

УДК 53.082.56

## ДОСЛІДЖЕННЯ ОКИСНО-АНТИОКСИДАНТНИХ ПРОЦЕСІВ У КРОВІ АНТАРКТИЧНИХ РИБ

В.М. Войціцький<sup>1</sup>, С.В.Хижняк<sup>1</sup>, А.Ю.Моїсєєв<sup>2</sup>, О.Б.Ганжа<sup>2</sup>, Л.І.Степанова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 0103, м.Київ, вул.Володимирська 64, e-mail: vmv@bioss.univ.kiev.ua

<sup>2</sup>Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім.Р.Є.Кавецького НАН України, e-mail: drozd@onconet.kiev.ua

**Реферат.** Досліджена хемілюмінесценція крові, вміст у ній продуктів перекисного окислення та активність антиокислювальних ферментів (каталази та супероксиддисмутази) у риб, які виловлені під час 9-ї Української антарктичної експедиції в районі станції Академік Вернадський. Виявлено відмінності в характері окисних процесів, які відбуваються в антарктичних рибах з родин *Nototheniidae*, *Bathydraconidae* та *Chaenichthyidae*, що обумовлено особливостями їх пристосування до умов існування в Антарктиці.

**Исследование окислительно-антиокислительных процессов в крови антарктических рыб.** В.М. Войцицкий, С.В. Хижняк, А.Ю. Моисеев, Е.Б. Ганжа, Л.И. Степанова

**Реферат.** У рыб, отловленных в период работы 9-ой Украинской антарктической экспедиции в районе станции Академик Вернадский, исследована хемилуминесценция крови, содержание в ней продуктов перекисного окисления, активность антиокислительных ферментов (каталазы и супероксиддисмутази). Виявлені отличия в характере протекания окислительных процессов у антарктических рыб, относящихся к семействам *Nototheniidae*, *Bathydraconidae* и *Chaenichthyidae*, что обусловлено особенностями их приспособления к условиям существования в Антарктике.

**Investigation of the oxidation-antioxidation processes in blood of Antarctic fishes.** V.M. Voitsitsky, S.V. Khizhnyak, A.Yu. Moiseev, E.B. Hanzha, L.I. Stepanova

**Abstract.** Blood chemiluminescence, its peroxidation products content and activity of the blood antioxidative enzymes (catalase and superoxide dismutase) have been investigated in fishes caught during the 9-th Ukrainian Antarctic expedition in the water area at the Akademik Vernadsky station. The distinction of the oxidative processes revealed in Antarctic fishes, *Nototheniidae*, *Bathydraconidae* and *Chaenichthyidae*, may arise from the of their adaptation to the Antarctic conditions.

**Key words:** Antarctic, fishes, blood, chemiluminescence, oxidative processes

### 1. Вступ

Антарктика залишається універсальним полігоном для досліджень особливостей унікальної флори та фауни, значна частина якої є ендеміками. Так, в донній фауні Антарктики біля 3/4 видів, що її населяють, відносяться до нототенієвидних риб. Лише одна родина щекорогових (*Bovichthyidae*) характерна для помірних вод Південної півкулі. Інші родини (*Nototheniidae*, *Harpagiferidae*, *Bathydraconidae* та *Chaenichthyidae*) – переважно антарктичні, оскільки найбільшого видового та родового різноманіття вони досягають у холодних водах, які омивають Антарктику. Антарктику можна назвати царством нототенієвидних риб. Родина нототенієвих відрізняється різноманітністю – вона включає майже 50 видів, серед яких переважаюча більшість належить родам Нототенії (*Notothenia*) та Трематоми (*Trematomus*). Більшість видів нототеній веде придонний спосіб життя, але деякі види (*N. macrocephala*, *N. larseni* та ін.) влітку зустрічаються у товщі води, де відгодовуються крилем.

