

УДК 639.386:577.15:577.115

ПЕРОКСИДНІ ПРОЦЕСИ І СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У ШКІРІ ПРІСНОВОДНИХ РИБ ЗАЛЕЖНО ВІД СЕЗОНУ

Н. П. Олексюк
samd@inenbiol.com.ua

Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38; м. Львів, 79034, Україна

Досліджували інтенсивність пероксидних процесів і стану антиоксидантної системи у шкірі прісноводних риб різних видів у різні пори року. Для досліджень були відібрані 3 види риб — лускатий короп (*Cyprinus carpio* L.), білий товстолобик (*Hypophthalmichthys molitrix*) та білий амур (*Ctenopharyngodon idella*). Зразки тканини шкіри риб відбирали після декапітації на початку весняного (у березні), літнього (у червні), осіннього (у вересні) і зимового періодів (у грудні). У них визначали вміст продуктів ПОЛ (дієнових кон'югатів, гідропероксидів ліпідів, ТБК-активних продуктів) і активність ензимів антиоксидантної системи (супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази і каталази). Встановлено, що інтенсивність процесів ПОЛ і стан системи антиоксидантного захисту у шкірі риб значною мірою залежить від сезону та виду риб. Вміст продуктів ПОЛ у шкірі прісноводних риб на початку весняного періоду значно більший порівняно з їх вмістом на

початку літнього й осіннього періодів, що свідчить про посилення інтенсивності пероксидних процесів в організмі риб у зимовий і ранній весняний періоди. Супероксиддисмутаза та глутатіонпероксидаза активність у шкірі білого товстолобика і коропа на початку весняного періоду значно нижча, ніж на початку літнього й осіннього періодів. Каталазна активність у шкірі білого амура впродовж річного циклу вирощування практично не змінювалася. Сезонні зміни глутатіонпероксидазної та каталазної активності у шкірі білого товстолобика і коропа протилежні за напрямом.

Ключові слова: ПЕРОКСИДНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ, АНТИОКСИДАНТНІ ЕНЗИМИ, КОРОП, БІЛИЙ ТОВСТОЛОБИК, БІЛИЙ АМУР, ШКІРА, СЕЗОН

LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT SYSTEM IN THE SKIN OF FRESHWATER FISH DEPENDING OF THE SEASON

N. P. Oleksiuk
samd@inenbiol.com.ua

Institute of Animal Biology NAAS, Lviv 79034, st. Stus 38, Ukraine

Lipid peroxidation and antioxidant system in the skin of different species freshwater fish in various seasons were studied. Three types of fish — common carp (*Cyprinus carpio* L.), silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) were selected for studies. Samples of fish skin tissue were collected after decapitation in early spring (March), summer (in June), autumn (September) and winter (December). The content of lipid peroxidation products (diene conjugates, lipid hydroperoxides,

TBARS) and the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase) were determined. It was established that lipid peroxidation and antioxidant system of the fish skin depends on the season and species of fish. The content of lipid peroxidation products in the skin of freshwater fish in the early spring period was significantly higher than their content at the beginning of the summer and autumn periods, which indicates an increase of lipid peroxidation in fish organism in winter and early spring periods.

Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the skin of silver carp and common carp in early spring was significantly lower than at the beginning of the summer and autumn periods. Catalase activity in the grass carp skin during the annual cycle of growing is unchanged. The seasonal changes of glutathione peroxidase and

catalase activity in the skin of silver carp and common carp were opposite direction.

Keywords: LIPID PEROXIDATION, ANTIOXIDANT ENZYMES, COMMON CARP, SILVER CARP, GRASS CARP, SKIN, SEASON

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В КОЖЕ ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СЕЗОНА

Н. П. Олексюк
samd@inenbiol.com.ua

Институт биологии животных НААН, ул. В. Стуса, 38; г. Львов, 79034, Украина

Исследовали интенсивность перекисных процессов и состояние антиоксидантной системы в коже пресноводных рыб разных видов в разные времена года. Для исследований были отобраны 3 вида рыб — чешуйчатый карп (*Cyprinus carpio* L.), белый толстолобик (*Hypophthalmichthys molitrix*) и белый амур (*Ctenopharyngodon idella*). Образцы ткани кожи рыб отбирали после декапитации в начале весеннего (в марте), летнего (в июне), осеннего (в сентябре) и зимнего периодов (в декабре). У них определяли содержание продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов, гидроперекисей липидов, ТБК-активных продуктов) и активность ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы). Установлено, что интенсивность процессов ПОЛ и состояние системы антиоксидантной защиты в коже рыб в значительной степени зависит от сезона и вида рыб. Содержание продуктов ПОЛ в коже пресноводных рыб в начале весеннего периода значительно больше по сравнению с их содержанием в начале летнего и осеннего периодов, что свидетельствует об усилении интенсивности перекисных процессов в организме рыб в зимний и ранний весенний периоды. Активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в коже белого толстолобика и карпа в начале весеннего периода значительно ниже, чем в начале летнего и осеннего периодов. Активность каталазы в коже белого амура на протяжении годового цикла выращивания практически не менялась. Сезонные изменения активности глутатионпероксидазы и каталазы в коже

