

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ АКТИВНОСТІ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ І ВМІСТУ ПРОДУКТІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ТКАНИНАХ КОРОПІВ АНТОНІНСЬКО-ЗОЗУЛЕНЕЦЬКОГО ТИПУ

Т. А. Нагорнюк, І. І. Грициняк, С. І. Тарасюк

Інститут рибного господарства НААН

Досліджено вплив віку на активність ферментів системи антиоксидантного захисту та вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у тканинах лускатої і рамчастої порід коропів антонінсько-зозуленецького типу. Виявлено вищу активність каталази і супероксиддисмутази у коропів дворічного віку. Спостерігався вищий рівень концентрації продуктів перекисного окиснення ліпідів у коропів трирічного віку через низьку ферментативну антиоксидантну активність. У тканинах дворічок коропів лускатої і рамчастої порід встановлено вищий антиоксидантний статус на відміну від старших вікових груп.

Антиоксидантна система захисту (АОЗ) організму контролює і оптимізує всі етапи вільнорадикальних реакцій, починаючи від їх ініціації і закінчуючи утворенням гідроперекисів та малонового діальдегіду. В нормі вільнорадикальний процес окиснення підтримується на відносно низькому і оптимальному для організму рівні, що забезпечується як сполуками неферментної ланки антиоксидантної системи — каротиноїдами, токоферолом, трансферином, так і антиоксидантними ферментами, основними з яких є супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза [1].

Активність антиоксидантних ферментів у тканинах залежить від багатьох причин: зовнішніх впливів, стану організму, генетичних факторів, годівлі, сезонності, віку, статі. У літературі висвітлюються питання досліджень вікових особливостей антиоксидантної ферментної системи та вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканинах різних видів риб [2–4]. Але ферментативну активність системи АОЗ в організмі прісноводних риб, зокрема коропів різновікових груп, досліджено фрагментарно.

Вивчення особливостей перебігу процесів пероксидації у тканинах риб у віковому аспекті є важливим для оцінки адаптаційних можливостей організму коропів. Особливо це важливо для популяцій риб, котрі проходять етап становлення генетичної структури та закріплення спадкових селекційних ознак, які сформувалися в процесі створення породи. Зважаючи на взаємозв'язок процесів ПОЛ як з антиоксидантною активністю ферментів, так і з функціонуванням більшості систем організму, важливим є дослідження вікової динаміки цих процесів. Типовими представниками українських порід є антонінсько-зозуленецькі коропи, на основі племінного матеріалу яких були створені нові породні типи українських коропів, тому доцільно було вивчити та охарактеризувати стан системи антиоксидантного захисту у різновікових груп лускатої і рамчастої порід коропів антонінсько-зозуленецького типу.

Матеріали і методи. Дослідний матеріал був відібраний у весняний період з ставів ВАТ «Хмельницькрибгосп» у дворічок (n=5) і трирічок (n=5) українських лускатої і рамчастої порід коропів антонінсько-зозуленецького типу. У дослідженнях використані зразки тканин печінки, міокарду, крові, скелетних м'язів та зябер. Після видалення тканини поміщали в охолоджений розчин Рінгера, який містив (мМ): NaCl — 103, KCl — 1,01, CaCl₂ — 0,91, NaHCO₃ — 1,2. Для приготування гомогенату 100 мг тканини гомогенізували у

0,9 мл 0,05 М трис-НСІ-буфері (рН 7,8). Кров брали у живих особин коропів з хвостової вени. В якості антикоагулянта використовували гепарин у розрахунку 25 МО на 1 мл крові. У тканинах визначали активність ферментів — супероксиддисмутази (СОД, К.Ф. 1.15.1.1), каталази (КАТ, К.Ф. 1.11.1.6), глутатіонзалежної системи знешкодження пероксидних продуктів — глутатіонпероксидази (ГП, К.Ф. 1.11.1.9) за використання раніше описаних методик [5, 6, 7].

Інтенсивність вільнорадикальних процесів оцінювали за накопиченням дієнових кон'югатів [8] та ТБК-активних продуктів за взаємодії малонового діальдегіду та тіобарбітурової кислоти у тканинах коропів [9]. Вміст протеїну в досліджених зразках тканин визначали за Lowry [10].

Отримані дані опрацьовували загальноприйнятими методами статистики з використанням t-критерію Стьюдента [11] та розрахунків у програмі *Microsoft Excel*.

