижение уровня восстановленного глутатиона на 57,7 и 77,5 %, соответственно (таблица 1).

Таблица 1. – Содержание ТБК-ПВ и восстановленного глутатиона в печени при моделировании ИР и применении ЭКДШ ($M \pm m$)

Группа животных (n = 9)	Показатель	
	ТБК – позитивные вещества, нмоль/г	Восстановленный глутатион, мкмоль/г
Контроль	$20,1 \pm 1,82$	$17,8 \pm 1,32$
ВЖД 2 месяца	$28,3 \pm 2,05^1$	$7,45 \pm 0,74^1$
ВЖД 3 месяца	$39,5 \pm 2,74^1$	$3,37 \pm 0,51^2$
ВЖД 3 месяца + ЭКДШ 7 мкг/100 г	$22,1 \pm 1,51^1$	$8,11 \pm 0,25^2$
ВЖД 3 месяца + ЭКДШ 70 мкг/100 г	$18,35 \pm 1,24^1$	$9,75 \pm 0,14^1$

Примечание – $^1p < 0,05$ по сравнению с контролем; $^2p < 0,05$ по сравнению с группой ВЖД 3 месяца.

При использовании экстракта в обеих дозах уровень ТБК-ПВ снижался до значений контрольных животных; уровень восстановленного глутатиона повышался на 35,5 и 20,8 % по сравнению со значениями у крыс, находившихся на ВЖД 3 месяца, но оставался сниженным по сравнению с контрольными животными.

Устаноўлена, што алиментарная гиперхолестеролемия вызывает активацию свободно-радикального окисления, что доказывается увеличением уровня ТБК-ПВ в печени крыс в 1,3 раза и в 1,7 раза через 5 и 10 суток соответственно и снижением уровня восстановленного глутатиона в 1,4 и 1,5 раза соответственно (таблица 2).

Таблица 2. – Содержание ТБК-ПВ и восстановленного глутатиона в печени при моделировании алиментарной гиперхолестеролемии и применении ЭКДШ ($M \pm m$)

Группа животных (n = 9)	Показатель	
	ТБК– позитивные вещества, нмоль/г	Восстановленный глутатион, мкмоль/г
Контроль	$27,9 \pm 2,13$	$18,2 \pm 1,45$
ХС 5 суток	$35,8 \pm 2,03^1$	$12,5 \pm 1,20^1$
ХС 5 суток + ЭКДШ 7 мкг/100	$38,6 \pm 3,07^1$	$19,3 \pm 2,40^2$
ХС 5 суток + ЭКДШ 70 мкг/100	$34,0 \pm 2,23^4$	$16,9 \pm 0,83^2$
ХС 10 суток	$48,0 \pm 4,67^1$	$12,2 \pm 0,90^1$
ХС 10 суток + ЭКДШ 7 мкг/100	$35,6 \pm 2,66^{1,3}$	$16,5 \pm 1,37^3$
ХС 10 суток + ЭКДШ 70 мкг/100	$34,2 \pm 3,09^3$	$18,8 \pm 1,72^3$

Примечание – $^1P < 0,05$ по сравнению с контролем; $^2P < 0,05$ по сравнению с группой ХС 5 суток; $^3P < 0,05$ по сравнению с группой ХС 10 суток; $^4P = 0,05-0,1$ по сравнению с контролем.

ЭКДШ не оказал выраженного влияния на содержание ТБК-ПВ в печени крыс, получавших ХС в течение 5 суток, но в дозе 70 мкг свободных аминокислот / 100 г массы тела при моделировании алиментарной гиперхолестеролемии в течение 10 суток нормализовал уровень ТБК-ПВ до значений интактных животных. Уровень восстановленного глутатиона нормализовался до значений интактных животных при использовании обеих доз ЭКДШ при введении холестерина в течение 5 и 10 суток.

Для моделирования нарушения синтеза инсулина и инсулинорезистентности тканей чаще всего применяют экзогенные вещества, нарушающие функционирование инсулин-продуцирующих клеток или состояние инсулиновых рецепторов плазматических мембран клеток-мишеней. Считают, что наиболее адекватной моделью является введение животным стрептозотоцина – препарата, получаемого из бактерий *Streptomyces achromogenes*. После однократного введения стрептозотоцина наблюдают две фазы гипергликемии: первая в интервале 1–4 ч связана с уменьшением концентрации инсулина в плазме, а вторая развивается через 24–36 ч и характеризуется признаками, свойственными диабету [1–4].