белого толстолобика и карпа противоположны по направлению.

Ключевые слова: ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ, АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ, КАРП, БЕЛЫЙ ТОЛСТОЛОБИК, БЕЛЫЙ АМУР, КОЖА, СЕЗОН

Швидкість росту риb і їх фізіологічний стан значною мірою залежать від дії сезонних чинників, які суттєво впливають на обмін речовин в їхньому організмі [1, 2]. Впродовж річного циклу вирощування риби витримують значні зміни температури навколишнього середовища і вмісту кисню у воді [1–3]. Це, в свою чергу, впливає на рівень метаболізму в їхньому організмі. Відомо, що інтенсивність перекисних процесів і стан антиоксидантної системи у риb зазнає змін впродовж року [2, 3]. Окрім того, у зимовий період збільшується вміст поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) у фосфоліпідах клітинних мембран, що впливає на інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [4, 5]. У попередніх роботах встановили сезонні зміни стану про- і антиоксидантної систем у печінці та зябрах ставових риb [6, 7]. Встановлено, що активність антиоксидантної системи збільшується у тих органах, де відбуваються процеси підтримки осмотичної рівноваги — у зябрах і шкірі [8].

Шкіра риб виконує ряд важливих функцій. Вона бере участь у підтримці осмотичної рівноваги організму риб, забезпечує його захист від впливів зовнішнього середовища. Через шкіру відбувається, з одного боку, часткове виділення кінцевих продуктів обміну речовин, а з іншого — поглинання деяких речовин із зовнішнього середовища. У ній розташовуються термо-, баро-, хемо- та інші рецептори [9].

Хоча шкіра риб є важливо необхідним органом, дослідження ліпідного обміну у ній обмежені. У шкірі деяких видів риб виявлено 12-гідроксиейкозатриєнову кислоту, яка є моногідроксипродуктом з арахідонової кислоти, що вказує на наявність 12-ліпоксигенази [10]. Цей фермент є найбільшим джерелом ініціації пероксидних процесів у тканинах риб. Ліпоксигенази каталізують реакції взаємодії кисню з ПНЖК, а утворені в результаті цього продукти є високореактивними гідропероксидами.

Ставових риб вирощують у мілких рибоводних ставках, у яких часто спостерігається дефіцит кисню. У такому випадку у них велике значення набуває шкірне дихання. Його частка відносно до загального дихання складає від 17 до 32 %. При низькій температурі відносний об'єм шкірного дихання стає більш високим [11]. Тому риби з інтенсивним шкірним диханням, до яких належать коропові риби, стійкі до змін вмісту кисню у воді.

У зв'язку з цим, метою роботи було дослідження впливу сезону на інтенсивність пероксидних процесів і активність ферментної і неферментної ланок антиоксидантної системи у шкірі трьох видів прісноводних риб — коропа (*Cyprinus carpio* L.), білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*) та білого амура (*Stenopharyngodon idella*), які відрізняються між собою типом живлення та метаболізмом ненасичених жирних кислот. Зазначені питання в літературі не висвітлені.

Матеріали і методи

Досліджували зразки шкіри трьох видів прісноводних риб дворічного віку масою 450–500 г: лускатого коропа (*Cyprinus carpio* L.), білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*) та білого амура (*Stenopharyngodon idella*), які вирощувалися у дослідних ставках Львівського відділення Інституту рибного господарства у смт. Великий Любінь Городоцького р-ну Львівської обл. у різні пори року: на початку весняного (у березні), літнього (у червні), осіннього (у вересні) та зимового (у грудні) періодів (n=4). Рибу виловлювали зі ставів траловим методом. Гідрохімічні показники води та кисневий режим у ставі були в межах норми.

