

ТКАНИННА СПЕЦИФІКА ФУНКЦІОНУВАННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ТА ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ В АМУРСЬКОГО САЗАНА РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП

С. І. КРАСЬ, С. І. ТАРАСЮК

*Інститут рибного господарства НААН України, Київ;
e-mail: s_kras@inbox.ru, tarasjuk@ukr.net*

Досліджували тканинні особливості функціонування ключових ензимів системи антиоксидантного захисту (АОЗ) у статевозрілих і статевонезрілих особин амурського сазана. Встановлено, що зміни активності ензимів системи АОЗ та інтенсивності пероксидного окислення ліпідів характеризуються видовими органо-тканинними та віковими особливостями метаболізму і найвираженішими є в міокарді.

Ключові слова: амурський сазан, система антиоксидантного захисту, пероксидне окислення ліпідів, каталаза, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, ТБК-активні продукти, дієнові кон'югати.

Важливим напрямом у вивченні фізіологічної адаптації організму тварин, зокрема холоднокровних, до навколишнього середовища є дослідження змін у функціональному стані системи антиоксидантного захисту (АОЗ) та інтенсивності процесів, що пов'язані з активними формами кисню (АФК). Як відомо, у тканинах за фізіологічних умов у процесі окисно-відновних реакцій постійно утворюються АФК, які відіграють провідну роль у багатьох біохімічних та фізіологічних процесах, зокрема у підтриманні гомеостазу та забезпеченні адаптації до мінливих умов середовища [1]. Надмірна інтенсифікація процесів вільнорадикального окислення за участю АФК призводить до посилення пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), модифікації молекул протеїнів і нуклеїнових кислот [2]. На клітинному рівні контроль інтенсивності пероксидних процесів здійснює система АОЗ, яку за специфікою біологічного впливу можна розділити на антигіпероксидну, антирадикальну і антипероксидну, а за механізмом – на антиоксиданти прямої і непрямой дії. Як і у ссавців система АОЗ риб включає в себе вищезгадані компоненти [3]. Проте організм риб чутливіший до процесів ПОЛ, ніж організм ссавців [4], оскільки вміст поліненасичених жирних кислот у фосфоліпідах клітинних мембран тканин риб є вищим [5]. На сучасному етапі добре висвітлено вікову динаміку тканинної специфічності механізмів АОЗ та пероксидного окислення ліпідів у теплокровних, тоді як

у риб вони описані фрагментарно [6–8]. Враховуючи специфічність функціонування системи АОЗ та перебігу процесів ПОЛ, вивчення тканинних особливостей зазначених вище процесів у риб є актуальним.

Тому метою дослідження було вивчення активності ензимів системи АОЗ та процесів ПОЛ у тканинах статевонезрілих і статевозрілих особин амурського сазана (*Cyprinus carpio haematopterus*).

Матеріали і методи

У роботі було використано зразки тканин і органів статевонезрілих (вік 2 роки, середньою масою 1,1–1,5 кг) і статевозрілих (вік 7 років, середньою масою 3,6–4,0 кг) амурських сазанів обох статей. Риб вирощували у ставах Львівської дослідної станції Інституту рибного господарства НААН. Величина вибірки становила 6 особин. Враховуючи залежність активності ензимів АОЗ в організмі риб від сезону і кисневого режиму водойми [6], для мінімізації впливу фактора сезонності відбір зразків тканин проводили на початку травня. У досліді використовували реактиви фірми Sigma (США).

Після декапітації тварин видалені органи і тканини поміщали в охолоджений розчин Рінгера (-2 °С), який містив (мМ): NaCl – 103, KCl – 1,01, CaCl₂ – 0,91, NaHCO₃ – 1,2. Охолоджену тканину подрібнювали, пропускали через прес і гомогенізували за допомогою гомогенізатора Поттера–Евельгейма при швидкості 300 обертів за 1 хв і 3 вертикальних

ходах товчачика. Співвідношення тканини до розчину – 1 : 9.