При всех преимуществах моделирования сахарного диабета у млекопитающих имеется существенный недостаток, связанный с наличием системы замкнутого кровообращения, вследствие чего вводимый стрептозотоцин должен преодолевать гематоклеточный барьер и зависеть от нейрогуморальных механизмов регуляции кровообращения. В идеальном варианте модельная система должна включать клетки – продуценты инсулина, клетки – мишени для инсулина и биологическую жидкость, связывающую оба типа клеток. В эту трехкомпонентную систему следует вводить стрептозотоцин и в ней определять инсулин-зависимые метаболиты. Такая модель была создана путем введения легочным моллюскам стрептозотоцина. Это привело через сутки к повышению уровня гексоз в гемолимфе и развитию диабетоподобного состояния. Через 3 суток уровень гексоз в гемолимфе снижался [7; 21–23].

Устаноўлена, што стрептозотоцин удзвасяваў прыкладна ўдвое змяшчэнне ў гепатопанкреасе ТБК-ПВ. Прэпарат ЭКДШ прэпятстваваў такім змяненням, верагодна, за счэт моцнай антиаксідантнай сістэмы (табліца 3).

Таблица 3. – Влияние стрептозотоцина и экстракта куколок дубового шелкопряда на содержание ТБК-ПВ и восстановленного глутатиона в гепатопанкреасе моллюсков ($M \pm m$)

Группа (n = 9)	ТБК – позитивные вещества, нмоль/г	Восстановленный глутатион, мкмоль/г
<i>Lymnaea stagnalis</i>		
Контроль	12,1 ± 1,15	3,23 ± 0,87
Буфер 1-е сут	10,1 ± 3,13	3,91 ± 0,61
Стрептозотоцин 1-е сут	31,3 ± 1,73 ^{1, 2}	4,66 ± 0,19 ¹
ЭКДШ 1-е сут	11,8 ± 0,89 ³	3,03 ± 0,49 ³
ЭКДШ + стрептозотоцин 1-е сут	12,3 ± 0,67 ³	2,83 ± 0,59 ³
Буфер 2-е сут	12,9 ± 2,64	3,09 ± 0,40
Стрептозотоцин 2-е сут	38,4 ± 3,31 ^{1, 2}	3,31 ± 0,72
ЭКДШ 2-е сут	14,5 ± 0,66 ³	3,37 ± 0,61
ЭКДШ + стрептозотоцин 2-е сут	13,5 ± 0,61 ³	3,21 ± 0,57
<i>Planorbarius corneus</i>		
Контроль	11,2 ± 0,91	4,65 ± 0,59
Буфер 1-е сут	9,9 ± 0,56	4,73 ± 0,61
Стрептозотоцин 1-е сут	19,2 ± 0,81 ^{1, 2}	3,54 ± 0,65 ¹
ЭКДШ 1-е сут	9,4 ± 0,77 ³	4,61 ± 0,99
ЭКДШ + стрептозотоцин 1-е сут	11,1 ± 1,49 ³	4,06 ± 0,44
Буфер 2-е сут	11,4 ± 2,75	4,33 ± 1,08
Стрептозотоцин 2-е сут	47,5 ± 2,62 ^{1, 2}	2,81 ± 0,57 ^{1, 2}
ЭКДШ 2-е сут	10,0 ± 1,99 ³	4,63 ± 1,11 ³
ЭКДШ + стрептозотоцин 2-е сут	21,6 ± 1,71 ^{1, 2, 3}	3,81 ± 0,57 ^{1, 3}

Примечание – ¹ $p < 0,05$ по сравнению с контролем, ² $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем, ³ $p < 0,05$ по сравнению с группой «стрептозотоцин».

Вклад восстановленного глутатиона в ингибирование окислительного стресса не так очевиден. Можно лишь отметить положительные изменения в содержании восстановленного глутатиона через 24 часа после введения стрептозотоцина у прудовиков и через 48 часов – у катушек. Однако выявлено, что стрептозотоцин у прудовиков вызывал повышение содержания восстановленного глутатиона через 24 ч, а у катушек – снижение содержания восстановленного глутатиона через 48 часов, что связано с различными механизмами транспорта кислорода у двух видов моллюсков.

