

И.В. Головина¹, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., О.Л. Гостюхина¹, канд. биол. наук, науч. сотр.
**АНТИОКСИДАНТНЫЙ КОМПЛЕКС ЧЕРНОМОРСКОЙ КАМБАЛЫ КАЛКАН
КАК ИНДИКАТОР ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ РЫБ**

Изучены особенности системы антиоксидантной (АО) защиты и пероксидного окисления липидов в тканях черноморской камбалы калкан *Scophthalmus maeoticus*, обусловленные физиологическим состоянием рыб (полом особи, стадией зрелости гонад, продолжительностью голодания). В печени, красных и белых мышцах, жабрах и гонадах определяли активность каталазы (1.11.1.6), пероксидазы (1.11.1.7), глутатионпероксидазы (1.11.1.9), глутатионредуктазы (1.6.4.2), содержание восстановленного глутатиона и малонового альдегида. Установлено, что АО комплекс тканей самок испытывает в период нереста большую нагрузку, чем у самцов, в том числе и непосредственно при переходе гонад со стадии зрелости VI-IV на стадию VI-V. Во многих случаях величина исследованных показателей достоверно выше у самок, и перестройки в АО системе при смене стадии зрелости гонад охватывают у них большее число тканей. На примере пероксидазы показаны компенсаторные изменения активности фермента в тканях камбалы при краткосрочном голодании (до 8 сут).

Ключевые слова: антиоксидантный комплекс, пероксидное окисление липидов, самцы, самки, нерест, стадия зрелости гонад, калкан черноморский, *Scophthalmus maeoticus*

Одним из универсальных биохимических маркеров благополучия организма является интенсивность процессов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и состояние его антиоксидантной системы (АОС). При окислительном стрессе происходит усиление накопления продуктов ПОЛ, в частности малонового диальдегида (МДА). Для защиты от повреждающего действия активных форм кислорода служит АОС, важными элементами которой являются ферменты (каталаза, пероксидаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и др.) и низкомолекулярные соединения (глутатион и др.). Особенности АОС и ПОЛ исследуются у рыб, в том числе различных видов камбал, в связи с эколого-физиологической спецификой видов, паразитарной инвазией рыб, антропогенным загрязнением водоемов (Алешко, Лукьянова, 2008; Руднева, Скуратовская, 2009; Силкина, Микряков, 2005; Ferreira, Moradas-Ferreira et al., 2005; Napierska, Podolska, 2008). Установлены многочисленные аномальные гистоморфологические изменения в органах камбал, которые, по-видимому, являются результатом хронического воздействия загрязнения, ведущего к физиологическому ослаблению особей и снижению пополнения популяций (Сяпина и др., 2000; Ханайченко и др., 2008). Способность животных противостоять различным стресс-факторам во многом определяется антиоксидантной системой и соотношением ее активности с уровнем пероксидного окисления липидов. Важной задачей является сбор базовой информации о соответствующих показателях у рыб в природных условиях.

Цель настоящей работы: изучить особенности параметров антиоксидантной системы и пероксидного окисления липидов в тканях черноморской камбалы калкан в период нереста, обусловленные физиологическими различиями рыб (пол особи, стадия зрелости гонад, продолжительность голодания).

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН», г. Севастополь, РФ.

Материал и методы. Объектом исследования служили половозрелые экземпляры черноморского калкана *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814) длиной 35–45 см, выловленные в апреле – мае 2006 г. в открытых прибрежных водах в районе Севастополя в период нереста. Калкан относится к рыбам с порционным нерестом, по шестибалльной шкале выловленные особи находились на стадии зрелости гонад VI-IV и VI-V.