Стан системи АОЗ організму амурського сазана оцінювали за активністю ензимів: супероксиддисмутази (СОД; 1.15.1.1) [9], каталази (1.11.1.6) [10] і глутатіонпероксидази (ГП; 1.11.1.9) [11] та вмісту продуктів ПОЛ: дієнових кон'югатів (ДК) [12] та ТБК-активних продуктів [13] в еритроцитах та гомогенатах тканин. Вміст протеїну визначали за Lowry et al. [14] з використанням реактивів фірми Simko (Україна).

Кров стабілізували розчином гепарину з розрахунку 25 МО на 1 мл крові, і фракціонували центрифугуванням протягом 10 хв при 2000 об./хв; фракцію еритроцитів тричі промивали 10-кратним об'ємом розчину Рінгера.

Активність СОД визначали за ступенем гальмування реакції окислення кверцетину супероксидним аніон-радикалом при кімнатній температурі. Реакційна суміш складалася з 1 мл 0,1 М розчину фосфатного буфера, рН 7,8, який містив 0,08 мМ етилендіамінтетраацетат (ЕДТА), 0,8 мМ тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД), 2,4 мл H_2O і 0,1 мл гомогенату (в розведенні 1 : 500). Реакцію ініціювали внесенням в реакційне середовище 0,1 мл розчину кверцетину. Контрольна проба не містила гомогенату. Оптичні спектри поглинання контрольної і дослідної проб реєстрували на спектрофотометрі (UNICO 2100) за довжини хвилі 406 нм (кювета 10 мм) проти води двічі: в момент внесення кверцетину і через 20 хв після цього. Активність ензиму виражали в од. акт. · хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну.

Активність каталази визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 410 нм. Реакційна суміш дослідної проби містила 2 мл 0,03%-го розчину пероксиду водню, до якої додавали 0,1 мл гомогенату тканин у розведенні 1 : 10, приготованому на 0,05 М трис-НСІ-буфері (рН 7,8). Суміш інкубували 10 хв при кімнатній температурі. Після чого у пробу вносили 1 мл 4%-го розчину молібдату амонію, приготованому на 0,25 н H_2SO_4 . Реакцію зупиняли внесенням 1 мл 0,25 н H_2SO_4 . У контрольній пробі розчин пероксиду водню інкубували 10 хв із розчином молібдату амонію, після чого в суміш вносили 0,1 мл гомогенату та 1 мл 0,5 н H_2SO_4 .

Для визначення активності глутатіонпероксидази у пробірку вносили 80 мкл 4,8 мМ розчину відновленого глутатіону (готували безпосередньо перед визначенням на трис-НСІ-буфері (рН 8,5), що містив 6 мМ

ЕДТА і 12 мМ азиду натрію), 200 мкл гомогенату (розведення 1 : 50) та інкубували 10 хв при 37 °С. У пробірку додавали 1 мл 20 мМ гідропероксиду третбутилу (ГПТ). Суміш інкубували 5 хв при 37 °С. У суміш додавали 200 мкл 20%-го розчину трихлороцтової кислоти, після чого фільтрували. До 0,1 мл фільтрату додавали 10 мл 0,1 М трис-НСІ-буфера (рН 8,5), 0,1 мл 0,1 М розчину реактиву Еллмана. У контрольній пробі гомогенат вносили після додавання ГПТ. Абсорбцію контрольної і дослідних проб вимірювали на спектрофотометрі при 412 нм проти води в кюветі товщиною 10 мм.

Інтенсивність вільнорадикальних процесів оцінювали за накопиченням дієнових кон'югатів [12] після екстракції ацилгідропероксидів в гептановий шар та ТБК-активних продуктів [13] за взаємодії малонового діальдегіду та тіобарбітурової кислоти у крові та тканині печінки контрольних і піддослідних шурів.

Концентрацію протеїну в досліджуваних зразках тканин визначали за Lowry et al. [14] з використанням реактивів фірми Simko (Україна).

Фактор антиоксидантного стану (ФАС), що характеризує кількісні зміни антиоксидантного статусу тканин, розраховували за формулою:

$$FAC = \frac{СОД + каталаза}{ТБК - активні продукти}$$

Опрацювання експериментальних результатів проводили методом варіаційної статистики [15]. Статистично вірогідну різницю показників двох вікових груп оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента, вірогідність відмінностей показників між тканинами оцінювали, застосовуючи однофакторний дисперсійний аналіз. Підрахунки здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel 2007 для Windows Vista.