Реакция живых организмов на факторы среды изучена не полностью. В результате различных видов человеческой деятельности в воздух и почву выбрасывается более 200 различных компонентов. Среди них обширную группу занимают тяжелые металлы, влияние которых на живые организмы в последнее время изучается на морфофизиологическом и биохимическом уровнях.

Результаты, представленные в таблице 4, показывают, что добавление сульфата меди (II) в раствор с пресноводными моллюсками даже в концентрации, не превышающей ПДК, приводит к активации процессов перекисного окисления липидов, что доказывается увеличением содержания ТБК-ПВ во всех экспериментальных группах. При концентрации сульфата меди (II) 0,01 мг/л содержание ТБК-ПВ в гепатопанкреасе прудовика увеличивается в 1,7 раза, 0,1 мг/л – в 3,2 раза, 1,0 мг/л – в 3,4 раза. Аналогичная дозозависимая реакция обнаружена у катушки роговой: содержание ТБК-ПВ при концентрациях 0,01 мг/л, 0,1 мг/л и 1,0 мг/л увеличивалось в 1,5, 2,2 и 2,9 раза соответственно.

Активация процесса перекисного окисления липидов при воздействии сульфата меди (II) сопровождалась изменением содержания восстановленного глутатиона. В гепатопанкреасе *Lymnaea stagnalis*, содержащихся в воде с концентрацией сульфата меди (II)

0,1 мг/л, уровень восстановленного глутатиона снижался на 34,2 %, при концентрации сульфата меди 1,0 мг/л – на 46,1 % по сравнению с контрольной группой (таблица 4).

Аналогичные изменения отмечены в гепатопанкреасе *Planorbarius corneus*: истощение запасов глутатиона при концентрации сульфата меди 0,1 мг/л – на 32,3 %, при концентрации 1,0 мг/л – на 40 %.

Таблица 4. – Влияние сульфата меди (II) на содержание ТБК-ПВ и восстановленного глутатиона в гепатопанкреасе *Lymnaea stagnalis* и *Planorbarius corneus* ($M \pm m$)

Группа (n = 9)	ТБК – позитивные вещества, нмоль/г	Восстановленный глутатион, мкмоль/г
<i>Lymnaea stagnalis</i>		
Контроль	$8,81 \pm 0,45$	$4,79 \pm 0,15$
CuSO ₄ , 0,01 мг/л	$15,2 \pm 0,16^1$	$4,11 \pm 0,19$
CuSO ₄ , 0,1 мг/л	$27,8 \pm 0,57^1$	$3,36 \pm 0,20^1$
CuSO ₄ , 1,0 мг/л	$29,8 \pm 1,35^1$	$2,81 \pm 0,19^1$
<i>Planorbarius corneus</i>		
Контроль	$13,1 \pm 0,88$	$4,43 \pm 0,18$
CuSO ₄ , 0,01 мг/л	$20,2 \pm 2,18$	$3,85 \pm 0,17$
CuSO ₄ , 0,1 мг/л	$28,3 \pm 1,88^1$	$2,97 \pm 0,23^1$
CuSO ₄ , 1,0 мг/л	$38,0 \pm 1,97^1$	$2,84 \pm 0,15^1$

Примечание – ¹p < 0,05 по сравнению с контролем.

Антропогенная нагрузка оказывает неблагоприятное воздействие на процесс функционирования водных экосистем. Пресноводные моллюски являются важнейшей составляющей большинства водных биоценозов и применяются для биоиндикации загрязнения окружающей среды. Большая численность и широкая распространенность, легкость сбора и идентификации, короткий жизненный цикл, высокая чувствительность к загрязнению позволяют использовать легочных пресноводных моллюсков в практике пассивного и активного биомониторинга.

Содержание ТБК-ПВ имеет сезонный характер изменения. Установлено, что наибольшее содержание данного показателя фиксируется в весенний период, наименьшие значения – в летний период сбора моллюсков. Полученные изменения в концентрации ТБК-ПВ имеют однотипный характер во всех исследуемых районах сбора моллюсков: самое высокое значение – в весенний период, среднее значение – в осенний период, наименьшее значение – в летний период (таблица 5).