Препарирование, гомогенизацию и центрифугирование тканей камбалы (печени, гонад, жабр, красных и белых мышц) проводили общепринятыми методами при температуре 0–4°C. Активность ферментов измеряли в 1-сантиметровых кварцевых кюветах объемом 3 мл при температуре 25°C на СФ–26. В супернатанте определяли активность каталазы (1.11.1.6) – по реакции с молибдатом аммония, пероксидазы (1.11.1.7) – по реакции пероксида водорода с бензидиновым реактивом, глутатионпероксидазы (ГП, 1.11.1.9) – по накоплению окисленного глутатиона (GSSG), глутатионредуктазы (ГР, 1.6.4.2) – по убыли НАДФН; в гомогенате определяли содержание восстановленного глутатиона (GSH) по реакции с аллоксановым реактивом и ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) – по образованию триметинового комплекса, как описано ранее при изучении тканевой специфики перечисленных показателей (Гостюхина и др., 2010). Активность каталазы и пероксидазы выражали в мкмольх H_2O_2 /мин/мг белка, ГП – в мкмольх GSSG/мин/мг белка, ГР – в мкмольх НАДФН/мин/мг белка, содержание восстановленного глутатиона (GSH) – в мкг/г сырой ткани. Об уровне ПОЛ судили по накоплению ТБК-активных продуктов (продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой) и выражали в мкмольх МДА/г сырой ткани. Содержание белка определяли методом Лоури. Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента, отличия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$, результаты представлены как $\bar{x} \pm Sx$, объем выборочных совокупностей составлял 6 – 10 особей.

Результаты и обсуждение. В период нереста у самок камбалы по сравнению с самцами достоверно выше активность ГП в печени, красных и белых мышцах, ГР – в красных мышцах, каталазы – в печени, содержание глутатиона в белых мышцах, жабрах и гонадах, а также уровень ПОЛ в белых мышцах и жабрах, $p \leq 0.05$ (рис. 1).

Показатели АО комплекса, величина которых в период нереста достоверно выше в тканях самцов камбалы немногочисленны (рис. 2). Это установлено только для активности ГР в гонадах, пероксидазы – в гонадах и белых мышцах, каталазы – в красных и белых мышцах.

В целом, АО комплекс тканей самок калкана испытывал большую нагрузку, чем у самцов, что, вероятно, связано с более значительными физиолого-биохимическими изменениями в организме самок в связи с подготовкой к нересту. К аналогичному выводу пришли исследователи, изучавшие процессы ПОЛ и ферментные системы антиоксидантной защиты и детоксикации в печени азовской тарани в нерестовый период и установившие половые различия в содержании малонового диальдегида, активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, ацетилэстеразы, глутатион-S-трансферазы (Бугаев и др., 2010). Показано, что самки осетра обладают большей скоростью гидролиза белковых компонентов пищи по сравнению с самцами (Волкова, 2010). Установлена половая специфика активности лизосомальных ферментов и активности цитохрома P-450 в тканях щуки, окуня и сига, а также различия в реакции этих ферментов у самок и самцов на воздействие поллютантов (Высоцкая и др., 2008). В то же время не обнаружено половых особенностей активности антиоксидантных ферментов (каталазы,