Результати та обговорення

За результатами досліджень нами було проведено однофакторний дисперсійний аналіз відмінностей значень за всіма досліджуваними показниками між тканинами у групах. Встановлено, що у групі статевонезрілих риб наявна статистично вірогідна відмінність ($P < 0,01$) у значеннях активності досліджуваних ензимів та вмісту продуктів ПОЛ між тканинами, тоді як у тканинах статевозрілих риб виявлено статистично вірогідну різницю з

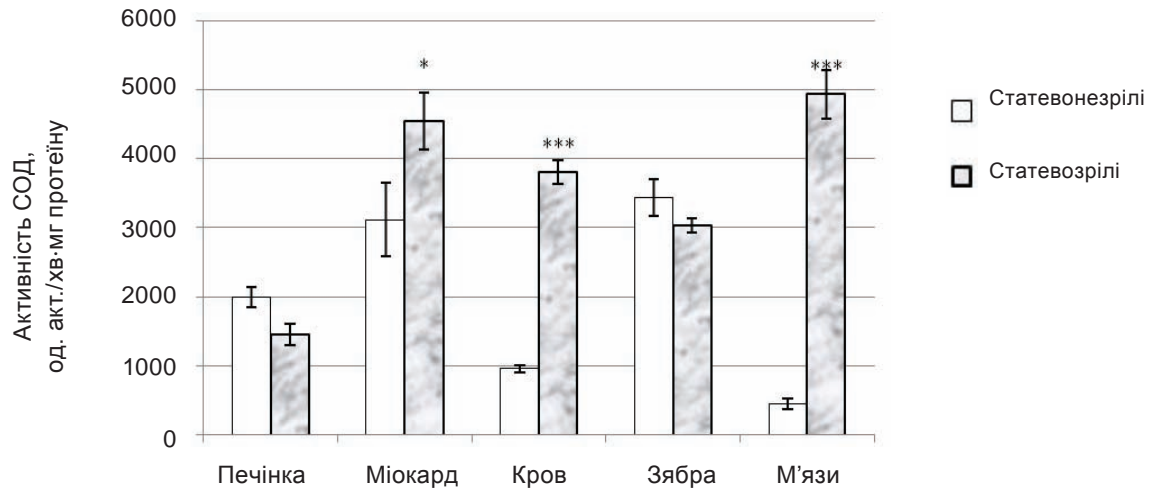


Рис. 1. Активність СОД (од. акт. · хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну) у печінці, міокарді, крові, зябрах та м'язах амурського сазана різного віку ($M \pm m$, $n = 6$). Тут і на рис. 2–6: * різниця в досліджуваних показниках у тканинах статевозрілих риб по відношенню до статевонезрілих вірогідна; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

рівнем значущості похибки ($P < 0,05$) за всіма досліджуваними показниками, окрім вмісту ТБК-активних продуктів.

У печінці активність СОД (рис. 1), незалежно від віку тварин, була невисокою і становила 2000 ± 143 од. акт. · хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну у статевонезрілих і 1460 ± 150 од. акт. · хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну у статевозрілих тварин, тоді як у скелетних м'язах статевозрілих риб вона була найвищою і у 2,5 раза перевищувала активність СОД у печінці. На відміну від статевозрілих особин, у статевонезрілих активність СОД у м'язах була найнижчою з усіх досліджених тканин у 10,8 раза, ніж у статевозрілих.