По сравнению с летним периодом сбора в моллюсках повышено содержание ТБК-ПВ в весенний период в 1,8 раза Витебский район, в 2,3 раза – в Дубровенском, Шумилинском и Сенненском районах, в 1,3 раза в Бешенковичском и Ушачском районах. По сравнению с летним периодом сбора в моллюсках повышено содержание ТБК-ПВ в осенний период в 1,2 раза в Витебском, Бешенковичском и Ушачском районах, в 1,5 раза – в Дубровенском, Шумилинском и Сенненском районах. По сравнению с осенним периодом сбора содержание ТБК-ПВ в гепатопанкреасе катушки роговой с весенним периодом статистически значимые отличия получены в 1,5 раза в Витебском и Шумилинском районах, в 1,3 раза – в Дубровенском и Сенненском районах.

При сравнении данного показателя между районами выявлено, что наибольшие значения и их варьирование отмечены у моллюсков, собранных в Витебском, Шумилинском и Сенненском районах. При сравнении показателя у моллюсков из проточного водоема (р. Витьба, Витебский р-н) и стоячей воды (озера всех остальных районов) отмечаются более высокие значения для моллюсков, обитающих в проточной воде (таблица 5).

Таблица 5. – Содержание ТБК-ПВ в гепатопанкреасе *Planorbarius corneus* и *Lymnaea stagnalis* ($M \pm m$), нмоль/г

Территория сбора моллюсков	Сезон		
	Весна (n = 9)	Лето (n = 9)	Осень (n = 9)
<i>Planorbarius corneus</i>			
Витебский р-н	$8,04 \pm 0,55^{1,2}$	$4,36 \pm 0,25$	$5,24 \pm 0,33^1$
Дубровенский р-н	$5,98 \pm 0,36^{1,2}$	$2,67 \pm 0,24$	$4,54 \pm 0,17^1$
Бешенковичский р-н	$5,13 \pm 0,61^1$	$3,68 \pm 0,31$	$4,53 \pm 0,45^1$
Ушачский р-н	$5,77 \pm 0,42^1$	$4,49 \pm 0,29$	$5,58 \pm 0,64^1$
Шумилинский р-н	$7,93 \pm 0,42^{1,2}$	$3,34 \pm 0,30$	$5,08 \pm 0,78^1$
Сенненский р-н	$5,84 \pm 0,34^{1,2}$	$2,78 \pm 0,21$	$4,11 \pm 0,23^1$
<i>Lymnaea stagnalis</i>			
Витебский р-н	$9,32 \pm 0,47^{1,2}$	$3,56 \pm 0,24$	$5,18 \pm 0,26^1$
Дубровенский р-н	$5,34 \pm 0,21^1$	$2,67 \pm 0,18$	$4,22 \pm 0,34^1$
Бешенковичский р-н	$5,77 \pm 0,36^1$	$3,36 \pm 0,45$	$5,74 \pm 0,23^1$
Ушачский р-н	$7,42 \pm 0,35^{1,2}$	$3,83 \pm 0,50$	$5,37 \pm 0,41^1$
Шумилинский р-н	$9,21 \pm 0,55^{1,2}$	$3,42 \pm 0,26$	$5,30 \pm 0,38^1$
Сенненский р-н	$5,86 \pm 0,28^1$	$2,87 \pm 0,27$	$4,32 \pm 0,26^1$

Примечание – $^1p < 0,05$ по сравнению с летним периодом сбора моллюсков; $^2p < 0,05$ по сравнению с осенним периодом сбора моллюсков.

По сравнению с летним периодом сбора в гепатопанкреасе *Planorbarius corneus* повышено содержание восстановленного глутатиона в весенний период в 1,5 раза во всех исследуемых районах. По сравнению с летним периодом сбора отмечено повышение содержания восстановленного глутатиона в осенний период в 1,3 раза во всех исследуемых районах. По сравнению с осенним периодом содержание восстановленного глутатиона в гепатопанкреасе с весенним периодом статистически значимые отличия получены в 1,2 раза в Витебском, Дубровенском, Ушачском, Шумилинском и Сенненском районах (таблица 6).

