

УДК [597.2/5-111:542.943-92'78](262.5.04)

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ КРОВИ МАССОВЫХ ВИДОВ РЫБ ИЗ ПРИБРЕЖНОЙ АКВАТОРИИ Г. СЕВАСТОПОЛЯ (ЧЁРНОЕ МОРЕ)*

Скуратовская Е. Н.

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,

г. Севастополь, Российская Федерация,

e-mail: skuratovskaya@ibss-ras.ru

Изучена сезонная динамика активности антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы, пероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы) в эритроцитах крови морского ерша *Scorpaena porcus*, спикары *Spicara flexuosa*, ставриды *Trachurus mediterraneus* из прибрежной акватории г. Севастополя. Установлено, что активность антиоксидантных ферментов изменяется в течение года, что связано как с существованием сезонных физиологических ритмов у рыб, особенностями их биологии и экологии, так и с различным уровнем антропогенной нагрузки в каждый период года. При оценке состояния рыб и среды их обитания с использованием изученных параметров в качестве биомаркеров необходимо учитывать пределы их естественной вариабельности, что позволит правильно интерпретировать результаты исследований.

Ключевые слова: рыбы, биомаркеры, активность антиоксидантных ферментов, сезоны, Чёрное море.

Введение

В современный период, в связи с усилением антропогенного воздействия на морские прибрежные акватории, разрабатываются специальные программы биомониторинга, основанные на использовании показателей различного биологического уровня, реагирующих на действие неблагоприятных факторов среды. Для обнаружения самых ранних, «сигнальных», изменений в метаболизме гидробионтов применяют молекулярные биомаркеры, позволяющие выявить механизмы воздействия комплекса негативных факторов на конкретные звенья обмена веществ, определить основную стратегию и особенности структурно-функциональных изменений в организме при адаптации к изменяющимся условиям обитания. В качестве таких биомаркеров широко применяют показатели антиоксидантной системы (АОС) [Алешко, Лукьянова, 2008; Немова и др., 2014; Amado et al., Biomarkers of exposure..., 2006; Amado et al., Biomarkers in croakers..., 2006; Stoliar, Lushchak, 2012; Rudneva et al., 2016]. Однако для корректного использования параметров АОС в качестве биомаркеров необходимо знать пределы их естественной вариабельности в популяциях изучаемых видов.

Черноморское побережье Крымского полуострова характеризуется чётким разделением года на сезоны, что требует физиологической адаптации гидробионтов. В зависимости от множества факторов (температура, гидрохимический режим водоёма, обеспеченность пищей, стадии репродуктивного цикла и др.) интенсивность биохимических процессов может значительно варьировать в течение года [Шульман, 1972; Багнюкова, Русинова, Луцк, 2000]. Литературные данные свидетельствуют о том, что активность антиоксидантных (АО) ферментов рыб подвержена сезонным колебаниям [Грубинко, Леус, 2001; Алешко, Лукьянова, 2008; Ковыршина, 2010; Ronisz, Larsson, Förlin, 2000; Amado et al., Biomarkers of exposure..., 2006; Amado et al., Biomarkers in croakers..., 2006; Pavlović et al., 2010; Nahrgang et al., 2013; Ihuț et al., 2020].

Цель данной работы заключалась в изучении сезонной динамики активности АО-ферментов эритроцитов крови некоторых массовых видов рыб из прибрежной акватории г. Севастополя.

* Работа выполнена в рамках темы государственного задания ФИЦ ИнБЮМ № 121030100028-0.

Материалы и методы

Объектами исследований служили три вида черноморских рыб, относящихся к разным экологическим (по условиям обитания) и систематическим группам: морской ёрш *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 (донный вид), спикара *Spicara flexuosa* Rafinesque, 1810 (придонно-пелагический вид), ставрида *Trachurus mediterraneus* Steindachner, 1868 (пелагический вид). Рыб отлавливали в Карантинной бухте г. Севастополя в 2007–2008 гг. Проводили полный биологический анализ, для определения биохимических параметров использовали особей доминирующей в уловах возрастной группы (2–3 года).