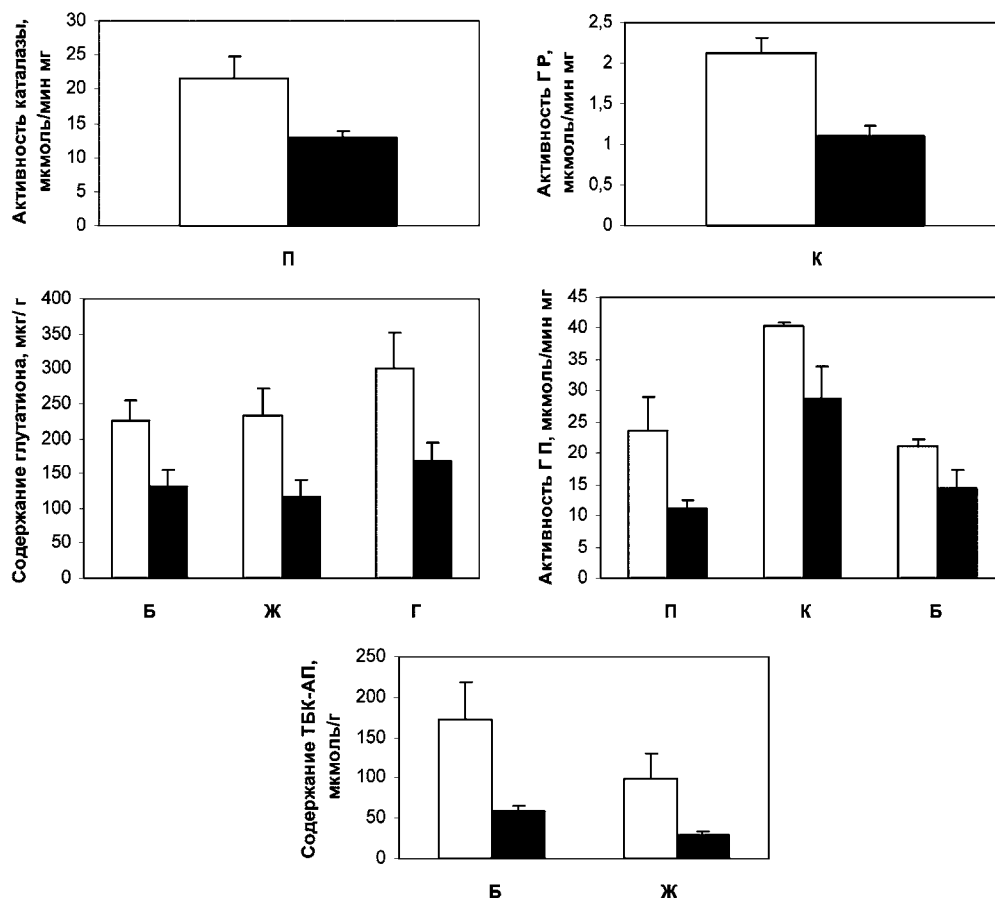


Рис. 1. Показатели АОС и ПОЛ, величина которых в период нереста выше в тканях самок камбалы калкан. Светлые столбцы – самки, темные столбцы – самцы. П – печень, К – красные мышцы, Б – белые мышцы, Ж – жабры, Г – гонады

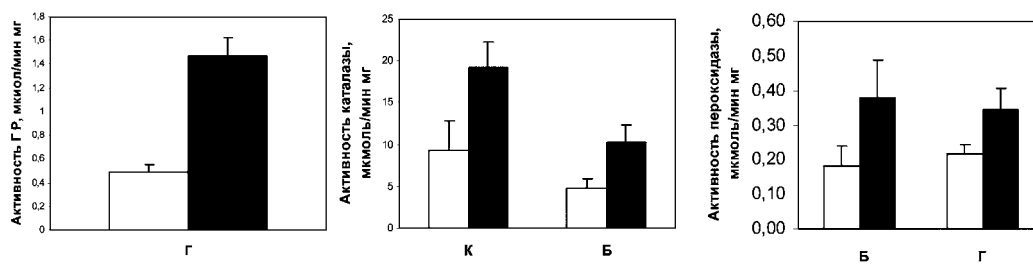


Рис. 2. Показатели АОС, величина которых в период нереста выше в тканях самцов камбалы калкан. Светлые столбцы – самки, темные столбцы – самцы. К – красные мышцы, Б – белые мышцы, Г – гонады

СОД, пероксидазы, ГР и глутатионтрансферазы) в крови шести видов рыб Черного моря, за исключением активности каталазы у мерланга и активности СОД у морского ерша (Руднева, Скуратовская, 2009). Достоверных различий не выявлено при изучении биохимических параметров в печени у самок и самцов полосатой камбалы, за исключением активности супероксиддисмутазы (Алешко, Лукьянова, 2008).