На перевагу нототеніям усі види трематом (*Trematomus*) віддають перевагу найбільш холодним районам Антарктиди. Так, пістряк (*Trematomus bernacchii*) постійно існує в сурових умовах. Він веде придонний спосіб життя, харчуючись, головним чином, моллюсками, боклоплавами, рачками та багатоцетинковими черв'яками.

Мало досліджена біологія більшості білокровних риб. Майже повна відсутність в крові цих риб дихального пігменту (гемоглобіну) та відносно низьке насичення її крові киснем компенсується зростанням темпу кровообігу завдяки значно розвиненій серцевій мускулатурі. Наприклад, у крокодилової білокровки вага серця у три рази більша, ніж у червонокровних натотенієвих. Слід мати на увазі, що біохімія процесу дихання повністю не розкрита, повністю не зрозумілі причини виникнення білокровності та її роль в еволюції цих риб.

Видове різноманіття антарктичних риб, які в залежності від умов існування характеризуються особливостями фізіології, передбачає відмінності в біохімічних механізмах споживання кисню, що є "джерелом енергії у живих системах". Процес біологічного окислення протікає в тканинах усіх тварин та рослин. Використання вільного кисню в інтересах живої системи, з іншого боку, обумовлено існуванням антиоксидантних систем та механізмів, які забезпечують захист клітин від токсичного впливу надлишку кисню. Для оцінки перебігу процесів вільнорадикального окислення використовують різноманітні методи та методики. Хемілюмінесценція (ХЛ) плазми крові є інтегральним показником співвідношення між активністю процесів вільно радикального окислення та антиоксидантним резервом організму (Дружина, Моисеев, 2005). Метод ХЛ широко використовується в різноманітних галузях – молекулярній біології, медицині, біотехнології, екологічній біохімії.

Метою даної роботи є порівняльне дослідження протікання процесів окислення у крові антарктичних риб, які відносяться до родин *Nototheniidae*, *Bathydraconidae* та *Chaenichthyidae*. Представлені в роботі біохімічні дослідження виконані в рамках Державної програми проведення дослідницьких робіт в Антарктиці на 2002-2010 роки.

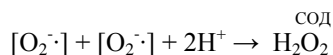
## 2. Матеріали та методи дослідження

Матеріал для досліджень відібрано в період 09.2004 - 05.2005 під час роботи 9-ї Української антарктичної експедиції в районі станції Академік Вернадський. Станція Академік Вернадський знаходиться у західній частині острова Галіндез, одного із островів архіпелагу Аргентинські острови. Ці острови являють собою невелику групу та розміщені в семи-дванадцяти кілометрах до заходу від берегів Землі Грейяма та відділені від Антарктичного півострову проливом Пенола.

Після ідентифікації у риб відбирали кров із хвостової вени. Для аналізу використано зразки (всього 20), які отримані із різних видів риб. У районі досліджень було виявлено особини, що відносяться до 3 родин: *Nototheniidae*, *Bathydraconidae* та *Chaenichthyidae*. Переважна кількість відібраних для біохімічних аналізів особин (9) належало до *N. coriiceps*. Деякі особливості вихідного матеріалу, який використано для біохімічних досліджень, наведено у табл.1. Відбір риб та отримання зразків крові проведено учасником 9-ї Української антарктичної експедиції Манило О.Г.

Плазму та сироватку крові, яку отримували згідно (Прохорова, 1982), заморожували та зберігали при температурі -20 С. Білок визначали за методом Лоурі (Lowry, 1951).