Зразки тканини шкіри після декапітації риб заморожували та зберігали у рідкому азоті до початку досліджень. Із заморожених зразків готували гомогенат, шляхом додавання розтертої у дрібний порошок тканини до фізрозчину у співвідношенні 1:10. Гомогенати центрифугували 15 хв при 3000 об/хв і одержували супернатант, який використовували у подальших дослідженнях. У ньому визначали вміст продуктів ПОЛ: дієнових кон'югатів, гідропероксидів ліпідів, ТБК-активних продуктів, активність антиоксидантних ензимів — супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази та каталази [12]. Вміст протеїну визначали методом Лоурі [13].

У дослідженнях використовували NADH, феназинметасульфат, відновлений глутатіон та 5,5-дитіобіс-2-нітробензойну кислоту (Acros Organics, Бельгія), нітротетразолій синій (ДиаМ, Росія), гідропероксид третинного бутилу (Fluka, Німеччина). Всі інші реактиви були вітчизняного виробництва кваліфікації ч. д. а.

Отримані цифрові дані обробляли статистично за допомогою програми Microsoft EXCEL. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми

величинами використовували критерій Стьюдента.

Результати й обговорення

Проведені дослідження показали, що інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів у шкірі прісноводних риб суттєво змінюється впродовж року, що свідчить про її залежність від сезонних чинників. Так, з наведених на рисунках 1 а–1 в даних видно, що на початку весняного періоду інтенсивність процесів ПОЛ у шкірі прісноводних риб значно вища, ніж на початку літнього і, особливо, на початку осіннього. Про це свідчить високий вміст усіх продуктів ПОЛ у шкірі риб у березні. Аналогічні зміни було виявлено у печінці та зябрах прісноводних риб [4, 5]. Отримані результати вказують на посилення пероксидних процесів у шкірі риб у ранній

весняний період. Відомо, що в організмі риб в умовах низьких температур у зимовий період збільшується кількість поліненасичених жирних кислот, які є основним субстратом для процесів ПОЛ [3]. Крім того, у зимовий період посилення пероксидних процесів у печінці риб ініціює гіпоксія [14], а також, мабуть, впливає зменшення продукції гормону мелатоніну в гіпофізі. Відомо, що мелатонін уловлює вільні радикали (супероксидний аніон, гідропероксид водню, синглетний кисень, оксид азоту та інші) і бере участь у регуляції активності антиоксидантних ензимів та регуляції сезонних і циркадних ритмів в організмі тварин [15, 16]. Це може призвести до підвищення інтенсивності пероксидних процесів. Найменший вміст продуктів ПОЛ у шкірі прісноводних риб виявлено на початку осіннього періоду, у вересні.

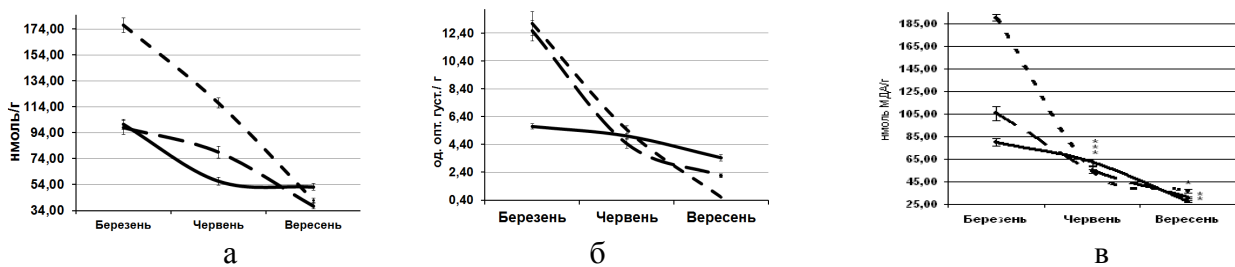


Рис. 1. Вміст дієнових кон'югатів (а), гідропероксидів ліпідів (б) і ТБК-активних продуктів (в) у шкірі прісноводних риб

Примітка: тут і в наступних рисунках різниці статистично вірогідні 1) * — $p < 0,05$ відносно березня; 2) позначено --- — білий товстолобик, — — — білий амур, — — — короп

Вміст усіх продуктів ПОЛ у шкірі білого товстолобика на початку весняного періоду значно більший, ніж у коропа і білого амура ($p < 0,001$). На початку осіннього періоду вміст дієнових кон'югатів і гідропероксидів ліпідів у шкірі коропа значно більший ($p < 0,01–0,05$), а вміст ТБК-активних продуктів — менший ($p < 0,01–0,05$), ніж у шкірі рослиноїдних риб. Подібні видові різниці у вмісті продуктів ПОЛ виявлено у печінці прісноводних риб [4]. Високий вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів зумовлений особливостями живлення цих видів риб. Відомо, що білий товстолобик і

білий амур споживають, відповідно, фітопланктон і вищу водну рослинність. Ліпіди цих природних кормів містять більшу кількість ПНЖК, ніж штучні корми, які згодують коропа [17]. Наявні в літературі дані свідчать про пряму залежність між вмістом цих ПНЖК у ліпідах корму і тканинах риби [17].