Це стосується і активності ГП, котра в печінці обох вікових груп риб була низькою (рис. 2), тоді як у скелетних м'язах вона, навпаки, була вищою у статевонезрілих риб у 6,4 раза (до $150 \pm 4,4$ мкмоль GSH·хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну) по відношенню до активності ГП у печінці, у статевозрілих в 6,5 раза (до 168 ± 4 мкмоль GSH·хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну). Виявлена нами низька активність СОД і ГП у печінці амурського сазана, порівняно з іншими тканинами і органами, характерна і для печінки строкатого товстолобика (*Hypophthalmichthys nobilis*) і білого амура (*Stenopharyngodon idella*) [6, 7], проте як у форелі (*Oncorhynchus mykiss*) і осетра (*Acipenser*

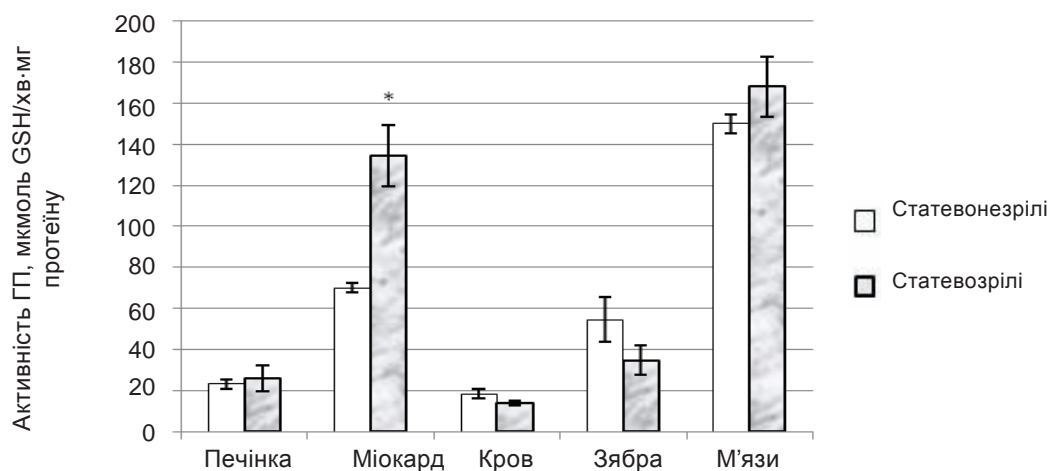


Рис. 2. Активність глутатіонпероксидази (мкмоль GSH·хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну) у печінці, міокарді, крові, зябрах та м'язах амурського сазана різного віку ($M \pm m$, $n = 6$)

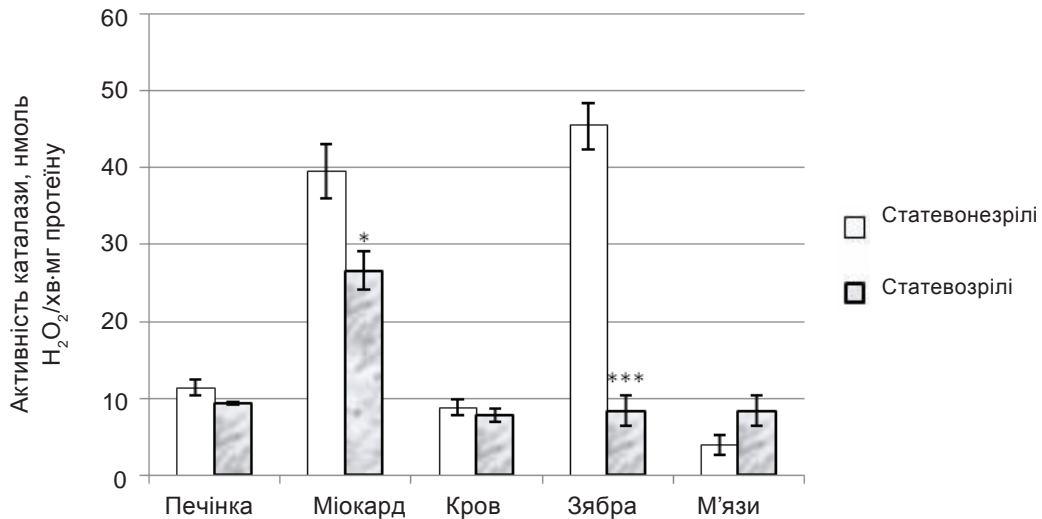


Рис. 3. Активність каталази (нмоль H_2O_2 :хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну) у печінці, міокарді, крові, зябрах та м'язах амурського сазана різного віку ($M \pm m$, $n = 6$)

passarii) найвищий показник активності СОД встановлено в печінці [8].