ТБК-активні продукти, за вмістом яких оцінювали кількість малонового діальдегіду (МДА) – одного із кінцевих продуктів пероксидного окислення ліпідів, визначали за методом (Орехович, 1988). Метод заснований на тому, що в результаті взаємодії однієї молекули МДА з двома молекулами 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК) утворюється забарвлена сполука, яка має максимум поглинання при 532 нм. При розрахунку кількості МДА враховували коефіцієнт його молярної екстинції  $E = 156 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Активність каталази (пероксид водню: пероксид водню оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6) визначали згідно методу (Корольок, 1977), принцип якого заснований на реєстрації зміни оптичної щільності в результаті реакції  $\text{H}_2\text{O}_2$  з солями молібдену. Визначення активності супероксиддисмутази (СОД) проводили за методом (Nishikimi, 1972). Супероксиддисмутаза - фермент, який каталізує перетворення надпероксидного радикала  $[\text{O}_2^{\cdot-}]$  на пероксид водню:



Таблиця 1. Вид антарктичних риб, їх лінійно-вагові параметри та місце відлову (станція Академік Вернадський, 09.04 – 05.05 рр.).

| № груп | Вид                       | Місце відлову     | Глибина відлову, м | Кіл-ть проб | Маса тіла, г | Довжина тіла, см |
|--------|---------------------------|-------------------|--------------------|-------------|--------------|------------------|
| 1      | Notothenia coriiceps      | Meek Channel      | 25 – 30            | 3           | 247 – 411    | 25 – 28          |
|        |                           | Grotto-Anvil Rock | 30 – 37            | 3           | 588 – 1806   | 30 – 51          |
|        |                           |                   |                    | 3           | 880 – 1068   | 30 – 40          |
|        |                           | Three Little Pigs | 30 – 35            |             |              |                  |
| 2.     | Trematomus bernacchii     | Skua Greek        | 20 – 30            | 2           | 179 – 196    | 20 – 23          |
|        |                           | Meek Channel      | 15 – 20            | 2           | 225 – 386    | 26 – 28          |
| 3.     | Parachaenichthys charcoti | Meek Channel      | 20 – 25            | 4           | 614 – 1049   | 43 – 52          |
| 4.     | Chaenocephalus aceratus   | Meek Channel      | 25 – 30            | 3           | 769 – 2055   | 48 – 69          |

Дослідження інтенсивності протікання пероксидних процесів в крові хемілюмінесцентним методом проводили наступним чином. Кінетику світіння проб фіксували у вигляді хемілюмінограм на приладі ХЛМ1Ц–01, емісію світла реєстрували за допомогою лічильника фотонів. Гемолізат крові готували шляхом її розведення у 400 разів дистильованою водою. В кюветі хемілюмінометра до 1,0 мл гемолізату додавали 0,5 мл 3% розчину H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Згідно (Серкіз, 1977) визначали наступні характеристики: амплітуду максимального спалаху (I<sub>max</sub>), інтенсивність світіння через 300 с після ініціації реакції (I<sub>к</sub>), загальну світлосуму хемілюмінесценції за 300 с, з моменту введення в кювету пероксиду водню, (Σ<sub>300</sub>). Параметри хемілюмінесценції є інформативними показниками функціонального стану організму в цілому.

Антиоксидантну активність (АОА) сироватки крові риб визначали за допомогою методу індукованої хемілюмінесценції (Дружина, 2003) додаванням до кювети з гемолізатом 0,02 мл сироватки крові і розраховували за формулою:

$$AOA = \frac{\Sigma_{300} - c \Sigma_{300}}{\Sigma_{300}} \times 100\% ,$$

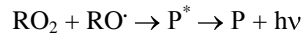
де Σ<sub>300</sub> – світлосума хемілюмінесценції зразка з сироваткою крові за 300 с.

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами статистики (Кучеренко та ін., 2001; Плохинский, 1981).

### 3. Результати досліджень

Для оцінки антиоксидантних властивостей сполук різних класів і визначення динамічних характеристик вільнорадикальних процесів в біологічних системах поширені точні і оперативні методи хемілюмінесценції (Roda et al., 2000). При окисненні біологічних субстратів хемілюмінесценція є результатом неферментативних ланцюгових реакцій за участю вільнорадикальних продуктів. Порушення оксидантно-антиоксидантного співвідношення в системі призводить до зміни параметрів світіння.