Материалом для исследования служили эритроциты крови. Эритроциты отмывали путём смешивания с 10-кратным объёмом физиологического раствора (0,85 % NaCl) и последующего отделения эритроцитарной массы. Для получения гемолизата в основную массу эритроцитов добавляли дистиллированную воду в соотношении 1 : 4 (по объёму), выдерживали сутки при температуре 4 °С в холодильнике. Полученные гемолизаты разбавляли десятикратно дистиллированной водой и проводили дальнейшие исследования на спектрофотометре Specol 211 (Германия). В эритроцитах определяли активность пяти АО-ферментов — супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), пероксидазы (ПЕР), глутатионредуктазы (ГР) и глутатион-S-трансферазы (GST) методами, описанными ранее [Rudneva et al., 2016]. Активность ферментов выражали в пересчёте на 1 мг гемоглобина. Результаты обрабатывали статистически, вычисляли среднее арифметическое и стандартную ошибку средней. Достоверность различий между выборками оценивали с применением U-критерия Манна — Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

В результате проведённых исследований установлены сезонные вариации активности АО-ферментов. В эритроцитах крови морского ерша активность СОД в летне-осенний период была достоверно выше, чем в зимний ($p < 0,05$). Активность ПЕР достоверно снижалась весной по сравнению с зимним периодом ($p < 0,05$), тогда как активность ГР в летне-осенний период была достоверно выше значений зимне-весеннего периода ($p < 0,05$). Активность КАТ и GST не изменялась в течение года (табл. 1).

Таблица 1

Активность антиоксидантных ферментов (на мг гемоглобина / мин, $M \pm m$) в эритроцитах крови морского ерша в разные сезоны года

Фермент	Зима n = 40	Весна n = 45	Лето n = 60	Осень n = 46
СОД, усл. ед.	122,11 ± 7,78	142,48 ± 10,61	146,42 ± 8,73*	159,86 ± 10,05*
КАТ, мг H ₂ O ₂	0,44 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,42 ± 0,03
ПЕР, опт. ед.	32,90 ± 1,39	26,43 ± 1,49*	29,12 ± 1,01	29,12 ± 2,09
ГР, нмоль НАДФН	1,91 ± 0,38	1,39 ± 0,23	2,62 ± 0,31* •	2,93 ± 0,48* •
GST, нмоль конъюгата	11,37 ± 2,18	9,10 ± 1,02	10,70 ± 1,01	11,47 ± 1,42

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с зимним периодом, • — весенним ($p < 0,05$); n — количество особей

В эритроцитах крови спикары активность СОД была минимальной зимой по сравнению с остальными сезонами ($p < 0,05$), максимальные значения отмечены в летний период ($p < 0,05$). Активность КАТ достоверно повышалась в весенне-летний период по сравнению с осенне-зимним ($p < 0,05$). Активность GST имела максимальные значения весной и летом и достоверно превышала показатели рыб в осенне-зимний период ($p < 0,05$). Активность ПЕР и ГР не изменялась в течение года (табл. 2).

Таблица 2

**Активность антиоксидантных ферментов (на мг гемоглобина / мин, М ± m)
в эритроцитах крови спикары в разные сезоны года**

Фермент	Зима n = 24	Весна n = 20	Лето n = 25	Осень n = 22
СОД, усл. ед.	131,08 ± 18,40	198,47 ± 12,94*	298,40 ± 53,54* •	210,56 ± 15,55*
КАТ, мг H ₂ O ₂	0,36 ± 0,03	0,45 ± 0,02*■	0,68 ± 0,15*•■	0,35 ± 0,03
ПЕР, опт. ед.	8,62 ± 1,61	8,34 ± 1,09	6,33 ± 1,60	9,23 ± 2,57
ГР, нмоль НАДФН	2,70 ± 0,37	3,34 ± 0,59	3,51 ± 0,27	4,29 ± 0,83
GST, нмоль конъюгата	7,31 ± 1,21	18,42 ± 2,76*■	17,21 ± 3,35*■	8,79 ± 2,30

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с зимним периодом, • — весенним, ■ — осенним (p < 0,05); n — количество особей

Параметры АО-ферментов в крови ставриды также подвержены сезонным колебаниям (табл. 3). Активность СОД была минимальной в зимний период по сравнению с остальными сезонами (p < 0,05). По сравнению с другими периодами года активность КАТ имела максимальные значения весной и летом (p < 0,05), тогда как ПЕР — зимой (p < 0,05). Активность ГР увеличивалась в летне-осенний период по сравнению с зимне-весенним (p < 0,05). Активность GST не изменялась в течение года.