По нашим данным, наиболее ярко у камбалы калкан половые различия проявились в активности ГП и каталазы (печень, красные, белые мышцы), а также содержании глутатиона (белые мышцы, жабры, гонады): в трех тканях из пяти установлена половая специфика величины этих показателей. В свою очередь, среди тканей «лидировали» белые мышцы, поскольку в них по всем использованным биохимическим маркерам, кроме активности ГР, установлены достоверные различия между самцами и самками. По-видимому, это связано с увеличением двигательной активности рыб в период нереста, с необходимостью совершать резкие бросковые движения, в которых задействованы именно белые мышцы. У самок это сопровождается повышением уровня ПОЛ в «быстрых» мышцах в три раза по сравнению с самцами, $p < 0,05$. Вероятно, самцы адаптированы к таким мышечным нагрузкам и поэтому сохраняют низкий уровень ПОЛ в мышцах. Во время нереста они агрессивны, подвижны и раздражительны, что нашло отражение во вдвое более высокой, чем у самок, активности пероксидазы и каталазы в белых мышцах, а также каталазы в красных мышцах, $p < 0,05$.

Для морской камбалы и трески показано, что различия в энергетическом обеспечении белых мышц самцов и самок, связанные с их разной ролью в репродуктивном процессе, особенно выражены в период нереста (Овчинникова, Тимакова, 2008). Установлены половые различия в обмене адениловых нуклеотидов у обоих видов рыб: в белых мышцах самцов выше абсолютное и относительное содержание АТФ, количество адениловых нуклеотидов и величина аденилатного энергетического заряда. Например, содержание АТФ в белых мышцах самок камбал в это время было ниже, чем у самцов на 37,5 %.

В нерестовый период у рыб уровень метаболизма исключительно высок, имеет половую специфику и максимальную вариабельность показателей обмена веществ у особей разного пола, ресурсы организма мобилизуются для достижения эффективного воспроизводства потомства, процессы обеспечения пластических и энергетических нужд формирующихся гонад и половых продуктов интенсивнее протекают у самок (Шатуновский, 1980; Shulman, Love, 1999).

Использованные нами показатели являются чувствительными индикаторами физиологического состояния рыб и дают возможность проследить те изменения, которые происходят в антиоксидантном комплексе при смене стадии зрелости гонад.

Достоверные изменения величины всех исследованных показателей установлены в тканях самок камбалы при переходе их гонад в текучее состояние (VI-V), эти процессы имели тканевую специфику и чаще происходили в гонадах и жабрах самок (рис. 3). Изменение величины активности АО ферментов не имело общей картины, и было выше в тканях самок как VI-IV, так и VI-V стадиях зрелости гонад. Содержание глутатиона было значительно выше в жабрах и гонадах текучих самок, а уровень ПОЛ преобладал в печени и гонадах самок на предыдущей стадии.

У самцов в отличие от самок величина только двух показателей (содержание глутатиона и ТБК-АП) значительно изменялась при переходе их гонад в текучее состояние, $p \leq 0,05$ (рис. 4). Как и у самок, содержание глутатиона было выше у самцов с текучими половыми продуктами, но это касалось только одной ткани – белых мышц. Поскольку у самцов с нетекучими гонадами уровень ПОЛ преобладал во всех тканях, кроме жабр, можно предположить, что на этой стадии ткани самцов испытывали большую окислительную нагрузку, чем у самок, и антиоксидантно-прооксидантные процессы в них были менее сбалансированы. У самцов, находящихся на VI-V стадии зрелости гонад, содержание глутатиона повышалось в белых мышцах при одновременном уменьшении уровня ПОЛ в

