

О. Л. Гостюхина, И. В. Головина

Особенности системы антиоксидантной защиты тканей черноморской камбалы калкан при кратковременном голодании

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Г. Е. Шульманом)

Визначено активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9), глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2), каталази (КФ 1.11.1.6), а також вміст відновленого глутатіону і ТБК-реагуючих продуктів у печінці, гонадах, жабрах, червоних і білих м'язах статевозрілих особин чорноморської камбали калкан, які голодували від 3 до 8 діб. За умов короткочасного голодування встановлено флуктуації параметрів антиоксидантного комплексу та пероксидного окиснення ліпідів. Значних змін прооксидантно-антиоксидантного балансу не виявлено, компенсаторні реакції свідчать про досить високу буферну ємність антиоксидантної системи досліджених тканин камбали.

Голодание — распространенное физиологическое состояние рыб на протяжении годового и жизненного цикла [1]. Некоторые физиолого-биохимические особенности голодания в естественных и экспериментальных условиях исследованы на примере ряда видов рыб [2–6]. В основе формирования универсальных адаптационных реакций, связанных с перестройкой метаболизма у животных, и реализации любого стрессового воздействия лежат процессы пероксидного окисления липидов (ПОЛ). Однако при чрезмерной активации ПОЛ из звена адаптации может становиться звеном патогенеза и приводить к повреждению клеточных и тканевых структур [7]. Важнейшей системой защиты клетки от окислительной деструкции является антиоксидантный комплекс, его параметры обсуждаются как биомаркеры прооксидантного состояния в тканях рыб при голодании и ограничении рациона [8–12].

В данной работе приведены результаты изучения процессов, происходящих в антиоксидантной системе и ПОЛ, у черноморской камбалы калкан при кратковременном голодании.

Материалы и методы. Взрослые особи камбалы *Psetta (Scophthalmus) maxima maeotica* (L., 1758) были выловлены в прибрежных водах Севастополя весной 2006 г. После отлова рыб не кормили и выдерживали в аквариумах объемом 4 м³ с проточной морской водой (температура воды 16–18 °С, соленость 18‰). По срокам акклимации в аквариуме камбал разделили на три группы, равномерно представленные особями обоего пола: контрольная, 3–4 сут и 8 сут содержания.

Ткани печени, гонад, жабр, красных и белых мышц препарировали, гомогенизировали и центрифугировали при 0–4 °С. Активность ферментов определяли в супернатанте, содержание ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) и восстановленного глутатиона (GSH) — в гомогенате как описано ранее [13]. Активность ферментов измеряли при стандартной температуре 25 °С. Определяли активность каталазы (КФ 1.11.1.6) — по реакции с молибдатом аммония, глутатинпероксидазы (ГП, КФ 1.11.1.9) — по накоплению окисленного глутатиона (GSSG) и глутатинредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) — по убыли НАДФН, а также содержание восстановленного глутатиона — по реакции с аллоксановым реактивом, ТБК-активных

продуктов — по образованию триметинового комплекса. Активность ферментов выражали в мкмольх субстрата или продукта в 1 мин на 1 мг белка, уровень GSH — в мкг на 1 г ткани, а ТБК-АП — в мкмольх МДА на 1 г ткани. Содержание белка оценивали методом Лоури.

Полученные результаты представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка средней. Статистическую обработку выполняли в программе Excel 2007 с использованием *t*-критерия Стьюдента. Объем выборочных совокупностей составлял 4–9 особей.

Результаты и их обсуждение. В печени камбалы при кратковременном голодании по сравнению с контрольными рыбами выявлено значительное снижение уровня GSH, начиная с 3–4 сут (в 1,9 раза, $p \leq 0,001$) и вплоть до 8 сут голодания (в 2,8 раза, $p \leq 0,05$), а также установлена тенденция к увеличению активности ГР и ГП (табл. 1). Отмечена тенденция к некоторому снижению содержания ТБК-активных продуктов.