Таблица 6. – Содержание восстановленного глутатиона в гепатопанкреасе *Planorbarius corneus* и *Lymnaea stagnalis* ($M \pm m$), мкмоль/г

Территория сбора моллюсков	Сезон года		
	Весна (n = 9)	Лето (n = 9)	Осень (n = 9)
<i>Planorbarius corneus</i>			
Витебский р-н	$11,43 \pm 0,15^{1,2}$	$7,22 \pm 0,08$	$8,94 \pm 0,07^1$
Дубровенский р-н	$10,56 \pm 0,06^{1,2}$	$7,04 \pm 0,04$	$9,16 \pm 0,13^1$
Бешенковичский р-н	$10,18 \pm 0,24^{1,2}$	$7,02 \pm 0,07$	$9,56 \pm 0,12^1$
Ушачский р-н	$10,61 \pm 0,21^{1,2}$	$7,18 \pm 0,04$	$9,01 \pm 0,11^1$
Шумилинский р-н	$10,76 \pm 0,04^{1,2}$	$7,14 \pm 0,06$	$8,87 \pm 0,09^1$
Сенненский р-н	$10,58 \pm 0,06^{1,2}$	$6,87 \pm 0,03$	$8,92 \pm 0,05^1$
<i>Lymnaea stagnalis</i>			
Витебский р-н	$11,64 \pm 0,13^{1,2}$	$8,04 \pm 0,05$	$9,12 \pm 0,08^1$
Дубровенский р-н	$10,12 \pm 0,16^{1,2}$	$7,56 \pm 0,17$	$9,26 \pm 0,06^1$
Бешенковичский р-н	$10,06 \pm 0,06^{1,2}$	$7,47 \pm 0,19$	$9,09 \pm 0,05^1$
Ушачский р-н	$11,23 \pm 0,03^{1,2}$	$8,16 \pm 0,23$	$9,36 \pm 0,06^1$
Шумилинский р-н	$10,32 \pm 0,23^{1,2}$	$8,34 \pm 0,16$	$9,18 \pm 0,05^1$
Сенненский р-н	$10,48 \pm 0,08^{1,2}$	$7,32 \pm 0,07$	$8,78 \pm 0,13^1$

Примечание – $^1p < 0,05$ по сравнению с летним периодом сбора моллюсков; $^2p < 0,05$ по сравнению с осенним периодом сбора моллюсков.

В летний период сбора у *Lymnaea stagnalis* содержание восстановленного глутатиона в 1,3 раза меньше, чем весной и осенью. Самое большое значение зафиксировано в Ушачском и Бешенковичском районах, это в 1,3 раз больше, чем в Шумилинском районе весной (таблица 6).

Установлено, что содержание восстановленного глутатиона в летнее время имеет самые низкие показатели, т. к. в это время степень неблагоприятного воздействия факторов окружающей среды минимальна. Показатели в весеннее и осеннее время превышают в 1,5 раза значения в летнее время сбора. Однако весной вследствие низкой температуры и недостатка пищи моллюски испытывают стресс и значение показателей выше, чем в осеннее время сбора.

Для сопоставления данных по изучаемым показателям у крыс и моллюсков была составлена таблица значений по контрольным группам животных (таблица 7). Установлено, что значение исследуемых показателей между крысами и моллюсками являются сопоставимыми по числу и отличаются в среднем от 2,1 до 5,6 раза. Данные отличия связаны с особенностями метаболизма различных видов животных. Изменения содержания показателей у контрольных групп моллюсков связано с условиями окружающей среды и варьирует в пределах 2,6–2,8 раза между экспериментальными моделями.

Таблица 7. – Содержание ТБК-позитивных веществ и восстановленного глутатиона у контрольных групп экспериментальных животных ($M \pm m$)

Модель	Показатель	
	ТБК-ПВ, нмоль/г	ГSH, мкмоль/г
Инсулинорезистентность крысы	20,1 ± 1,82	17,8 ± 1,32
Гиперхолестеролемиа крысы	27,9 ± 2,13	18,2 ± 1,45
Гипергликемия <i>Planorbarius corneus</i>	11,2 ± 0,91	4,65 ± 0,59
Гипергликемия <i>Lymnaea stagnalis</i>	12,1 ± 1,15	3,23 ± 0,87
Влияние Cu ²⁺ <i>Planorbarius corneus</i>	13,1 ± 2,63	4,43 ± 0,53
Влияние Cu ²⁺ <i>Lymnaea stagnalis</i>	8,81 ± 1,34	4,79 ± 0,44
Мониторинг загрязнения водоемов (<i>Planorbarius corneus</i>)	5,24 ± 0,33 ¹	9,16 ± 0,13 ¹
Мониторинг загрязнения водоемов (<i>Lymnaea stagnalis</i>)	5,18 ± 0,26 ¹	9,12 ± 0,08 ¹

Примечание – Моллюски собраны в осень (сентябрь–октябрь) в оз. Вордовье в районе д. Ляды Дубровенского района Витебской области.