Таблица 3

**Активность антиоксидантных ферментов (на мг гемоглобина / мин, М ± m)
в эритроцитах крови ставриды в разные сезоны года**

Фермент	Зима n = 17	Весна n = 14	Лето n = 46	Осень n = 61
СОД, усл. ед.	111,31 ± 24,38	185,52 ± 19,58*	213,72 ± 28,81*	246,77 ± 26,19*
КАТ, мг H ₂ O ₂	0,27 ± 0,01•	0,49 ± 0,04	0,32 ± 0,02*•■	0,27 ± 0,01•
ПЕР, опт. ед.	29,38 ± 3,81	14,58 ± 3,86*	14,54 ± 2,26*	19,11 ± 2,87*
ГР, нмоль НАДФН	2,86 ± 0,51	2,53 ± 0,98	4,16 ± 0,36*•	4,59 ± 0,32*•
GST, нмоль конъюгата	19,21 ± 4,30	19,73 ± 6,44	21,39 ± 2,27	20,13 ± 4,11

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с зимним периодом, • — весенним, ■ — осенним (p < 0,05); n — количество особей

Изменение активности АО-ферментов в течение года у исследованных видов рыб может быть связано как с существованием сезонных физиологических ритмов, обусловленных колебаниями температурного, водно-солевого режима водоёма, обеспеченностью пищей, потреблением кислорода [Шульман, 1972; Тканевый обмен..., 1983; Эмеретли, 1990], так и с различным уровнем антропогенной нагрузки в каждый период года. При этом обе группы факторов тесно взаимосвязаны между собой. С одной стороны, с повышением температуры наблюдается интенсификация обменных процессов в организме рыб, подготовка к нересту и нерест. Преднерестовый и нерестовый периоды, приходящиеся у исследованных видов на весенний и летний сезоны, соответственно, характеризуются высоким уровнем метаболизма и сопровождаются интенсивным питанием [Шульман, 1972; Багнюкова, Русинова, Луцак, 2000]. В это время у рыб отмечен максимальный уровень тканевого дыхания [Столбов, 1990]. С другой стороны, в связи с повышением температуры увеличивается рекреационная нагрузка на прибрежные акватории, что способствует попаданию в организм биогеоценозов и ксенобиотиков в высоких концентрациях. Также осенью происходят процессы разложения фито- и зоопланктона, в результате чего в морскую среду проникают дополнительные органические соединения [Ковыршина, 2010]. Все эти факторы вызывают повышение АО-ферментативной активности в весенне-летний и осенний периоды: СОД и ГР у морского ерша; СОД, КАТ, GST у спикары; СОД, КАТ, ГР у ставриды.

Зимой, в связи с понижением температуры воды, уровень метаболизма, тканевое дыхание, потребление кислорода и интенсивность питания у рыб снижаются [Шульман, 1972]. Рекреационная нагрузка на места обитания минимальна, в связи с чем активность АО-ферментов в крови в данный период года снижается. В то же время повышение активности ПЕР на фоне снижения активности СОД, КАТ и ГР в эритроцитах крови ставриды в зимний период может быть результатом компенсаторной реакции АО-ферментативной системы.

Изменение АО-ферментативной активности в тканях рыб в течение года показано другими исследователями. В частности, отмечено увеличение активности КАТ и GST в печени жёлтого горбыля *Micropogonias furnieri* в летний период по сравнению с зимним [Amado et al., Biomarkers in croakers..., 2006]. Установлены максимальные значения активности КАТ в печени бразильской камбалы *Paralichthys orbignyanus* весной по сравнению с другими периодами года, тогда как для GST сезонных изменений активности не обнаружено [Amado et al., Biomarkers of exposure..., 2006]. У байкальского омуля *Coregonus autumnalis migratorius* активность СОД в эритроцитах крови в весенний период была максимальной по сравнению с другими сезонами [Дубинина и др., 1988]. Активность СОД и GST в печени бразильского геофагуса *Geophagus brasiliensis*, а также уровень потребления кислорода весной были значительно выше, чем в осенний период [Filho et al., 2001].

Повышение активности СОД у морского ерша (табл. 1), СОД, КАТ и GST у спикары (табл. 2), СОД и КАТ у ставриды (табл. 3) в весенний период по сравнению с зимним, вероятно, связано как с подготовкой к нересту, так и с большей аэрацией воды и, соответственно, высоким потреблением кислорода. Перед нерестом ферменты АОС, наряду с процессами детоксикации поллютантов, осуществляют метаболизм физиологически активных веществ, в связи с чем их активность возрастает. В частности, установлено повышение активности GST в печени бельдюги *Zoarces viviparous* и полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* в преднерестовый период, что обусловлено интенсивными процессами созревания гонад [Алешко, Лукьянова, 2008; Ronisz, Larsson, Förlin, 2000].