Среди возможных причин падения уровня GSH в печени при голодании рыб исследователи называют ингибирование глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, обеспечивающей поддержание ресурса НАДФН, необходимого для ГР при возобновлении восстановленной формы глутатиона. Уменьшение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы происходит несмотря на одновременную активацию большинства антиоксидантных ферментов в этом органе [8]. В печени морского карася обнаружено, что соотношение GSH/GSSG сдвигается в сторону GSSG как при полном, так и при частичном голодании, установлена положительная корреляция между степенью депривации пищи и нарастанием окислительной нагрузки в тканях [12]. Усиление активности ГП и ГР на ранних этапах голодания, начиная с 3 сут, отмечено и для других видов рыб [8, 10]. Флуктуации параметров антиоксидантного комплекса и ПОЛ в печени камбалы находятся, вероятно, в пределах физиологической нормы и отражают компенсаторные изменения исследованных показателей при краткосрочном голодании. Неизменный уровень активности каталазы, тенденция к росту активности ГП и ГР свидетельствуют о ведущей роли глутатионпероксидной системы в защите печени.

В гонадах камбалы активность ГП возросла по сравнению с контролем в 2,4 раза ($p \leq 0,05$), а на 8-е сут вновь снизилась в 1,8 раза ($p \leq 0,05$). Тенденция аналогичного характера установлена в изменении активности ГР и содержания ТБК-активных продуктов ($p \geq 0,05$). Выявленная в гонадах активация ГП оказалась, вероятно, достаточной для сдерживания процессов ПОЛ, что и нашло отражение в относительно постоянном уровне ТБК-активных продуктов. Во время голодания активность каталазы в гонадах камбалы уменьшилась в 2,5–2,8 раза ($p \leq 0,05$), установлена также тенденция к снижению содержания GSH. Поскольку каждый из четырех мономеров каталазы имеет участки для связывания НАДФН, необходимого для реализации каталитической активности и защиты фермента от окисления, то предполагают, что установленное при голодании рыб падение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, поддерживающей уровень НАДФН, способствует не только снижению пула GSH, но и инактивации каталазы [8].

В жабрах наибольшее влияние голодание оказало на содержание ТБК-активных продуктов и GSH, которое, как и в печени, постепенно снижалось и на 8-е сут уменьшилось соответственно в 3,9 и 2,35 раза ($p \leq 0,05$). Снижение ресурса GSH, вероятно, обусловлено теми же причинами, что и в печени. Падение уровня ТБК-активных продуктов в жабрах камбалы может быть связано с уменьшением интенсивности дыхания в период голодания, снижением образования активных форм кислорода эритроцитами крови, которые обладают собственной мощной антиоксидантной системой, противодействующей ПОЛ [14]. Активность ГП была стабильна, установлена тенденция к постепенному увеличению активности ГР и каталазы по мере продолжительности голодания.

Таблиця 1. Влияние сроков голодания на показатели ПОЛ и антиоксидантной системы в тканях черноморской камбалы калкан