Результати та обговорення. Проведено дослідження вікових змін активності антиоксидантних ферментів — супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази та вмісту продуктів ПОЛ — концентрації ДК і ТБК-активних продуктів у скелетних м'язах, печінці, крові, міокарді та зябрах лускатої і рамчастої порід коропів антонінсько-зозуленецького типу.

У підтримці фізіологічного рівня перекисного окиснення ліпідів та інших біохімічних процесів у клітині провідну роль відіграють ферменти антиоксидантного захисту. Аналіз одержаних результатів свідчить, що рівень активності СОД у тканинах лускатих коропів поступово знижувався з віком. Зокрема, ці показники були вірогідно нижчими у крові трирічок в 2,3 раза ($P < 0,01$) та у зябрах в 1,7 раза ($P < 0,05$). Лише у міокарді виявлено у 4 рази більшу активність ферменту в коропів трирічного віку ($P < 0,001$) (табл. 1).

Таблиця 1

Вікові відмінності антиоксидантної активності ферментів і вмісту продуктів ПОЛ у лускатих коропів антонінсько-зозуленецького типу ($M \pm m$, $n=5$)

Тканини	СОД, од. акт. хв ⁻¹ мг ⁻¹ білка	КАТ, нмоль Н ₂ О ₂ хв ⁻¹ мг ⁻¹ білка	ГП, мкмольGSH хв ⁻¹ мг ⁻¹ білка	ТБК-активні продукти, мкмоль/мг білка	ДК, мкмоль/г тканини
<i>Лускаті коропи дворічного віку</i>					
Печінка	3996±150,9	14,9±0,72*	35,7±11,7*	42,0±3,35***	0,63±0,08**
Міокард	2300±319,6***	11,2±0,36***	39,6±5,6**	36,4±1,5	0,84±0,2
Кров	2278±220,9**	9,4±1,05	90,1±6,1*	27,2±3,5**	0,54±0,11***
Скелетні м'язи	2792±236,0	4,9±0,76*	77,9±11,3**	59,9±5,8	1,14±0,14**
Зябра	6591±173,0*	21,6±2,6***	86,0±11,7	83,7±7,0***	0,38±0,07
<i>Лускаті коропи трирічного віку</i>					
Печінка	3210,7±1363,9	10,6±1,2	69,2±13,3	94,7±7,1	0,31±0,02
Міокард	9287,2±1048,7	4,75±0,24	8,9±3,3	46,4±4,6	0,64±0,1
Кров	997,5±512,8	6,9±0,95	34,3±12,8	57,2±7,1	1,72±0,14
Скелетні м'язи	3384,7±1617,6	2±0,38	235,6±69,7	62,4±11,1	0,48±0,07
Зябра	3786,1±619,6	3,82±0,11	49,7±11,6	38,3±1,2	0,43±0,06

Примітка: вірогідні різниці в досліджуваних показниках лускатих коропів дворічного віку в порівнянні до лускатих коропів трирічного віку; * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$

Встановлено, що з віком каталазна активність майже у всіх досліджених тканинах лускатих коропів також знижується. У тканинах дворічних лускатих коропів активність каталази була значно вищою у печінці в 1,4 раза і скелетних м'язах у 2,4 раза ($P < 0,05$), а також у міокарді у 2,4 раза і зябрах у 5,6 раза ($P < 0,001$), порівняно з активністю ферменту у тканинах лускатих коропів трирічного віку (табл. 1). Зростання активності СОД і каталази в

тканинах дворічок відбувається завдяки інтенсивному росту організму риб у цей період, що підтверджується літературними даними та у інших видів сільськогосподарських тварин [12].

Активність глутатіонпероксидази у лускатих коропів трирічного віку була більшою у печінці в 1,9 раза ($P<0,05$) і скелетних м'язах у 3 рази ($P<0,01$). У дворічок лускатих коропів, порівняно з трирічками, вірогідно вища активність ГП була у міокарді в 4,4 раза та у крові в 2,6 раза ($P<0,01-0,05$).

Процеси ПОЛ контролюються ферментативними і неферментативними антиоксидантами, тому інтенсивність їх незначна. Вміст ТБК-активних продуктів у лускатих коропів дворічного віку майже у всіх тканинах був значно нижчим, завдяки високій антиоксидантній активності ферментів в цих тканинах. Так, порівняно з лускатими трирічками, вміст ТБК-активних продуктів у дворічок був вірогідно нижчим у печінці у 2,3 раза ($P<0,001$) і крові у 2,1 раза ($P<0,01$), у міокарді і скелетних м'язах ці різниці були не вірогідні. Ці результати свідчать, що інтенсивність ПОЛ, особливо його остання стадія, яка веде до утворення малонового діальдегіду, у печінці і крові дворічок лускатого коропа значно нижча, ніж у цих тканинах риб трирічного віку. Лише у зябрах дворічок вміст ТБК-активних продуктів був у 2,2 раза вищим, ніж у трирічок ($P<0,001$).