Активність каталази (рис. 3) у печінці була невисокою, але вищою порівняно з її активністю в м'язах статевонезрілих у 3 рази і на 9,7% у статевозрілих риб, що узгоджується із даними, наведеними в літературі [6].

Концентрація дієнових кон'югатів (рис. 4) у печінці статевозрілих риб свідчить про їхній високий вміст, який у 4,5 рази перевищує його у статевонезрілих. Це може вказувати на високу інтенсивність початкових етапів вільнорадикальних реакцій в печінці статевозрілих риб, але водночас вміст ТБК-активних продуктів, кінцевого продукту ПОЛ в печінці (рис. 5) не є високим.

Отже, нами встановлено, що в печінці амурського сазана, як і в інших прісноводних видів риб, характерною є значно нижча активність СОД і ГП, а каталази – вища, ніж у скелетних м'язах.

У міокарді найбільшу активність СОД виявлено у статевозрілих риб, яка на 38% вища, ніж у статевонезрілих (рис. 1). Активність ГП в ньому також була високою і на 92% перевищувала таку у статевонезрілих. Активність каталази в міокарді (рис. 3) знизилася на 33% у статевозрілих тварин, хоча порівняно до інших тканин перебувала на високому рівні.

Відомо, що у теплокровних (щурів) міокард із віком стає вразливішим до дії вільних радикалів, в ньому інтенсифікуються

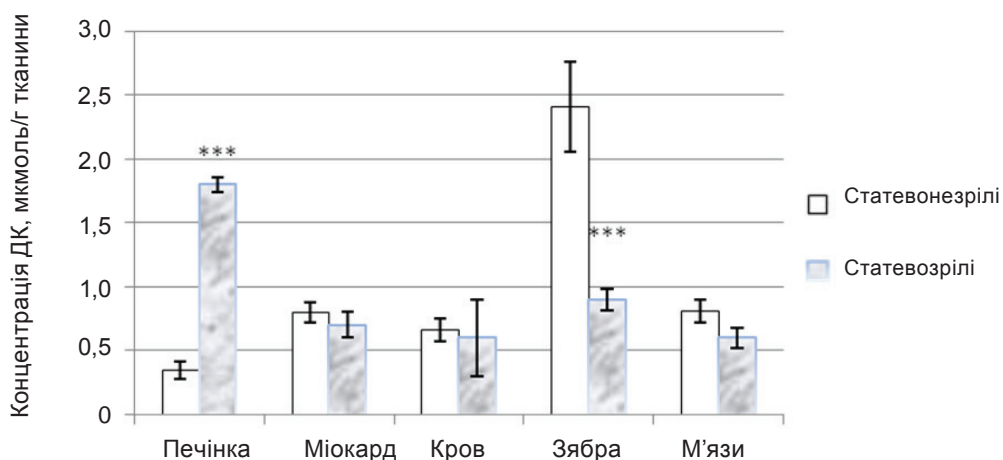


Рис. 4. Концентрація дієнових кон'югатів (мкмоль·г⁻¹ тканини) у печінці, міокарді, крові, зябрах та м'язах амурського сазана різного віку. ($M \pm m$, $n = 6$)