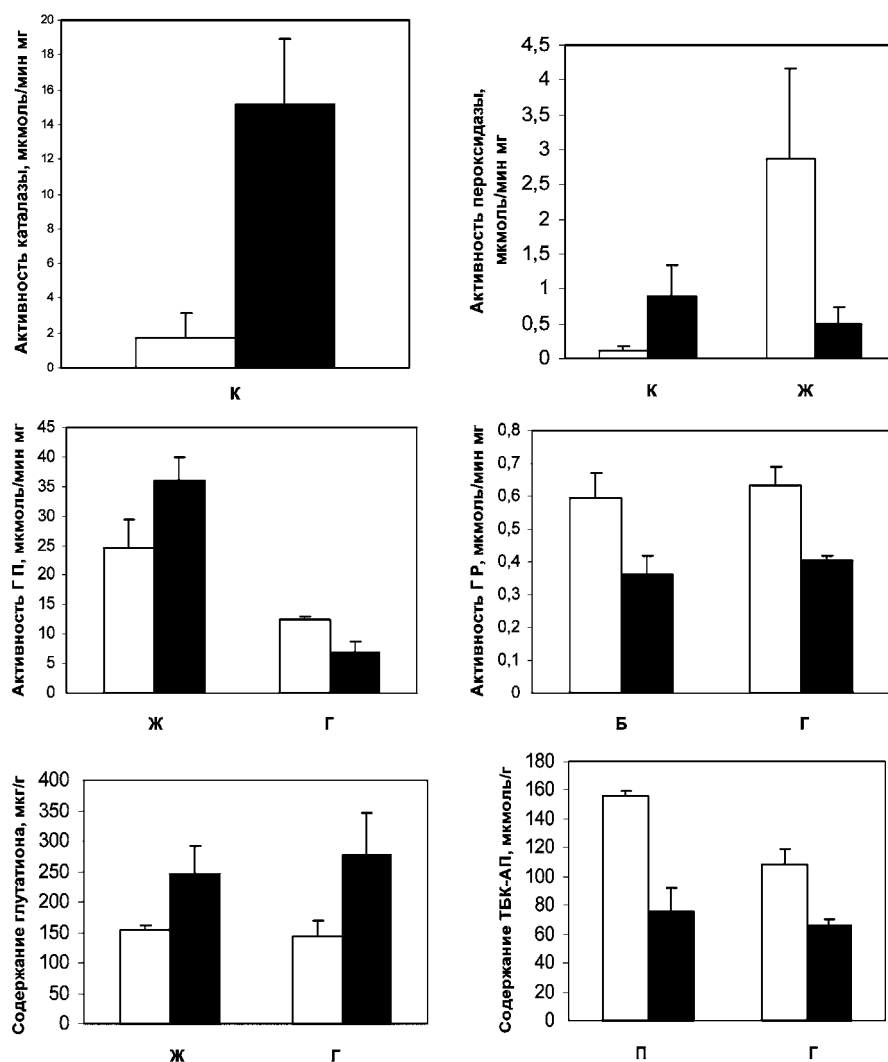


Рис. 3. Показатели АОС и ПОЛ, величина которых достоверно отличается в тканях самок камбалы калкан на стадии зрелости гонад VI-IV (светлые столбцы) и VI-V (темные столбцы). П – печень, К – красные мышцы, Б – белые мышцы, Ж – жабры, Г – гонады

этой ткани, $p < 0,05$. Такая динамика, вероятно, является следствием значительной роли глутатиона в антиоксидантной защите, так как он участвует не только в осуществлении функций связанных с ним ферментов, но и в поддержании окислительно-восстановительного баланса в клетке в целом, предотвращает избыточное окисление полиненасыщенных жирных кислот мембран.

Таким образом, в период нереста у самок калкана во многих случаях не только достоверно выше величина исследованных показателей, чем у самцов, но и перестройка в АО системе при смене стадии зрелости гонад охватывает большее число параметров и тканей.