У лускатих коропів виявлено найменший вміст дієнових кон'югатів у дворічок в зябрах ($0,38\pm 0,07$ мкмоль/г тканини) та у печінці трирічок ($0,31\pm 0,02$ мкмоль/г тканини), найбільший вміст ДК спостерігався у скелетних м'язах коропів дворічного віку ($1,14\pm 0,14$ мкмоль/г тканини) та у крові коропів трирічного віку ($1,72\pm 0,14$ мкмоль/г тканини) (табл. 1). Вміст дієнових кон'югатів у дворічок антонінсько-зозуленецького лускатого коропа був значно вищим у печінці і скелетних м'язах ($P<0,01$) та нижчим у крові ($P<0,001$), порівняно з вмістом цих продуктів у тканинах трирічок.

У дворічок рамчастих коропів активність СОД у зябрах була вищою у 3,1 раза ($P<0,01$) і нижчою у крові у 4,8 раза ($P<0,001$) та у печінці в 2,6 раза ($P<0,01$), порівняно з ферментативною активністю у тканинах трирічок (табл. 2).

Таблиця 2

Вікові відмінності антиоксидантної активності ферментів і вмісту продуктів ПОЛ у рамчастих коропів антонінсько-зозуленецького типу ($M\pm m$, $n=5$)

Тканини	СОД, од. акт. хв ⁻¹ мг ⁻¹ білка	КАТ, нмоль H ₂ O ₂ хв ⁻¹ мг ⁻¹ білка	ГП, мкмольGSH хв ⁻¹ мг ⁻¹ білка	ТБК-активні продукти, мкмоль/мг білка	ДК, мкмоль/г тканини
<i>Рамчасті коропи дворічного віку</i>					
Печінка	1453±116,5**	11,3±1,1	37,0±1,2**	8,8±0,53***	0,26±0,03***
Міокард	2442±286,0	10,7±0,38*	69,8±9,8*	37,4±2,7***	0,31±0,028*
Кров	1240±241,0***	7,1±0,8*	53,4±13,0	98,3±8,5	0,13±0,01***
Скелетні м'язи	5612±381,8	41,7±7,2***	369±23,0***	168,0±15,8**	6,5±1,5**
Зябра	2750±123,0**	19,5±3,0*	51,9±9,4**	13,6±1,2**	0,65±0,11
<i>Рамчасті коропи трирічного віку</i>					
Печінка	3752,4±1053,3	9,87±0,73	100,3±33,8	87,3±8,7	1,05±0,1
Міокард	3177,4±965,7	17,7±1,95	129,5±65,5	144,3±9,2	0,65±0,12
Кров	5989,4±799,0	3,99±0,91	68,6±28,2	72,7±3,2	1,7±0,24
Скелетні м'язи	4563,9±1563,2	3,69±0,76	52,2±1,6	89,9±4,4	0,22±0,01
Зябра	873,9±367,7	9,67±1,36	144,9±62,8	63,6±11,6	0,39±0,02

Примітка: вірогідні різниці в досліджуваних показниках рамчастих коропів дворічного віку в порівнянні до рамчастих коропів трирічного віку; * — $P<0,05$; ** — $P<0,01$; *** — $P<0,001$

Активність каталази у тканинах рамчастих коропів вірогідно вищою була в крові у 1,8 раза, у зябрах у 2 рази ($P<0,05$) і скелетних м'язах у 11,3 раза ($P<0,001$) дворічок. У той

же час у коропів трирічного віку каталазна активність переважала у міокарді в 1,6 раза ($P < 0,05$).

Активність ГП у дворічок рамчастих коропів виявилась вищою у 7,1 раза у скелетних м'язах ($P < 0,001$) та нижчою у печінці, зябрах у 2,7 раза ($P < 0,01$) і міокарді у 1,9 раза ($P < 0,05$), ніж у трирічок.