В наших исследованиях следует отметить незначительные колебания активности АО-ферментов в эритроцитах крови морского ерша на протяжении года по сравнению с другими видами рыб, что, вероятно, связано с оседлым образом жизни, постоянным антропогенным прессингом и ограниченной кормовой базой. Как известно, если температура в пределах климатической зоны определяет направленность метаболизма, то его интенсивность зависит в основном от состояния кормовой базы и возможностей её усвоения. Именно поэтому мигранты (ставрида, спикара), имеющие более широкий ареал, чем оседлые рыбы (морской ёрш), интенсивнее потребляющие пищу, характеризуются более широкой амплитудой сезонных физиологических ритмов [Шульман, 1972].

Выводы

1. Активность АО-ферментов в эритроцитах крови рыб подвержена сезонным изменениям, обусловленным особенностями биологии и экологии исследованных видов, физиологическим состоянием особей, потреблением кислорода, кормовой базой, колебаниями температуры воды в течение года, а также уровнем антропогенного загрязнения.

2. Температура воды влияет на активность АО-ферментов как непосредственно, активируя обмен веществ у рыб, так и косвенно, за счёт увеличения рекреационной нагрузки и концентрации ксенобиотиков в прибрежной зоне в тёплое время года, что в свою очередь стимулирует работу антиоксидантной системы посредством повышения ферментативной активности: СОД и ГР у морского ерша; СОД, КАТ, GST у спикары; СОД, КАТ, ГР у ставриды.

3. При оценке состояния рыб и среды их обитания с использованием изученных параметров в качестве биомаркеров необходимо учитывать пределы их естественной вариабельности, что позволит правильно интерпретировать результаты исследований.

Список литературы

1. Алешко С. А., Лукьянова О. Н. Сезонные изменения некоторых параметров биотрансформации и антиоксидантной системы в печени полосатой камбалы *Lipsetta pinnifasciata* из Амурского залива Японского моря // Биология моря. – 2008. – Т. 34, № 2. – С. 148–151.
2. Багнюкова Т. В., Русинова О. С., Луцк В. И. Сезонные изменения некоторых физиолого-биохимических и морфологических показателей султанки *Mullus barbatus ponticus* Essipov // Гидробиологический журнал. – 2000. – Т. 36, № 3. – С. 23–30.
3. Грубинко В. В., Леус Ю. В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у рыб (обзор) // Гидробиологический журнал. – 2001. – Т. 37, № 1. – С. 64–78.
4. Дубинина Е. Е., Данилова Л. А., Ефимова Л. Ф., Соловьёв А. Л., Бейм А. М. Активность супероксиддисмутазы и содержание метгемоглобина в эритроцитах человека и животных // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1988. – Т. 24, № 2. – С. 171–175.
5. Ковыришина Т. Б. Особенности антиоксидантной ферментативной системы крови черноморского бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* в нерестовый период // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов : сб. науч. ст. / Рос. акад. наук, Отд-ние биол. наук РАН ; редкол.: Н. Н. Немова [и др.]. – Петрозаводск : Карел. науч. центр РАН, 2010. – Т. 1. – С. 80–83.
6. Немова Н. Н., Мещерякова О. В., Лысенко Л. А., Фокина Н. Н. Оценка состояния водных организмов по биохимическому статусу // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2014. – № 5. – С. 18–29.
7. Столбов А. Я. Тканевое дыхание и дыхательные коэффициенты черноморских рыб в различные периоды годового цикла // Биоэнергетика гидробионтов / АН УССР, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского ; под ред. Г. Е. Шульмана, Г. А. Финенко. – Киев : Наук. думка, 1990. – С. 160–166.
8. Тканевый обмен у рыб / В. И. Беляев, В. М. Николаев, Г. Е. Шульман, Т. В. Юнева ; под общ. ред. Г. Е. Шульмана. – Киев : Наук. думка, 1983. – 144 с.
9. Шульман Г. Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. – Москва : Пищ. пром-сть, 1972. – 368 с.
10. Эмеретли И. В. Активность ферментов энергетического обмена у черноморских рыб // Биоэнергетика гидробионтов / АН УССР, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского ; под ред. Г. Е. Шульмана, Г. А. Финенко. – Киев : Наук. думка, 1990. – С. 178–189.
11. Amado L. L., Robaldo R. B., Geracitano L., Monserrat J. M., Bianchini A. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil) // Marine Pollution Bulletin. – 2006. – Vol. 52, iss. 2. – P. 207–213. – <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.11.007>
12. Amado L. L., da Rosa C. E., Leite A. M., Moraes L., Pires W. V., Pinho G. L. L., Martins C. M. G., Robaldo R. B., Nery L. E. M., Monserrat J. M., Bianchini A., Martinez P. E., Geracitano L. A. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects // Marine Pollution Bulletin. – 2006. – Vol. 52, iss. 2. – P. 199–206. – <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.11.006>
13. Filho D. W., Torres M. A., Tribess T. B., Pedrosa R. C., Soares C. H. L. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acara (*Geophagus brasiliensis*) // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2001. – Vol. 34, iss. 6. – P. 719–726. – <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000600004>
14. Ihuț A., Răducu C., Cocan D., Uiuu P., Lațiu C., Mireșan V., Munteanu C., Luca T. I., Rus V. Seasonal variation of blood biomarkers in huchen, *Hucho hucho* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae) reared in captivity // Acta Ichthyologica Et Piscatoria. – 2020. – Vol. 50, iss. 4. – P. 381–390. – <https://doi.org/10.3750/AIEP/02836>

