

УДК 597.556.333.1-111.1(262.5+262.54)

**ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ
СИСТЕМЫ КРОВИ БЫЧКА-КРУГЛЯКА *NEOGOBIOUS MELANOSTOMUS*
(PALLAS, 1814) ИЗ ЧЁРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ***

Сигачева Т. Б.

*ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
г. Севастополь, Российская Федерация,
e-mail: mtk.fam@mail.ru*

Проведён анализ возрастных изменений показателей прооксидантно-антиоксидантной системы (активности каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД), пероксидазы (ПЕР), глутатионредуктазы (ГР), глутатионтрансферазы (ГТ) и содержания продуктов окислительной модификации белков (ОМБ)) крови бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) из прибрежных районов Чёрного (г. Севастополь) и юго-западной части Азовского морей. Установлено достоверное снижение активности КАТ и ГР в эритроцитах крови рыб из Чёрного моря в возрасте 2+ по сравнению с группой 0+–1+ и увеличение уровня ОМБ в сыворотке крови рыб старших возрастных групп. У азовских бычков отмечена аналогичная зависимость: активность СОД и ГР была достоверно ниже в крови рыб в возрасте 2+ по сравнению с группой 0+–1+. При этом достоверных изменений уровня ОМБ в сыворотке их крови не обнаружено. Выявлен более высокий уровень ОМБ в сыворотке крови бычка-кругляка из Чёрного моря по сравнению с таковым у одновозрастных особей из Азовского моря, что может свидетельствовать о менее экологически благополучном состоянии севастопольских акваторий. Полученные результаты позволяют рекомендовать проведение биоиндикационных исследований с применением показателей прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка на особях одной возрастной группы.

Ключевые слова: бычок-кругляк, кровь, активность антиоксидантных ферментов, уровень окислительной модификации белков, Чёрное море, Азовское море.

Введение

Для оценки качества водной среды в настоящее время широко применяют методы биоиндикации с использованием показателей прооксидантно-антиоксидантной системы тканей гидробионтов [Экотоксикологические исследования..., 2016]. Анализ соотношения процессов окислительного повреждения биомолекул с буферной ёмкостью антиоксидантной системы (АОС) позволяет оценить адаптационные возможности организма, уровень окислительного стресса (ОС) и качество среды обитания. В то же время соотношение прооксидантно-антиоксидантных реакций в тканях гидробионтов во многом зависит от особенностей их физиологического состояния, в частности от возраста [Stoliar, Lushchak, 2012; De Moura et al., 2017].

При старении, наряду с увеличением образования активных форм кислорода в клетке [Hsu et al., 2008], происходит снижение синтеза антиоксидантных (АО) ферментов и увеличение их чувствительности к металлкаatalизируемому окислению [Davies, Delsignore, 1987]. Это приводит к снижению АО-активности и, как следствие, смещению прооксидантно-антиоксидантных реакций в сторону процессов свободнорадикального окисления (СРО) биомолекул [Stoliar, Lushchak, 2012]. Снижение активности АО-ферментов, увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ) в организме рыб с возрастом было показано в работах ряда авторов [Kishi et al., 2003; Hsu et al., 2008]. На примере многих животных было установлено увеличение доли полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в составе липидов клеточных мембран

*Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме: «Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана», регистрационный № 121030100028-0.

у представителей старших возрастных групп. Последние (ПНЖК) являются предпочтительным субстратом перекисного окисления, что делает клеточные мембраны более чувствительными к ПОЛ [Владимиров, Арчаков, 1972]. При этом гиперпероксидация мембранных липидов угрожает стабильности мембранных структур в целом, отражаясь на состоянии мембраносвязанных протеинов, в том числе белков с каталитической активностью [Маргусевич, Карузин, 2015]. В связи с этим изучение возрастных особенностей показателей прооксидантно-антиоксидантной системы тканей биоиндикаторных видов является необходимым условием для их корректного применения.

Цель работы — изучить активность некоторых АО-ферментов и содержание продуктов ОМБ в крови разных возрастных групп бычка-кругляка из прибрежных районов Чёрного (г. Севастополь) и юго-западной части Азовского морей.