Заклучение

При моделировании инсулинорезистентности и применении экстракта куколок дубового шелкопряда установлено, что содержание крыс на высокожировой диете приводит к развитию инсулинорезистентности, степень выраженности которой зависит от продолжительности диеты. В этой модели обнаружен антиоксидантный эффект экстракта куколок дубового шелкопряда, характеризующийся нормализацией уровня ТБК – реагирующих субстанций и увеличением уровня восстановленного глутатиона в печени.

При алиментарной гиперхолестеролемии выявлены метаболические нарушения, характерные для инсулинорезистентности. Алиментарная гиперхолестеролемиа сопровождается развитием окислительного стресса, что доказывается увеличением содержания ТБК– позитивных веществ и снижением содержания восстановленного глутатиона в печени. Экстракт куколок дубового шелкопряда проявляет в этих условиях антиоксидантное и гипогликемическое действия.

Проведенные исследования показали, что стрептозотоциновая модель сахарного диабета 1 типа у легочных пресноводных улиток является доступной и дешевой. В относительно простой системе незамкнутого кровообращения достигается прямой эффект

взаимодействия компонентов гемолимфы с клетками тканей. Используя эту модель, удалось испытать антидиабетогенное действие экстракта куколок дубового шелкопряда.

Установлено, что ионы меди в концентрации 0,01–1,0 мг/л дозозависимо увеличивают содержание ТБК-положительных веществ в гепатопанкреасе *Lymnaea stagnalis* и *Planorbis corneus*. Воздействие ионов меди вызывает истощение запасов восстановленного глутатиона при концентрации сульфата меди 0,1 и 1,0 мг/л в гепатопанкреасе большого прудовика на 34,2–46,1 %, катушки роговой на – 32,2–40 %.

При исследовании моллюсков, обитающих в разных водоемах, выявлено: уровни ТБК-положительных веществ в гепатопанкреасе моллюсков изменяются однотипно во всех исследуемых водоемах (самые низкие значения летом, весенние значения превышают летний уровень примерно в 2 раза, а осенние – в среднем в 1,5 раза). Содержание ТБК – положительных веществ оказалось более высоким в проточных водоемах. Достоверных различий в сезонной динамике ТБК-ПВ у обоих видов моллюсков не выявлено. Содержание восстановленного глутатиона в гепатопанкреасе моллюсков изменялось аналогично, но с меньшими различиями в сезонной динамике: весной уровень показателя превышал летний уровень в среднем в 1,5 раза, а осенью – в 1,25 раза. В водоемах Ушачского и Бешенковичского районов также выявлено наиболее высокое содержание восстановленного глутатиона весной.

Таким образом, экспериментальные модели на моллюсках являются альтернативными моделями и целесообразны по экономическим и этическим соображениям. Сходный обмен веществ моллюсков и позвоночных животных позволяет их использовать в модельном эксперименте и мониторинге окружающей среды.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yilmaz, O. Method reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione concentration in animal tissue / O. Yilmaz // J. Animal Vet. Adv. – 2009. – Vol. 8. – P. 343–347.
2. Чиркин, А. А. Биохимия филогенеза и онтогенеза / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко, С. Б. Бокуть. – Минск : Новое знание ; М. : ИНФРА-М, 2012. – 288 с.
3. Меньщикова, Е. Б. Биохимия окислительного стресса. Оксиданты и антиоксиданты в организме / Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков, С. М. Шергин // Успехи биол. химии. – 1990. – Т. 31. – С. 180–208.
4. Осипов, А. Н. Активированные формы кислорода и их роль в организме / А. Н. Осипов, О. А. Азизова, Ю. А. Владимиров // Успехи биол. химии. – 1990. – Т. 31. – С. 180–208.
5. Чадаев, В. Е. Модельные объекты в медицине и ветеринарии / В. Е. Чадаев // Вісн. проблем біології і медицини. – 2012. – Вип. 3, т. 2 (95). – С. 140–145.
6. Шевцова, С. Н. Влияние сульфата меди на рост, выживаемость и уровень экспрессии металлотioneинов у пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* / С. Н. Шевцова, А. С. Бабенко, С. Е. Дромашко // Тр. БГУ. – 2011. – Т. 6, ч. 1. – С. 152–162.
7. Дромашко, С. Е. Биотестирование – составной элемент оценки состояния окружающей среды : учеб.-метод. пособие / С. Е. Дромашко, С. Н. Шевцова. – Минск : ИПНК, 2012. – 82 с.
8. Detailed review paper (DRP) on molluscs life-cycle toxicity testing Environment Directorate // Series on Testing and Assessment. – Paris : OECD Environment, Health and Safety Publications. – 2010. – № 121. – 182 p.
9. Sedlak, K. J. Estimation of total proteinbound and nonprotein sulfhydryl group in tissues with Ellmans reagent / K. J. Sedlak, R. Lindsay // Analit. Biochem. – 1968. – Vol. 25. – P. 192–205.