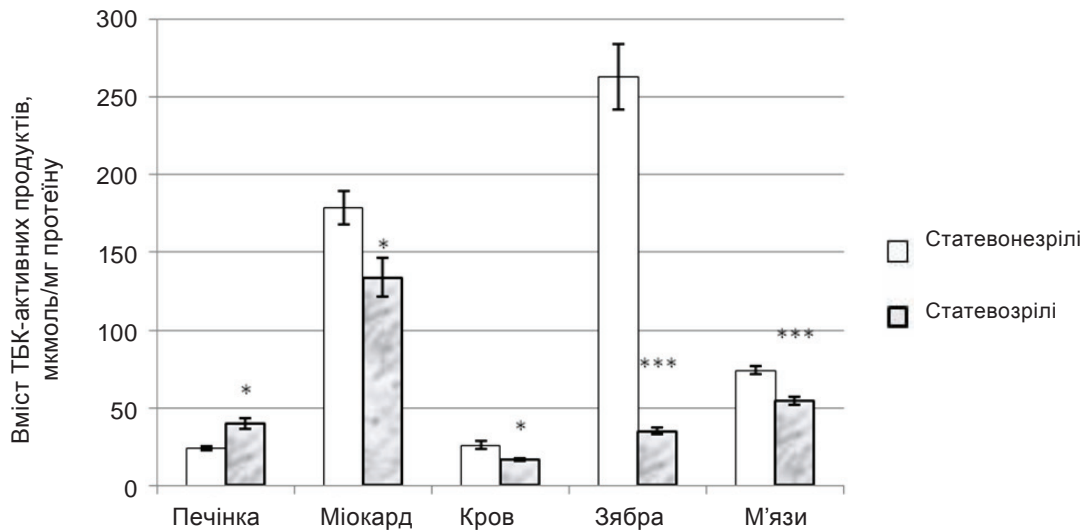


Рис. 5. Вміст ТБК-активних продуктів ($\mu\text{моль}\cdot\text{мг}^{-1}$ протеїну) в печінці, міокарді, крові, зябрах та м'язах амурського сазана різного віку ($M \pm m$, $n = 6$)

процеси ПОЛ [16]. Результати наших досліджень свідчать про те, що, на відміну від шурів [17], після статевого дозрівання в міокарді сазана (цих тварин можна віднести до фізіологічно молодих) вміст ТБК-активних продуктів (рис. 5) не зростає, а знижується на 36% до $134 \mu\text{моль}\cdot\text{мг}^{-1}$ протеїну відносно такого у статевонезрілих. Концентрація дієнових кон'югатів при цьому не зазнає статистично вірогідних змін.

Отже, з результатів наших досліджень випливає, що міокард сазана, на відміну від інших тканин, незалежно від віку тварин, характеризується високою активністю ензимів системи АОЗ. Після статевого дозрівання у тварин збільшується активність СОД і ГП, а КАТ, навпаки, знижується.

Плазма крові характеризується високою антиоксидантною активністю через наявність у ній значної кількості низько- і високомолекулярних сполук як ензимної, так і неензимної природи [18]. Відомо, що у крові є дві форми СОД — позаклітинна, активність якої досить низька, та цитозольна (Cu-, Zn- вмісна) з високою активністю. Крім того, деякі автори [18] вважають, що механізми дії системи АОЗ плазми крові базуються на її властивості сповільнювати металозалежні вільнорадикальні реакції, які пов'язані з утворенням гідроксильних радикалів. Високу активність СОД виявлено нами у крові статевозрілих риб (рис. 1). У статевонезрілих тварин величина цього показника в 4 рази є нижчою. Активність каталази та глутатіонпероксидази у крові з віком не зазнає

змін (рис. 2, 3). Найнижчий рівень процесів ПОЛ виявлено у крові статевозрілих риб: вміст ТБК-активних продуктів на 35% нижчий, ніж у статевонезрілих. Такі показники можна пояснити тим, що в міокарді статевозрілих риб інтенсифікуються процеси антиоксидантного захисту, зокрема за рахунок підвищення активності СОД і ГП. У печінці активність усіх ланок системи АОЗ не зазнає вікових змін. Це запобігає надходженню продуктів перексидного окислення ліпідів до крові [18].

Зябра, як орган, що забезпечує процес зовнішнього дихання риб, де відбувається інтенсивний газообмін між кров'ю і навколишнім середовищем, характеризуються високим рівнем метаболізму [19]. З огляду на це антиоксидантний захист зябер, в основному, залежить від антиоксидантних властивостей плазми крові і еритроцитів [20]. Нами встановлено, що у зябрах активність СОД є високою, незалежно від віку і близькою до активності СОД у міокарді (рис. 3). Активність каталази серед усіх тканин є найвищою (рис. 3) у статевонезрілих риб і становить $46 \pm 3 \text{H}_2\text{O}_2 \text{нмоль}\cdot\text{хв}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ протеїну, а у статевозрілих тварин вона знижується у 5,4 рази. Інтенсивність ПОЛ у зябрах є високою і зазнає вікових змін. Так, вміст ТБК-активних продуктів та дієнових кон'югатів (рис. 4, 5) у зябрах статевонезрілих тварин був найвищим з поміж усіх тканин. Високу активність ключових ферментів АОЗ у зябрах можна пояснити як реакцію на посилення інтенсивності процесів ПОЛ у цій тканині. В статевозрілих вміст ТБК-активних продуктів був нижчий у 7,5 рази, а ДК — у 2,6