Показником ступеня посилення пероксидного окиснення може бути не лише збільшення концентрації продуктів пероксидації, але і швидкість витрачання антиоксидантних ресурсів, що підтримують процеси ПОЛ у фізіологічних нормах. У рамчастих коропів трирічного віку вміст ТБК-активних продуктів значно вищим виявився у печінці, міокарді та зябрах ($P < 0,01-0,001$). Вірогідно більша концентрація дієнових кон'югатів у трирічок рамчастих коропів була присутня у печінці, міокарді та крові ($P < 0,05-0,001$), що може бути наслідком вищої антиоксидантної активності ферментів у тканинах коропів дворічного віку. Лише у скелетних м'язах вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів зростав у дворічок, порівняно з рамчастими коропами трирічного віку ($P < 0,01$). За літературними даними відомо, що вміст продуктів ПОЛ також може зростати в період активного росту та фізіологічних змін з віком в організмі [12].

Узагальнюючи дані за ферментативною активністю системи АОЗ та процесами ПОЛ, обраховували фактор антиоксидантного стану дво- та трирічок коропів, який вказує на загальний антиоксидантний статус досліджених груп риб (рис. 1).

За значенням ФАС у лускатої породи коропа різного віку не виявлено відмінностей у скелетних м'язах і зябрах. Тоді, як в інших тканинах лускатих коропів спостерігались вірогідні відмінності у групах 2- і 3-річного віку, що чітко прослідковується на діаграмі (рис. 1). Так, у печінці і крові лускатих дворічок антиоксидантний статус був вищий і становив 97,6 ($P < 0,01$) і 89,8 ($P < 0,05$) відповідно у цих тканинах, порівняно з групою лускатих коропів трирічного віку. У міокарді, навпаки, вищий антиоксидантний статус виявлено у лускатих коропів трирічного віку (201,8 ум. од., $P < 0,001$), порівняно з групою риб меншого віку (63,7 ум. од.).

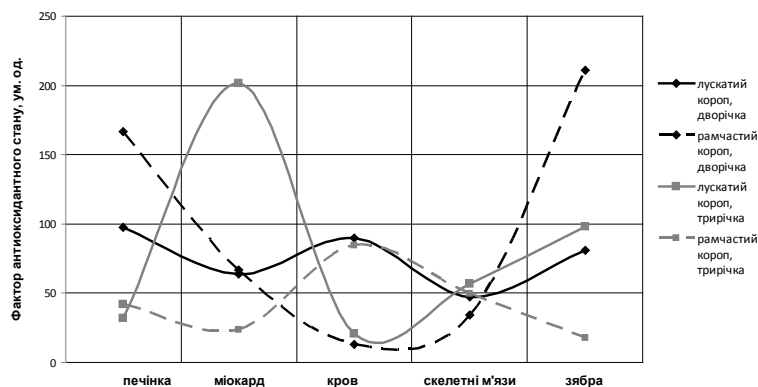


Рис. 1. Фактор антиоксидантного стану у лускатих і рамчастих коропів різного віку

При порівнянні ФАС у тканинах рамчастих коропів лише у скелетних м'язах не спостерігається відмінностей у різновікових груп. У печінці, міокарді та зябрах рамчастих коропів дворічного віку антиоксидантний статус переважав відповідно у 3,9 ($P < 0,001$), 2,8 ($P < 0,05$) та 12,1 ($P < 0,001$) раза, що помітно відрізняє дану вікову групу від риб трирічного віку. У рамчастих особин старшої вікової групи лише у крові значення антиоксидантного стану було вищим у 6,4 раза ($P < 0,01$), порівняно з групою дворічних коропів.

Таким чином, у особин дворічного віку лускатої і рамчастої порід коропів, порівняно з трирічними коропами, рівень ФАС був вірогідно вищим у більшості досліджуваних тканин,

що підтверджується літературними даними і у різновікових груп сазана (*Cyprinus carpio haematopterus*), який є диким предком культурного коропа (*Cyprinus carpio*) [13].

ВИСНОВКИ

1. З віком у лускатих коропів відбувається зниження активності як каталази, так і супероксиддисмутази, тоді як у тканинах організму рамчастих коропів знижується лише каталазна активність. За активністю глутатіонпероксидази відмінностей у різновікових груп коропів не спостерігалось.

2. Як наслідок низької активності ферментів системи АОЗ у лускатих і рамчастих коропів трирічного віку виявлено високий вміст продуктів ПОЛ.

3. На відміну від особин трирічного віку, вищий антиоксидантний статус встановлено у більшості тканин дворічок лускатої і рамчастої порід коропів.