Активність ензимів антиоксидантної системи також зазнає суттєвих змін впродовж року, що свідчить про її залежність від сезонних чинників. Зокрема, супероксиддисмутаза і глутатіонпероксидазна активність у шкірі прісноводних риб на початку весняного

періоду найнижча, що може бути причиною високого вмісту продуктів ПОЛ (рис. 2 а, б). На початку літнього й осіннього періодів їх активність була найвища, що призводило до зменшення вмісту продуктів ПОЛ у шкірі риби. Виняток становила лише глутатіонпероксидазна активність у шкірі білого товстолобика, яка на початку весняного й літнього періодів суттєво не змінювалася. При цьому

виявлено видові відмінності і супероксиддисмутази та глутатіонпероксидазної активності у шкірі риби. Так, на початку весняного періоду активність цих ензимів у шкірі коропа значно нижча ($p < 0,01-0,001$), а на початку літнього й осіннього періодів глутатіонпероксидазна активність вища ($p < 0,01-0,001$), ніж у шкірі рослиноїдних риби.

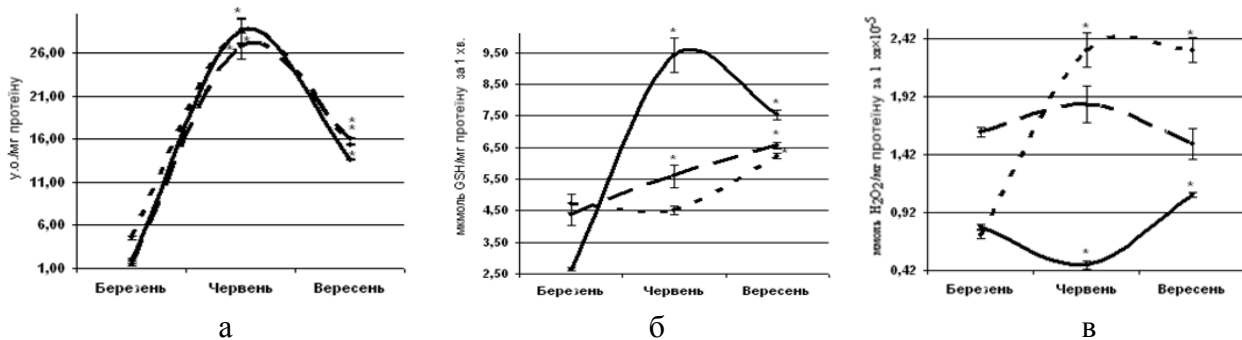


Рис. 2. Активність СОД (а), ГПО (б) і КАТ (в) у шкірі ставових риби у різні пори року ($M \pm m$, $n=4$)

Виявлено також видові особливості сезонних змін каталазної активності у шкірі прісноводних риби. Так, у шкірі білого товстолобика її активність на початку літнього й осіннього періодів найвища, а на початку весняного періоду — найнижча, тоді як у шкірі коропа вона найнижча на початку літнього періоду і найвища на початку осіннього періоду (рис. 2 в). Каталазна активність у шкірі білого амура впродовж річного циклу вирощування практично не змінювалася. Різниці активності ензимів антиоксидантної системи у шкірі прісноводних риби можуть бути зумовлені видовими особливостями перебігу метаболічних процесів, зокрема ліпідного обміну.

Отримані дані дають підставу вважати, що процеси пероксидного окиснення ліпідів і стан ензимної ланки антиоксидантної системи в шкірі прісноводних риби характеризуються видовими особливостями, залежать від типу живлення та дії сезонних чинників.

Висновки

У ранній весняний період інтенсивність процесів ПОЛ у шкірі прісноводних риби вища, ніж у літній і осінній періоди, про що свідчить високий вміст продуктів ПОЛ у шкірі риби у березні. На початку весняного періоду вміст продуктів ПОЛ у шкірі білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*) більший, ніж у шкірі коропа (*Cyprinus carpio* L.) і білого амура (*Ctenopharyngodon idella*). Супероксиддисмутаза і глутатіонпероксидазна активність у шкірі прісноводних риби на початку весняного періоду нижча, ніж на початку літнього й осіннього періодів. Сезонні зміни глутатіонпероксидазної та каталазної активності у шкірі білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*) і коропа (*Cyprinus carpio* L.) протилежні за напрямом.