Ткани	ТБК-АП, мкмоль МДА · г ⁻¹ ткани	ГП, мкмоль GSSG · мин ⁻¹ · мг ⁻¹ белка	ГР, мкмоль НАДФН · мин ⁻¹ · мг ⁻¹ белка	GSH, мкг · г ⁻¹ ткани	Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ · мин ⁻¹ · мг ⁻¹ белка
Контроль					
Печень	119,27 ± 11,95	11,17 ± 2,21	0,820 ± 0,195	524,37 ± 69,40	15,46 ± 2,52
Гонады	86,08 ± 22,36	5,18 ± 1,05	0,876 ± 0,182	280,02 ± 75,34	9,52 ± 2,42
Жабры	98,98 ± 34,65	30,32 ± 5,21	1,670 ± 0,425	233,22 ± 53,37	25,72 ± 4,26
Красные мышцы	176,78 ± 50,57	28,62 ± 12,54	2,250 ± 0,890	176,94 ± 53,93	26,13 ± 6,95
Белые мышцы	95,08 ± 23,99	19,5 ± 1,47	1,37 ± 1,10	121,73 ± 38,62	6,48 ± 3,31
3–4 сут					
Печень	117,48 ± 19,08	15,12 ± 3,86	2,360 ± 0,978	269,70 ± 52,67*	20,17 ± 4,28
Гонады	118,03 ± 19,99	12,70 ± 1,92*	1,204 ± 0,272	212,04 ± 32,18	3,83 ± 1,04*
Жабры	79,10 ± 22,80	29,28 ± 7,70	3,070 ± 0,445	134,53 ± 37,70	34,78 ± 7,11
Красные мышцы	115,68 ± 17,22	32,81 ± 9,69	1,040 ± 0,195	209,30 ± 26,89	10,12 ± 2,20***
Белые мышцы	68,58 ± 17,82	14,80 ± 3,04	0,645 ± 0,106	161,36 ± 31,71	8,79 ± 2,14
8 сут					
Печень	86,92 ± 25,57	18,95 ± 5,13	0,970 ± 0,061	187,44 ± 91,35**	17,54 ± 1,69
Гонады	83,56 ± 7,99	7,08 ± 1,80**	0,865 ± 0,270	146,69 ± 52,21	3,39 ± 0,92**
Жабры	25,22 ± 6,32***	31,14 ± 5,98	4,330 ± 1,650	99,26 ± 31,55**	93,94 ± 63,02
Красные мышцы	125,31 ± 41,65	34,47 ± 4,07	1,82 ± 0,285	426,2 ± 179,23	19,47 ± 1,45**
Белые мышцы	113,34 ± 29,44	22,18 ± 3,87	0,29 ± 0,017	241,97 ± 25,6*	5,01 ± 1,55

*Различия достоверны по сравнению с контролем, $p \leq 0,05-0,001$.**Различия достоверны между опытными группами, $p \leq 0,05$.***Различия достоверны по сравнению с контролем и другой опытной группой, $p \leq 0,05$.

Реакции компенсации у рыб в большинстве случаев протекают волнообразно, постепенно [2, 15]. Кратковременное голодание привело к флуктуациям активности каталазы и ГР в красных мышцах, содержания ТБК-активных продуктов в красных и белых мышцах и активности ГП в белых мышцах. Характер динамики величин перечисленных показателей был одинаков: понижение на первом этапе голодания и повышение на 8-е сут. Изменения активности каталазы в красных мышцах были значительны — 1,9–2,6 раза ($p \leq 0,05$), в остальных случаях проявилась только тенденция. Интересно, что динамика исследованных величин в красных мышцах находилась в противофазе по сравнению с процессами, происходившими в печени. В обоих типах мышц, так же как в жабрах, наиболее постоянной оставалась активность ГП. В белых мышцах установлено двукратное увеличение ресурса GSH на 8-е сут голодания ($p \leq 0,001$), а в красных мышцах выявлена тенденция к его росту.

По данным литературы, голодание в течение 20–21 сут не влияет на уровень продуктов ПОЛ в мышцах карася и горбыля [9]. Не обнаружено существенных изменений в показателях окислительного стресса в мышцах молоди камбалы при ограничении рациона в течение 8 недель [11]. В то же время значительное уменьшение содержания общих липидов в мышцах рыб происходит уже через 3 сут голодания [9, 10]. Установленная нами тенденция к снижению уровня ТБК-активных продуктов в белых и красных мышцах камбалы в первые дни может быть связана с первоочередным использованием липидов при голодании у рыб [1].

Таким образом, на начальных этапах адаптации при кратковременном голодании не произошло существенного сдвига прооксидантно-антиоксидантного баланса, что характеризует высокую буферную емкость антиоксидантной системы в исследованных тканях камбалы.