Материалы и методы

Объектом исследований служил бычок-кругляк *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) — типичный представитель донной ихтиофауны Азово-Черноморского бассейна. Рыб отбирали в 2003 г. в прибрежных районах Чёрного моря (г. Севастополь) (139 экз.) и юго-западной части Азовского моря (Арабатский залив) (183 экз.). В ходе биологического анализа определяли основные размерно-массовые характеристики рыб, пол и стадию зрелости гонад. Возраст рыб определяли по отолитам. В Чёрном море, в уловах, встречался бычок-кругляк пяти возрастных групп (от 0+ до 4+) с доминированием рыб 1+ и 2+ (41,55 и 32,39 % соответственно). В Азовском море были выявлены четыре возрастные группы (от 0+ до 3+) с доминированием бычков 1+ (72,67 %).

Материалом исследований служила кровь рыб, отобранная из хвостовой артерии. В гемолизатах крови определяли активность пяти АО-ферментов (каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД), пероксидазы (ПЕР), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ)) методами, описанными нами ранее [Kovyrshina, Rudneva, 2018]. В сыворотке крови анализировали уровень ОМБ по реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином. Оптическую плотность образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразонов регистрировали при следующих длинах волн (λ): при 356 и 370 нм фиксировали альдегидные (C_{356}) и кетонные (C_{370}) продукты нейтрального характера, при 430 и 530 нм — альдегидные (C_{430}) и кетонные (C_{530}) продукты основного характера [Дубинина и др., 1995]. Биохимические анализы проводили на спектрофотометре Specol-211 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Статистический анализ данных осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными в случае, если $p \leq 0,05$ [Лакин, 1990].

Результаты и обсуждение

Предварительный анализ показателей прооксидантно-антиоксидантной системы крови рыб в возрасте 0+ и 1+ не показал достоверных отличий, что позволило объединить их в одну возрастную группу 0+–1+ (табл. 1). Общей тенденцией для бычков из Чёрного и Азовского морей является снижение активности большинства АО-ферментов в возрасте 2+ по сравнению с группой 0+–1+. У черноморских бычков достоверные различия были установлены для КАТ и ГР ($p \leq 0,001$), у азовских — для СОД ($p \leq 0,001$) и ГР ($p \leq 0,01$). В то же время у особей в возрасте 3+ и 4+ была отмечена тенденция увеличения активности отдельных АО-ферментов крови по сравнению с рыбами 2+. Различия достоверны для активности КАТ ($p \leq 0,05$) у черноморских бычков в возрасте 3+, а также ГТ ($p \leq 0,05$) у особей 4+. В противоположность этому активность ПЕР в крови рыб 2+ была достоверно выше по сравнению с аналогичным показателем особей из возрастных групп 0+–1+ ($p \leq 0,01$) и 4+ ($p \leq 0,05$).

Анализ активности АО-ферментов крови одновозрастных особей бычка-кругляка из двух морей позволил установить достоверно более высокую активность КАТ ($p \leq 0,001$), СОД ($p \leq 0,001$) в группе 0+–1+ и КАТ ($p \leq 0,001$) у рыб в возрасте 2+ из Азовского моря по сравнению с бычками из побережья Севастополя. При этом активность ПЕР ($p \leq 0,01$) была достоверно выше в эритроцитах крови рыб всех возрастных групп из Чёрного моря по сравнению с таковой у бычков из юго-западной части Азовского моря.

Таблица 1

Активность антиоксидантных ферментов (мг гемоглобина / мин, $M \pm m$) в крови разновозрастных особей бычка-кругляка из Чёрного и Азовского морей

лет	n	КАТ, мг H ₂ O ₂	СОД, усл. ед.	ПЕР, опт. ед.	ГР, нмоль НАДФН	ГТ, нмоль конъюгата
Чёрное море						
0+–1+	60	0,60 ± 0,04	224,60 ± 38,85	10,14 ± 0,95	8,63 ± 1,29	41,64 ± 17,80
2+	56	0,42 ± 0,02*	147,01 ± 18,38	14,16 ± 1,47*	3,47 ± 0,65*	18,87 ± 2,54
3+	41	0,51 ± 0,04●	158,80 ± 23,77	10,40 ± 2,01	4,79 ± 1,25*	17,70 ± 3,21
4+	4	0,87 ± 0,25	209,18 ± 64,13	10,10 ± 0,75●	6,44 ± 4,66	27,70 ± 2,69●■
Азовское море						
0+–1+	142	0,88 ± 0,03	501,80 ± 64,82	6,08 ± 0,41	8,06 ± 0,89	51,36 ± 7,20
2+	23	0,80 ± 0,06	188,76 ± 36,42*	5,58 ± 0,80	4,75 ± 0,70*	33,52 ± 10,40
3+	2	0,84 ± 0,28	278,65 ± 175,90	4,82 ± 0,91	6,89 ± 2,36	6,7