Перспективи подальших досліджень. Метою наступних досліджень буде вивчення сезонних змін гормонального статусу прісноводних риби.

1. Grubinko V. V. Perekysnoe okyslenye lypidov y antyoksydantnaya zashchyta u ryb [Lipid peroxidation and antioxidant defence

system in fish]. *Gidrobiologicheskii zhurnal — Hydrobiological Journal*, 2001, vol. 37, no. 1, pp. 64–78 (in Russian).

2. Martinez-Alvarez R. M., Morales A. E., Sanz A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 2005, vol. 15, no. 1, pp. 75–88.

3. Ronisz D. D., Larsson G. J., Förlin L. Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 1999, vol. 124, pp. 271–279.

4. Radi A. A. R., Csengeri I., Matkovic B. Phospholipid fatty acid composition and lipid peroxidation in some tissues of carp acclimated to different environmental temperatures. *Aquacult. Hungar.*, 1990, vol. 6, pp. 161–170.

5. Olsen R. E., Løvaas E., Lie Ø. The influence of temperature, dietary polyunsaturated fatty acids, α -tocopherol and spermine on fatty acid composition and indices of oxidative stress and fatty acid composition in Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.). *Fish Physiol. Biochem.*, 1999, vol. 20, no. 1, pp. 13–29.

6. Oleksiuk N. P. Aktyvnist pro- i antyoksydantnykh system u pechintsi prisnovodnykh ryb u rizni pory roku [The activity of pro- and antioxidant system in liver of freshwater fish in different seasons]. *Ukrainskyy biokhimichnyi zhurnal — Ukrainian biochemical journal*, 2010, no. 3, pp. 41–48 (in Ukrainian).

7. Oleksiuk N. P. Sezonnii zminy peroksydnykh protsesiv i aktyvnosti antyoksydantnoi systemy u ziabrahk prisnovodnykh ryb [The seasonal changes of lipid peroxidation and the activity of antioxidant system in gills of freshwater fish]. *Biologiya tvaryn — The animal biology*, 2011, vol. 13, no 1–2, pp. 140–147 (in Ukrainian).

8. Magomedov S. K. O roli antiokisliteley pri perestroyke osmoregulyatornykh mekhanizmov u ryb [The role of antioxidants in the restructuring of osmoregulatory mechanisms in fish]. *Bioantiokisliteli — Bioantioxidants*, Moscow, Nauka, 1975, pp. 79–81 (in Russian).

9. Ivanov A. A. *Fiziologiya ryb* [Fish physiology]. Moscow, Mir Publ., 2003. 284 p. (In Russian).

10. German I. B., Kinsella J. E. Lipid oxidation in fish tissues. Enzymatic initiation via lipoxigenase. *J. of Agric. Food Chem.*, 1985, vol. 33, pp. 680–683.

11. Puchkov N. V. *Fiziologiya ryb* [Fish physiology]. Moscow, Pishchepromizdat, 1954, 372 p. (In Russian).

12. Vlizlo V. V. *Laboratorni metody doslidzhen u biologiyi, tvarynnystv ta veterynarniy medytsyni* [Laboratory research methods in biology, animal husbandry and veterinary medicine]. Lviv, SPOLOM, 2012. pp. 355–365 (in Ukrainian).

13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.

14. Lushchak V. I., Bagnyukova T. V., Lushchak O. V., Storey J. M., Storey K. B. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2005, vol. 37, no. 6, pp. 1319–1330.

15. Reiter R. J., Tan D. X., Acuna-Castroviejo D., Burkhardt S., Karbownik M. Melatonin: mechanisms and actions as an antioxidant. *Curr. Top. Biophys.*, 2000, vol. 24, pp. 171–183.

16. Hardeland R., Pandi-Perumal S. R. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr. Metab.*, 2005, vol. 2, no. 22, pp. 1–15.

17. Frishtak O. M. *Zhyrnokyslotnyi sklad lipidiv pryrodnykh kormiv rybovodnykh staviv ta tkanyn stavovykh ryb. Dysertatsiya candidate sil'skohospodarskykh nauk* [The fatty acid composition lipids of natural nutrition ponds and tissue of pond's fish. Cand. agricultural sci. diss.]. Lviv, 2008. 155 p. (In Ukrainian).