Возможной причиной этого является отличающийся гормональный фон у самцов и самок калкана. Известно, что уровень половых гормонов резко возрастает во время созревания и снижается после нереста (Шатуновский, 1980; Shulman, Love, 1999). Общая гонадотропная активность гипофиза у самок и самцов рыб (камбалы калкан, бычка кругляка) в нерестовый период значительно раз-

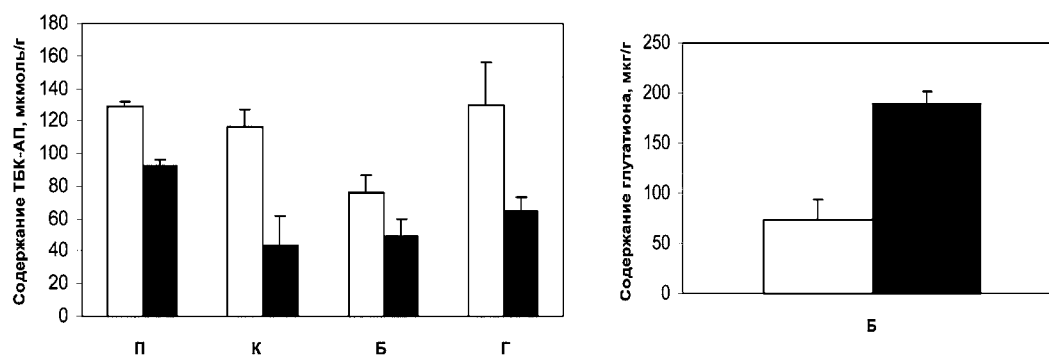


Рис. 4. Показатели АОС и ПОЛ, величина которых достоверно отличается в тканях самцов на стадии зрелости гонад VI-IV (светлые столбики) и VI-V (темные столбики). П – печень, К – красные мышцы, Б – белые мышцы, Г – гонады

личается: у самок длительное время сохраняется на довольно высоком уровне, а у самцов резко снижается с переходом гонад на VI стадию зрелости (Бурлаков, Моисеева, 2009). Имеются сведения об изменении активности лизосомальных ферментов (ДНКазы, РНКазы, β -глюкозидазы, фосфатазы и катепсина D) в тканях (мускулатура, печень, почки, селезенка, сердце, жабры, яичники, семенники) морской и озерной формы атлантического лосося на разных стадиях созревания гонад (Крупнова и др., 2000). Установлена корреляция активности пищеварительных ферментов севрюги и осетра со стадией зрелости гонад (Волкова, 2010). Однако подобные данные отсутствуют для показателей АО комплекса и ПОЛ.

На рис. 5 представлены результаты определения активности пероксидазы в тканях камбал, которых не кормили и выдерживали в аквариумах объемом 4 м³ с проточной морской водой при температуре воды такой же, как в море в этот период (16–18°C). По срокам акклимации рыб разделили на три группы, равномерно представленные особями разного пола и стадии зрелости гонад: контрольная (I), 3–4 суток (II) и 8 суток (III) содержания.

Достоверное увеличение активности пероксидазы установлено в жабрах, красных и белых мышцах рыб II-й группы, $p \leq 0,05$. На восьмые сутки активность фермента в белых мышцах и жабрах возвращалась к контрольному уровню и только в красных мышцах значительно возрастала, $p \leq 0,05$. В печени и гонадах активность пероксидазы была стабильна в течение всего эксперимента. Кратковременное голо-

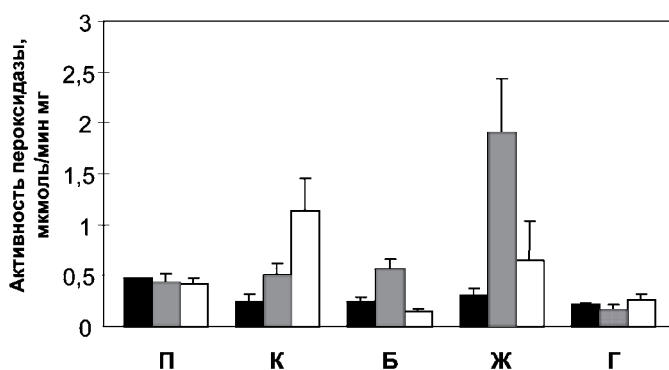


Рис. 5. Влияние кратковременного голодания на активность пероксидазы в тканях камбалы калкан. П – печень, К – красные мышцы, Б – белые мышцы, Ж – жабры, Г – гонады. Контроль – черные столбцы, 3–4 сут – серые столбцы, 8 сут – белые столбцы