Примечания: * — достоверность различий с рыбами 0+–1+; ● — с рыбами 2+; ■ — с рыбами 3+; жирным шрифтом обозначена достоверность различий между одновозрастными особями из двух морей.

Содержание продуктов нейтрального характера (C_{356} , C_{370} , $p \leq 0,05$) и альдегидпроизводных основного характера (C_{430} , $p \leq 0,05$) было достоверно выше в сыворотке крови черноморских бычков 4+, так же как и кетопроизводных основного характера у особей в возрасте 2+ и 3+ (C_{530} , $p \leq 0,05$) по сравнению с аналогичными показателями особей из группы 0+–1+ (табл. 2). Уровень ОМБ в сыворотке крови разновозрастных особей бычка-кругляка из Азовского моря достоверно не отличался.

Анализ показателей ОС в сыворотке крови одновозрастных бычков из двух морей позволил установить достоверно более высокое содержание продуктов нейтрального (C_{356} , C_{370} , $p \leq 0,05$) и основного характера (C_{430} , C_{530} , $p \leq 0,05$) у рыб из Чёрного моря в возрасте 0+–1+ и 2+ по сравнению с аналогичными показателями рыб из Азовского моря. Исключение составил уровень кетопроизводных основного характера у возрастной группы 0+–1+.

Таким образом, исследование возрастной динамики показателей прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка из двух морей позволило выявить определённые особенности. У черноморских бычков установлено снижение активности отдельных АО-ферментов в возрасте 2+ по сравнению с группой 0+–1+ и увеличение уровня ОМБ в сыворотке крови рыб старших возрастных групп. У азовских бычков отмечена аналогичная зависимость: активность СОД и ГР достоверно снижалась в крови рыб в возрасте 2+ по сравнению с группой 0+–1+. При этом достоверных изменений содержания окисленных форм белков в сыворотке их крови не установлено. Выявленные особенности могут быть следствием снижения белоксинтезирующей функции печени, а также усиления реакций СРО в организме с возрастом. Снижение активности АО-ферментов [Wdzieczak et al., 1982; Rudneva et al., 2010] и увеличение содержания продуктов ОМБ [Hsu et al., 2008; Скуратовская, 2009] в тканях рыб с возрастом было показано в работах ряда авторов, что соответствует основным положениям

свободнорадикальной теории старения [Harman, 1956]. Так, в исследованиях на разных пресноводных и морских видах рыб было показано снижение активности СОД и КАТ в печени и эритроцитах крови особей старших возрастных групп [Wdzieczak et al., 1982]. Снижение активности СОД и ГР было установлено в печени радужной форели с возрастом [Otto, Moon, 1996]. В большинстве случаев активность АО-ферментов падала в эритроцитах крови морского ерша, налима, султанки, мерланга и спикары старших возрастных групп [Скуратовская, 2009; Rudneva et al., 2010]. При этом общее содержание продуктов ОМБ было выше в сыворотке крови старших возрастных групп морского ерша и мерланга по сравнению с более молодыми [Скуратовская, 2009]. Подобная тенденция отмечена для *Nothobranchius rachovii*, максимальный срок жизни которой составляет 8,5 месяца. Активность КАТ, глутатионпероксидазы, Mn-СОД и Cu, Zn-СОД снижалась, а уровень ПОЛ и ОМБ увеличивался в гомогенатах тканей 7-месячных рыб по сравнению с таковыми у 1- и 4-месячных особей [Hsu et al., 2008].