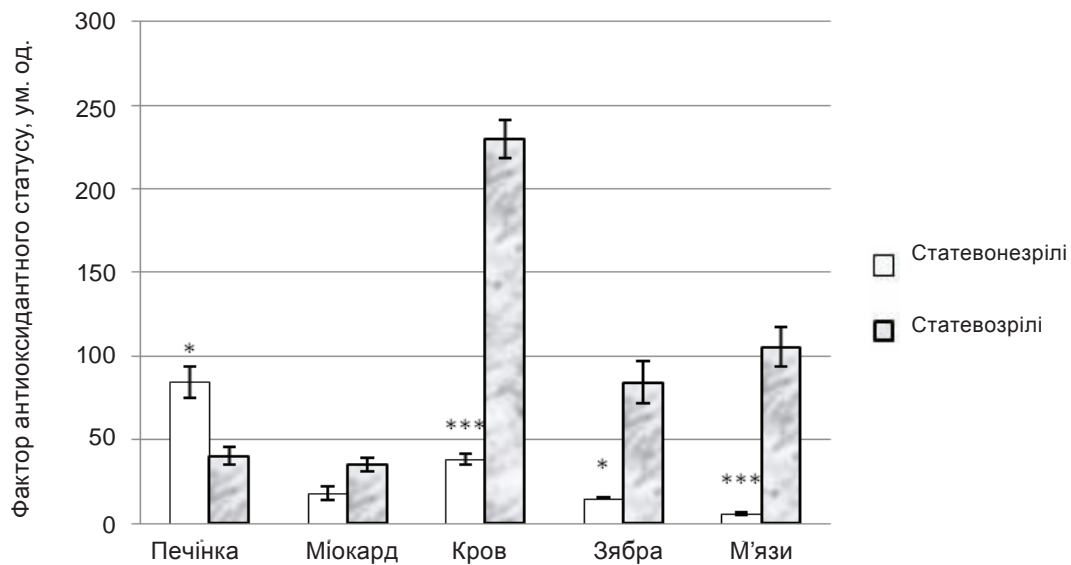


Рис. 6. Фактор антиоксидантного статусу у статевозрілих і статевонезрілих особин сазана амурського

раза порівняно з статевонезрілими. Таке зниження інтенсивності процесів ліпопероксидації в зябрах статевозрілих риб, з огляду на зниження в них антиоксидантних властивостей, можна пояснити як загальним високим рівнем активності ензимів АОЗ у печінці і міокарді, так і, зокрема, високим рівнем активності СОД у крові (рис. 1).

Таким чином, узагальнюючи одержані дані дослідження активності ензимів системи АОЗ з використанням ФАС, бачимо, що найвищий його рівень спостерігається у крові і м'язах статевозрілих риб (рис. 6), а найнижчий – у м'язах статевонезрілих. Найістотніше вираженими є онтогенетичні зміни активності ключових ензимів системи АОЗ для міокарда, причому для кожного окремо взятого ензиму вони виявляють різну спрямованість. У сазана амурського прослідковується чітка тканинна специфічність у функціонуванні ланки системи АОЗ, пов'язаної з глутатионом, зокрема це особливо виражено у м'язах і печінці. Отже, всі досліджені нами вікові зміни у функціонуванні системи АОЗ та інтенсивності ПОЛ характеризуються тканинною специфічністю, тобто залежать від функціональних особливостей тканин.