1. Shulman G. E., Love R. M. The Biochemical Ecology of Marine Fishes, *Advances in Marine Biology*. – San Diego: Acad. Press, 1999. – Vol. 36. – 351 p.
2. Романенко В. Д., Арсан О. М., Соломатина В. Д. Механизмы температурной акклимации рыб. – Киев: Наук. думка, 1991. – 192 с.
3. Максимович А. А. Активность некоторых ферментов углеводного обмена в тканях горбуши во время нерестового голодания // *Биология моря*. – 1981. – № 6. – С. 48–55.
4. Эмеретли И. В., Русинова О. С. Активность ферментов основных путей окисления углеводов в тканях рыб // *Гидробиол. журн.* – 2001. – 37, № 1. – С. 79–87.
5. Халько В. В., Халько Н. А. Сравнительный анализ суточных вариаций липидного состава молоди плотвы *Rutilus rutilus* в условиях свободного доступа к пище и голодания // *Вопр. ихтиологии*. – 2003. – 43, № 4. – С. 540–552.
6. Tripathi G., Verma P. Starvation-induced impairment of metabolism in a freshwater catfish // *Z. Naturforsch. C*. – 2003. – 58, No 5–6. – P. 446–451.
7. Барабой В. А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // *Успехи соврем. биологии*. – 1991. – 111, вып. 6. – С. 923–931.
8. Morales A. E., Perez-Jimenez A., Hidalgo M. C. et al. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver // *Comp. Biochem. Physiol. C*. – 2004. – 139. – P. 153–161.
9. Zhang X.-D., Wu T.-X., Cai L.-S., Zhu Y.-F. Influence of fasting on muscle composition and antioxidant defenses of market-size *Sparus macrocephalus* // *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. – 2007. – 8, No 12. – P. 906–911.
10. Zhang X.-D., Zhu Y.-F., Cai L.-S., Wu T.-X. Effects of fasting on the meat quality and antioxidant defenses of market-size farmed large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) // *Aquaculture*. – 2008. – 280, Is. 1–4. – P. 136–139.
11. Abele D., Roecken D., Graeve M., Buck B. H. Body growth, mitochondrial enzymatic capacities and aspects of the antioxidant system and redox balance under calorie restriction in young turbot (*Scophthalmus maximus*, L.) // *Aquaculture Res.* – 2007. – 38. – P. 467–477.
12. Pascual P., Pedrajas J. R., Toribio F. et al. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*) // *Chem. Biol. Interact.* – 2003. – 145. – P. 191–199.

13. Солдатов А. А., Гостюхина О. Л., Головина И. В. Состояние антиоксидантного ферментативного комплекса тканей черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. в условиях естественного окислительного стресса // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 2008. – 44, № 2. – С. 150–155.
14. Гидулянов А. А. Сравнительная характеристика структурных свойств гемоглобинов и показателей эритроцитарного метаболизма у представителей класса млекопитающих и класса рыб: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Симферополь, 2003. – 20 с.
15. Сравнительная физиология животных. Т. 1 / Под ред. Л. Проссера. – Москва: Мир, 1977. – 608 с.

Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь

Поступило в редакцию 13.07.2010

O. L. Gostyukhina, I. V. Golovina

Peculiarities of the antioxidant system of defense of tissues of Black-Sea turbot under short-term starvation

The activities of glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9), glutathione reductase (EC 1.6.4.2), and catalase (EC 1.11.1.6) and the levels of reduced glutathione and TBA-active products in liver, gonads, gills, red and white muscles of mature Black Sea turbot have been determined under starvation from 3 to 8 days. Short-term starvation has lead to fluctuations of antioxidant complex and lipid peroxidation parameters. Significant changes of the prooxidant-antioxidant balance have not been found, and the compensatory reactions have reflected a sufficiently high buffer capacity of the antioxidant system of examined turbot tissues.