Таблица 2

Содержание продуктов окислительной модификации белков в сыворотке крови разновозрастных особей бычка-кругляка из Чёрного и Азовского морей (опт. ед. / мл сыворотки, $M \pm m$)

лет	n	продукты нейтрального характера		продукты основного характера	
		альдегидные 356 нм	кетонные 370 нм	альдегидные 430 нм	кетонные 530 нм
Чёрное море					
0+–1+	10	5,61 ± 0,90	7,68 ± 1,16	4,27 ± 0,66	0,46 ± 0,11
2+	10	5,65 ± 0,88	9,38 ± 0,97	5,24 ± 0,54	0,90 ± 0,16*
3+	5	7,40 ± 1,68	10,69 ± 2,28	6,54 ± 1,63	0,99 ± 0,19*
4+	3	8,95 ± 0,87* [●]	13,21 ± 1,90*	7,55 ± 1,02*	1,02 ± 0,27
Азовское море					
0+–1+	50	3,46 ± 0,19	4,53 ± 0,25	2,81 ± 0,16	0,40 ± 0,07
2+	9	2,99 ± 0,47	4,05 ± 0,61	2,53 ± 0,43	0,34 ± 0,10
3+	1	1,60	2,65	0,75	0,10

Примечания: обозначения достоверности различий те же, что и в таблице 1.

В то же время сравнительный анализ показателей ОС (содержания продуктов ОМБ) в сыворотке крови одновозрастных рыб из двух морей показал более высокий уровень ОМБ у рыб Чёрного моря, что свидетельствует о менее экологически благополучном состоянии севастопольских акваторий по сравнению с Арабатским заливом Азовского моря. При этом увеличение активности КАТ и ГТ в эритроцитах крови черноморских бычков в возрасте 3+ и 4+, на фоне увеличения уровня ОМБ в сыворотке их крови, является компенсаторной адаптивной реакцией в условиях хронического загрязнения севастопольских бухт и свидетельствует о развитии патологических состояний в их организме.

Выводы

1. Активность АО-ферментов крови бычка-кругляка из севастопольских акваторий (КАТ, ГР) и юго-западной части Азовского моря (СОД, ГР) была в 1,5–2 раза ниже у рыб в возрасте 2+ по сравнению с группой 0+–1+. Содержание окисленных форм белков было выше в сыворотке крови рыб старших возрастных групп из прибрежной зоны Севастополя.

2. Сравнительный анализ содержания продуктов ОМБ в сыворотке крови одновозрастных рыб из двух морей показал более высокий уровень ОМБ у бычка-кругляка из Чёрного моря, что свидетельствует о менее экологически благополучном состоянии севастопольских акваторий по сравнению с юго-западной частью Азовского моря.

3. Увеличение активности КАТ и ГТ в эритроцитах крови черноморских бычков в возрасте 3+ и 4+, на фоне увеличения уровня ОМБ в сыворотке их крови, вероятно, является компенсаторной адаптивной реакцией рыб старших возрастных групп в условиях хронического загрязнения севастопольских акваторий.

4. Биоиндикационные исследования с применением показателей прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка рекомендовано проводить на одной, предпочтительно доминантной в уловах, возрастной группе рыб.

Список литературы

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – Москва : Наука, 1972. – 252 с.
2. Дубинина Е. Е., Бурмистов С. О., Ходов Д. А., Поротов И. Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения // Вопросы медицинской химии. – 1995. – № 1. – С. 24–26.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва : Высш. шк., 1990. – 352 с.
4. Мартусевич А. К., Карузин К. А. Оксидативный стресс и его роль в формировании дизадаптации и патологии // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2015. – Т. 2, № 2. – С. 5–18.
5. Скуратовская Е. Н. Состояние антиоксидантной ферментной системы крови черноморских рыб в условиях комплексного хронического загрязнения : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.04. – Одесса, 2009. – 20 с.
6. Экотоксикологические исследования прибрежной черноморской ихтиофауны в районе Севастополя / Ин-т мор. биол. исслед. им. А. О. Ковалевского, Рос. фонд фундам. исслед. ; [отв. ред. И. И. Руднева]. – Москва : ГЕОС, 2016. – 358 с.
7. Davies K. J. A., Delsignore M. E. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure // Journal of Biological Chemistry. – 1987. – Vol. 262, no. 20. – P. 9908–9913. – [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48020-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48020-9)
8. De Moura F. R., Brentegani K. R., Gemelli A., Sinhorin A. P., Sinhorin V. D. G. Oxidative stress in the hybrid fish jundiara (*Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum*) exposed to Roundup Original // Chemosphere. – 2017. – Vol. 185. – P. 445–451. – <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.030>
9. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry // Journal of Gerontology. – 1956. – Vol. 11, iss. 3. – P. 298–300. – <https://doi.org/10.1093/GERONJ/11.3.298>
10. Hsu Chin-Yuan, Chiu Ya-Chi, Hsu Wei-Lun, Chan Yu-Pei. Age-related markers assayed at different developmental stages of the annual fish *Nothobranchius rachovii* // Journal of Gerontology. Series A, Biological Sciences & Medical Science. – 2008. – Vol. 63, iss. 12. – P. 1267–1276. – <https://doi.org/10.1093/gerona/63.12.1267>
11. Kishi S., Uchiyama J., Baughman A. M., Goto T., Lin M. C., Tsai S. B. The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence // Experimental Gerontology. – 2003. – Vol. 38, iss. 7. – P. 777–786. – [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(03\)00108-6](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(03)00108-6)
12. Kovyrshina T. B., Rudneva I. I. The Response of blood biomarkers of the round goby *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) (Perciformes: Gobiidae) to chronic coastal pollution in the Sea