ТКАНЕВАЯ СПЕЦИФИКА АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У АМУРСКОГО САЗАНА РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУП

С. И. Крась, С. И. Тарасюк

Институт рыбного хозяйства
НААН Украины, Киев;
e-mail: s_kras@inbox.ru, tarasjuk@ukr.net

Исследовали тканевые особенности функционирования ключевых энзимов системы антиоксидантной защиты (АОЗ) у половозрелых и неполовозрелых особей амурского сазана. Установлено, что изменения в активности энзимов АОЗ и интенсивности пероксидного окисления липидов (ПОЛ) характеризуются органо-тканевыми и возрастными особенностями метаболизма и наиболее выражены в миокарде.

Ключевые слова: амурский сазан, система антиоксидантной защиты, пероксидное окисление липидов, каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, ТБК-активные продукты, диеновые конъюгаты.

**TISSUE SPECIFICITY
OF ANTIOXIDANT SYSTEM
FUNCTIONING AND LIPID
PEROXIDATION IN DIFFERENT AGE
GROUPS OF AMUR CARP**

S. I. Kras, S. I. Tarasjuk

Institute of Fisheries, National Academy
of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: s_kras@inbox.ru, tarasjuk@ukr.net

S u m m a r y

Key features of tissue enzymes functioning in antioxidant system (AOS) in sexually mature and immature individuals of Amur carp were studied. The activity of antioxidant enzymes was highest in the myocardium and subjected to age-related changes. It was concluded that changes in the functioning of AOS and intensity of lipid peroxidation processes are characterized by organ-tissue metabolic features and age peculiarities of metabolism that is most expressed in the myocardium.

Key words: Amur carp, antioxidant, lipid peroxidation, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, thiobarbituric acid reactive substances, diene conjugates.

1. *Lushchak V. I.* // *Aquat. Toxicol.* – 2011. – **101**. – P. 13–30.
2. *Dean R. T., Gebicki J., Gieseg S.* // *Mutat. Res.* – 1992. – **275**. – P. 387–393.
3. *Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2006. – **64**. – P. 178–189.
4. *Mourente G. G., Mourente, Tocher D. R.* // *Aquaculture.* – 1992. – **105**. – P. 363–388.
5. *Грициняк І. І., Смолянінов К. Б., Янович В. Г.* Обмін ліпідів у риби. – Львів: Тріада плюс, 2010. – 336 с.
6. *Олексюк Н. П., Янович В. Г.* // *Біологія тварин.* – 2007. – **9**, № 1–2. – С. 123–126.
7. *Олексюк Н. П., Куртяк, Б. М., Янович В. Г.* // *Наук. тех. бюл.* – 2008. – Вип. 9, № 3. – С. 79–84.
8. *Trenzado C., Hidalgo M. C., Garcia-Gallego M. et. al.* // *Aquaculture.* – 2006. – **254**. – P. 758–767.
9. *Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. И.* // *Вопр. мед. химии.* – 1990. – № 2. – С. 88–91.
10. *Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г.* // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 16–19.
11. *Моин В. М.* // Там же. – 1986. – № 12. – С. 724–727.
12. *Стальная И. Д.* Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // *Современные методы в биохимии.* / Под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 63–64.
13. *Гаврилов В. Б., Гаврилова А. П., Мажуль Л. М.* // *Вопр. мед. химии.* – 1987. – **33**, № 1. – С. 118–122.
14. *Lowry O. H., Rosebroug N. I., Farr A. L., Randall R. I.* // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
15. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1973. – 320 с.
16. *Утко Н. А.* // *Пробл. стар. и долголетия.* – 2004. – **13**, № 1. – С. 12–28.
17. *Мурашук К., Іккерт О., Гальків М., Гордій С.* // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 3. – С. 38–43.
18. *Дубинина Е. Е.* // *Укр. біохім. журн.* – 1993. – **64**, № 2. – С. 13–15.
19. *Остроумова Н. И.* Биологические основы кормления рыб. – С.-П.: Комплекс, 2001. – 372 с.
20. *Морозов А. А., Чуйко Г. М., Подгорная В. А.* / *Мат. всерос. конф. «Организмы, популяции, экосистемы: проблемы и пути сохранения биоразнообразия».* – Вологда, Россия, 2008. – С. 75–77.

Отримано 11.05.2011