Перспективи подальших досліджень. Слід продовжити дослідження впливу вікових змін та їх динаміки на фізіолого-біохімічні процеси у лускатих і рамчастих коропів даного типу.

AGE PECULIARITIES OF THE ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY AND LIPID PEROXIDE OXIDATION PRODUCTS CONTENT IN THE TISSUES OF CARP OF THE ANTONINSKO-ZOZULENETS TYPE

T. Nagornyuk, I. Hrytsynyak, S. Tarasjuk

S U M M A R Y

There has been studied age effect on the antioxidant protection system enzymes activity and lipid peroxide oxidation products content in tissues of scaled and framed carps of the Antoninsko-Zozulenets type. Higher catalase and superoxidmutase activities in the age-2 carps have been found. High level of the lipid peroxide oxidation products concentration in the age-3 carps has been observed in connection with low enzymatic antioxidant activity. In tissues of the age-2 scaled and framed carps, higher antioxidant status has been established in comparison with older age groups.

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И СОДЕРЖАНИЯ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ КАРПОВ АНТОНИНСКО-ЗОЗУЛЕНЕЦКОГО ТИПА

T. A. Нагорнюк, С. И. Тарасюк

А Н Н О Т А Ц И Я

Исследовано влияние возраста на активность ферментов системы антиоксидантной защиты и содержание продуктов перекисного окисления липидов в тканях чешуйчатой и рамчатой пород карпов антонинско-зозуленецкого типа. Выявлена более высокая активность каталазы и супероксиддисмутазы у двухгодовиков карпа. Наблюдался высокий уровень концентрации продуктов перекисного окисления липидов у трехгодовиков карпа в связи с низкой ферментативной антиоксидантной активностью. В тканях двухгодовиков карпов чешуйчатой и рамчатой пород установлен более высокий антиоксидантный статус по сравнению со старшими возрастными группами.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Беленічев І. Ф.* Антиоксидантна система захисту організму / І. Ф. Беленічев, Е. Л. Левицький, Ю. І. Губський та ін. // *Современные проблемы токсикологии.* — 2002. — № 3. — С. 245–31.
2. *Скуратовська К. М.* Стан антиоксидантної ферментної системи чорноморських риб в умовах комплексного хронічного забруднення : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.04. «Біохімія» / К. М. Скуратовська. — Одеса, 2009.
3. *Otto D. M. E.* Fish Fisiol. Biochem. / D. M. E. Otto, T. W. Moon. — 1996. — V. 15. — P. 349–388.
4. *Arteni O. M.* Researches on the activity of oxidoreductases from tissues harvested in different stages of development at *Cyprinus carpio* / O. M. Arteni, Z. Olteanu, L. Oprică, M. Bălan // *Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară.* — 2010. — Т. 11. — P. 83–86.
5. *Костюк В. А.* Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. И. Ковалева // *Вопр. мед. химии.* — 1990. — № 2. — С. 88–91.
6. *Королюк М. А.* Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова и др. // *Лаб. дело.* — 1988. — № 1. — С. 16–18.
7. *Моин В. М.* Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В. М. Моин // *Лаб. дело.* — 1986. — № 12. — С. 724–727.
8. *Стальная И. Д.* Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И. Д. Стальная ; Под ред. В. Н. Ореховича. // *Современные методы в биохимии.* — М. : Медицина, 1977. — С. 63–64.
9. *Гаврилов В. Б.* Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой / В. Б. Гаврилов, Л. М. Мажуль // *Вопр. мед. химии.* — 1987. — Т. 33, № 1. — С. 118–122.
10. *Lowry O. H.* Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. I. Rosebroug, A. L. Farr, R. I. Randall // *Journal of Biological Chemistry.* — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265–275.
11. *Плохинский Н. А.* Биометрия / Н. А. Плохинский. — Изд-во Московского университета, 1981. — 367 с.
12. *Сімонов М. Р.* Зміни активності антиоксидантної системи у курчат кросу isa brown залежно від віку / М. Р. Сімонов, М. М. Кулик // *Біологія тварин.* — 2007. — Т. 9, № 1–2. — С. 131–136.
13. *Крась С. І.* Вікові особливості стану системи антиоксидантного захисту у амурського сазана: матеріали VIII наукової конференції молодих вчених та аспірантів, 13 травня 2010 р. : тези доповідей / С. І. Крась. — К. : Аграрна наука, 2010. — С. 37–38.

Рецензент: головний науковий співробітник лабораторії живлення та біосинтезу продукції жуйних, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Вудмаска І. В., ІБТНААН