10. Стальная, И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Е. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – М. : Медицина, 1977. – С. 66–68.
11. Uchiyama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchiyama, M. Mihara // *Analit. Biochem.* – 1987. – Vol. 86. – P. 271–278.
12. Beutler, E. Red cell metabolism a manual of biochemical methods / E. Beutler. – Orlando : Grune & Stratton, 1990. – P. 131–134.
13. Толкачева, Т. А. Гистологиз: теория и практика: монография / Т. А. Толкачева. – Витебск : ВГУ им. П. М. Машерова, 2015. – 136 с.
14. Балаева-Тихомирова, О. М. Гормонально-метаболические взаимосвязи при развитии синдрома инсулинорезистентности / О. М. Балаева-Тихомирова. – Витебск : ВГУ им. П. М. Машерова, 2013 – 176 с.
15. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк [и др.]. – Киев : Виш. шк., 1983. – 381 с.
16. Model of nonalcoholic steatohepatitis / C. S. Lieber [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – Vol. 79. – P. 502–509.
17. Способ получения лечебного экстракта : а. с. СССР 178439 А1 / В. А. Трокоз [и др.] ; патент Украины 1696. – 1997.
18. Radiation-induced thyroid carcinogenesis as a function of time and dietary iodine supply: an in vivo model of tumorigenesis in the rat / C. Boltze [et al.] // *Endocrinology.* – 2002. – Vol. 143, № 7. – P. 2584–2592.
19. Jowsufzal, S. Y. 3-Hydroxy-3-Methylglutaric Acid and Experimental Atherosclerosis in Rats / S. Y. Jowsufzal, M. Siddigi // *Experientia.* – 1976. – Vol. 8. – P. 1033–1034.
20. Стрептозотоциновая модель сахарного диабета у моллюска *Anodonta cygnea* / Л. А. Кузнецова [и др.] // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 2007. – Т. 43, № 6. – С. 460–467.
21. Можейко, Л. А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета / Л. А. Можейко // Журн. ГрГМУ. – 2013. – № 4. – С. 5–10.
22. Можейко, Л. А. Механизмы воздействия аллоксана и стрептозотоцина на В-клетки поджелудочной железы при моделировании сахарного диабета у экспериментальных животных / Л. А. Можейко // Новости медико-биол. наук. – 2014. – Т. 10, № 3. – С. 128–133.
23. Гормонально-биохимические особенности аллоксановой и стрептозотоциновой моделей экспериментального диабета / Н. А. Пальчикова [и др.] // Бюл. СО РАМН. – 2013. – Т. 33, № 6. – С. 18–24.

Рукапіс паступіў у рэдакцыю 10.12.2019

Balaeva-Tikhomirova O. M., Katsnelson E. I., Volodko A. S. Some Indicators of Free Radical Oxidation in Model Test Organisms on the Example of Use of Rats and Pulmonary Mollusks

One of the current problems of laboratory diagnostics remains the search for alternative living organisms to rats, which allow for the diagnosis of oxidative stress and systematic monitoring and screening of the state of the antioxidant system and the level of free radical oxidation in the body. The mollusk experimental models are feasible for economic and ethical reasons. A similar metabolism of mollusks and invertebrates allows them to be used in a model experiment and environmental monitoring. The main characteristics of mollusks as test objects widely used in biomonitoring and bioindication are high sensitivity to contaminants and xenobiotics, wide distribution, ease of collection and identification, short life cycle. The article compares the parameters of the antioxidant system of pulmonary freshwater mollusks and rats in the experiment.