- of Azov // Russian Journal of Marine Biology. – 2018. – Vol. 44, № 4. – P. 328–333. – <https://doi.org/10.1134/S1063074018040065>
13. Otto D. M. E., Moon T. W. Endogenous antioxidant systems of two teleost fish, the rainbow trout and the black bullhead, and the effect of age // Fish Physiology and Biochemistry. – 1996. – Vol. 15, iss. 4. – P. 349–358. – <https://doi.org/10.1007/BF02112362>
14. Rudneva I. I., Skuratovskaya E. N., Kuzminova N. S., Kovyrshina T. B. Age composition and antioxidant enzyme activities in blood of Black Sea teleosts // Comparative Biochemistry and Physiology. Pt. C, Toxicology and Pharmacology. – 2010. – Vol. 151, iss. 2. – P. 229–239. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.11.001>
15. Stoliar O. B., Lushchak V. I. Environmental pollution and oxidative stress in fish // Oxidative stress — environmental induction and dietary antioxidants / ed. V. Lushchak. – [S. l.] : IntechOpen, 2012. – P. 131–166. – <https://doi.org/10.5772/38094>
16. Wdzieczak J., Zalesna G., Wujec E., Peres G. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase, and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species // Comparative Biochemistry and Physiology. Pt. B, Comparative Biochemistry. – 1982. – Vol. 73, iss. 2. – P. 361–365. – [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90298-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90298-X)

**AGE FEATURES OF THE PROXIDANT-ANTIOXIDANT BLOOD SYSTEM
OF THE ROUND GOBY *NEOGOBIOUS MELANOSTOMUS* (PALLAS, 1814) FROM
THE BLACK SEA AND THE SEA OF AZOV**

Sigacheva T. B.

*A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation,
e-mail: mtk.fam@mail.ru*

Age-related changes of the prooxidant-antioxidant system parameters (activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (PER), glutathione reductase (GR), glutathione transferase (GT) and oxidized protein levels) in the blood of round goby *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) from the coastal regions of the Black Sea (Sevastopol) and the Sea of Azov were carried out. A significant decrease in the activity of CAT and GR in blood erythrocytes of fish from the Black Sea at the age of 2+ compared as to the group 0+–1+ and an increase in the oxidized protein levels in the blood serum of older age groups fish were established. In the Azov Sea gobies, a similar relationship was noted — the activity of SOD and GR was significantly lower in the blood of fish aged 2+ as compared to the 0+–1+ group. At the same time, no significant changes in the oxidized protein levels in their blood serum have been established. A higher oxidized protein levels in the round goby serum blood from the Black Sea as compared to that in same age individuals from the Sea of Azov indicates a less ecologically safe state of the Sevastopol waters. The results obtained make it possible to recommend carrying out bioindication studies using prooxidant-antioxidant blood system parameters of round goby in one age group.

Keywords: round goby, blood, antioxidant enzyme activities, oxidized protein levels, Black Sea, Sea of Azov.

Сведения об авторе

Сигачева Татьяна Борисовна	кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», mtk.fam@mail.ru
----------------------------------	--

*Поступила в редакцию 17.08.2021 г.
Принята к публикации 06.09.2021 г.*