дание привело к флуктуации активности фермента в некоторых тканях в пределах нормы, аналогично тем компенсаторным реакциям, что ранее нами были показаны для других параметров АО комплекса камбалы (Гостюхина, Головина, 2011).

Голодание является распространенным физиологическим состоянием рыб на протяжении годового и жизненного цикла, в том числе непосредственно в нерестовый период (Шатуновский, 1980; Shulman, Love, 1999). Рыбы, как правило, хорошо приспособлены даже к длительному голоданию, их мышцы содержат большое количество протеолитических ферментов, необходимых для мобилизации тканей тела при отсутствии пищи.

Выводы. В результате сравнительного анализа состояния антиоксидантной системы и перекисного окисления липидов в тканях самцов и самок черноморской камбалы калкан *Scophthalmus maeoticus* установлена связь исследованных параметров с физиологическим состоянием рыб – полом особи, стадией зрелости гонад, продолжительностью выдерживания в аквариуме без кормления. В целом, АО комплекс тканей самок испытывает в период нереста большую нагрузку, чем у самцов, в том числе и непосредственно при переходе гонад со стадии зрелости VI-IV на стадию VI-V. Во многих случаях величина исследованных показателей достоверно выше у самок, и перестройки в АО системе при смене стадии зрелости гонад охватывают у них большее число тканей. На примере пероксидазы показано, что кратковременное голодание приводит к флуктуации активности фермента в некоторых тканях в пределах нормы. Влияние физиологических особенностей на состояние АОС и интенсивность процессов ПОЛ в тканях рыб необходимо учитывать при использовании исследованных параметров в мониторинговых программах.

Литература

Алешко С.А., Лукьянова О.Н. Сезонные изменения некоторых параметров биотрансформации и антиоксидантной системы в печени полосатой камбалы *Liopsetta pinifasciata* из Амурского залива Японского моря // Биология моря. – 2008. – № 2. – С. 148 – 151.

Бузаев Л.А., Левина И.Л., Войкина А.В., Федорова Е.А., Кузнецова Л.Я. Активность систем антиоксидантной защиты и детоксикации у азовской тарани (*Rutilus rutilus*) в нерестовый период // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов / Материалы III Междунар. конф. (Петрозаводск, 22 – 26 июня 2010 г.). – 2010. – С. 16 – 17.

Бурлаков А.Б., Моисеева Е.Б. Изменение общей гонадотропной активности гипофизов порционно-нерестующего бычка-кругляка *Gobius melanostomus* в репродуктивном цикле // Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных / Материалы II Междунар. науч. конф. – Саранск, 2009. – С. 28–30.

Волкова И.В. Особенности функционирования пищеварительной системы рыб различных трофических групп: автореф. дисс. ... докт. биол. наук. – Астрахань, 2010. – С.44.

Высоцкая Р.У., Амелина В.С., Такшеев С.А., Ломаева Т.А. Активность ферментов у окуня и щуки под влиянием отходов горнометаллургического комбината // Водные и наземные экосистемы: проблемы и перспективы исследований / Материалы Всерос. конф. с междунар. участием (Вологда, Россия, 24–28 ноября 2008 г.). – Вологда, 2008. – С. 16 – 19.

Гостюхина О.Л., Головина И.В. Особенности системы антиоксидантной защиты тканей черноморской камбалы калкан при кратковременном голодании // Доп. НАН України. – 2011. – № 4. – С. 143 – 147.