15. Nahrgang J., Evenset A., Camus L., Jonsson M., Smith T. J., Lukina J., Frantzen M., Renaud P. E., Brooks S. J., Giarratano E. Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), icelandic scallop (*Chlamys islandica*) and atlantic cod (*Gadus morhua*) — implications for environmental monitoring in the Barents Sea // *Aquatic Toxicology*. – 2013. – Vol. 127. – P. 21–35. – <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.009>
16. Pavlović S. Z., Borković S. S., Radovanović T. B., Perendija B. R., Despotović S. G., Gavrić J. P., Saičić Z. S. Seasonal variations of the activity of antioxidant defense enzymes in the red mullet (*Mullus barbatus* L.) from the Adriatic Sea // *Marine Drugs*. – 2010. – Vol. 8, iss. 3. – P. 413–428. – <https://doi.org/10.3390/md8030413>
17. Ronisz D., Larsson D. G. J., Förlin L. Seasonal variations in the activity of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*) // *Marine Environmental Research*. – 2000. – Vol. 50, iss. 1–5. – P. 438–439. – [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00213-0](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00213-0)
18. Rudneva I. I., Skuratovskaya E. N., Chesnokova I. I., Shaida V. G., Kovyrshina T. B. Biomarker response of Black Sea scorpion fish *Scorpaena porcus* to anthropogenic impact // *Advances in Marine Biology* / eds.: A. Kovács, P. Nagy. – New York : Nova Publ., [2016]. – Vol. 1. – P. 119–147.
19. 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>

SEASONAL DYNAMICS OF THE ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN BLOOD OF MASS FISH SPECIES FROM SEVASTOPOL COASTAL AREA (THE BLACK SEA)
Skuratovskaya E. N.

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation,
e-mail: skuratovskaya@ibss-ras.ru

The seasonal dynamics of the antioxidant enzyme activities (catalase, superoxide dismutase, peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase) in the blood erythrocytes of black scorpionfish *Scorpaena porcus*, pickarel *Spicara flexuosa*, horse mackerel *Trachurus mediterraneus* from the Sevastopol coastal area are investigated. It has been revealed that activity of the antioxidant enzymes changes throughout the year. It is associated with the existence of the seasonal physiological rhythms in fish, peculiarities of their biology and ecology as well as the different level of anthropogenic impact in each period of the year. When assessing the state of fish and their habitats by using the studied parameters as biomarkers, it is of importance to take into consideration the limits of their natural variability to interpret correctly the research results.

Keywords: fish, biomarkers, antioxidant enzyme activities, seasons, Black Sea.

Сведения об авторе

Скуратовская Екатерина Николаевна	кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», skuratovskaya@ibss-ras.ru
---	---

Поступила в редакцию 23.08.2021 г.
Принята к публикации 12.10.2021 г.