Гостюхина О.Л., Головина И.В., Вахтина Т.Б. Антиоксидантный комплекс камбалы-калкана *Psetta (Scophthalmus) maxima maeotica* (L., 1758) как индикатор физиологического состояния организма: тканевые особенности // Морск. экол. журн. – 2010. – 9, № 3. – С. 87 – 95.

Крупнова М.Ю., Немова Н.Н., Высоцкая Р.У., Сидоров В.С., Костылев Ю.В. Преднерестовое голодание атлантического лосося (семга и озерная форма) *Salmo salar* L. // Атлантический лосось: биология, охрана и воспроизводство / Тез. докл. Междунар. конф. (Петрозаводск, 4 – 8 сент., 2000). – Петрозаводск, 2000. – С. 29 – 30.

Овчинникова С.И., Тимакова Л.И. Исследование сезонных, половых и видовых особенностей биоэнергетического состояния белых мышц трески и морской камбалы // Вестник МГТУ. – 2008. – **11**, № 3. – С. 432 – 437.

Руднева И.И., Скуратовская Е.Н. Половые особенности активности антиоксидантных ферментов крови некоторых прибрежных видов рыб Черного моря // Вопр. ихтиологии. – 2009. – **49**, № 1. – С. 125 – 128.

Силкина Н.И., Микряков В.Р. Особенности показателей перекисного окисления липидов у *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidea) и их хозяев – *Abramis brama* (L.) // Паразитология. – 2005. – **39**, № 2. – С. 117 – 123.

Сясина И. Г., Арбузова Л. Л., Жадько Е. А., Соколовский А. С. Гистоморфологические изменения в органах камбалы *Pleuronectes obscurus* из загрязненной части Амурского залива Японского моря // Биология моря. – 2000. – **26**, № 4. – С. 265 – 271.

Ханайченко А.Н., Гиразосов В.Е., Ельников Д.В., Данилюк О.Н. Аномалии пигментации черноморской камбалы калкана *Psetta* (= *Scophthalmus*) *maxima maeotica* (Pleuronectiformes: Scophthalmidae) // Морск. экол. журн. – 2008. – **7**, № 2. – С. 87 – 95.

Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. – М.: Наука, 1980. – С. 288.

Ferreira M., Moradas-Ferreira P., Reis-Henriques M.A. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal // Aquat. Toxicol. – 2005. – **71**, № 1. – P. 39 – 48.

Napierska D., Podolska M. Relationship between biomarker responses and contaminant concentration in selected tissues of flounder (*Platichthys flesus*) from the Polish coastal area of the Baltic Sea // Oceanologia. – 2008. – **50**, № 3. – P. 421 – 442.

Shulman G.E., Love R.M. The Biochemical Ecology of Marine Fishes, Advances in Marine Biology. – San Diego: Acad. Press, 1999. – **36**. – P. 351.

The antioxidant complex of the Black Sea turbot as indicator of physiological state of fish. I. V. Golovina, O. L. Gostyukhina. The peculiarities of antioxidant (AO) defense system and lipid peroxidation in tissues of the Black Sea turbot *Scophthalmus maeoticus* related with physiological differences of fish (sex, gonad maturity stages, duration of starvation) were compared. Activity of catalase (1.11.1.6), peroxidase (1.11.1.7), glutathione peroxidase (1.11.1.9), glutathione reductase (1.6.4.2), content of malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) were determined in liver, red and white muscles, gills and gonads. Antioxidant complex of females was established to have higher load during spawning period than that of males', including changing from the VI-IV stage of gonads maturity to the VI-V stage. In many cases values of investigated parameters was significantly higher in females. Reorganization of females' AO system under changing of stages of gonads maturity involves more tissues than in males. Compensatory changes of enzyme activity under short-term starvation (up to 8 days) were shown by the example of peroxidase.

Key words: Antioxidant Complex, Lipid Peroxidation, Males, Females, Spawning, Gonad Maturity Stages, the Black Sea Turbot, *Scophthalmus maeoticus*.