За ініційованого окислення вуглеводнів рекомбінація радикалів практично не вимагає енергії активації (E<sub>акт</sub> ≈ 3 ккал/моль), а тепловий ефект, що оцінюється як різниця енергій розриву та утворення зв'язків, складає не менше 100 ккал/моль. Внаслідок рекомбінації пероксидних радикалів утворюються збуджені молекули. Перехід продукту із збудженого стану (P\*) в основний (P) супроводжується випроміненням квантів світла:



Інтенсивність світіння пропорційна квадрату концентрації пероксидних радикалів. Кількість фотонів, що випромінюються за одиницю часу в ході реакції рекомбінації пероксидних радикалів розраховується за формулою:

$$I_{\text{хл}} = (dP^*/dt) = \varphi \cdot (RO_2)^2,$$

де  $I_{\text{хл}}$  – інтенсивність хемілюмінесценції;  $(dP^*/dt)$  – швидкість утворення збуджених продуктів;  $\varphi$  – квантовий вихід люмінесценції збуджених продуктів;  $k$  – константа швидкості обриву ланцюгу.

Крива кінетики світіння гемолізату крові при індукції хемілюмінесценції за допомогою 3% розчину  $H_2O_2$  як правило має два максимуми. Перший спалах світіння обумовлюється розкладом  $H_2O_2$ , виділенням  $HO_2 \cdot$  і  $\cdot OH$  а також додаткових молекул  $O_2$  і утворенням пероксидних радикалів  $RO_2 \cdot$  з їх подальшою рекомбінацією. Розвиток другого піка пов'язаний з наявністю в системі крові антиоксидників білкової та ліпідної природи і ендогенних продуктів пероксидного окислення, які утворюються при метаболізмі, а також *in vitro* в процесі вільнорадикального окислення з подальшим їх накопиченням в системі. Інтенсивність світіння через 300с з моменту ініціації реакції ( $I_k$ ) характеризує рівень субстратів для окислення в системі на цей термін.

Дослідження кінетики індукованого світіння гемолізатів крові антарктичних риби, які відносяться до різних видів (1-3 групи), свідчать, що вона характеризується одним максимумом і швидким спадом світіння до фонового рівня завдяки низькому вмісту в крові антиоксидантів і субстратів для окислення. В якості прикладу наведено типові хемілюмінограми гемолізату 3 та 4 груп антарктичних риб (рис. 1). Слід відмітити, що для гемолізату 4-ї групи риб величина амплітуди світіння вірогідно нижча у порівнянні з іншими групами, та крутого спаду не спостерігається. Крива індукованої ХЛ для цієї групи незначно відрізняється від фонового рівня, що свідчить про незначне протікання в крові пероксидних процесів.

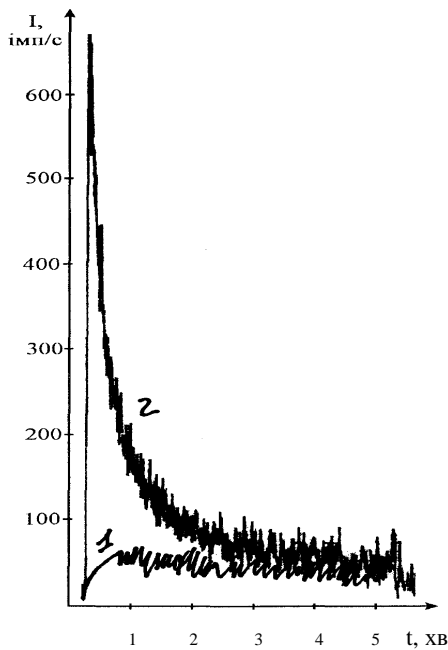


Рис.1. Типова хемілюмінограма гемолізату 3 (2) та 4 (1) груп антарктичних риб.

Проведені детальні дослідження інтенсивності спалаху ХЛ свідчать, що величина цього показника найбільша для *N. Coriiceps*, а найменша для *S. Aceratus* (табл. 2). Слід відмітити, що амплітуда спалаху, який ініційований  $H_2O_2$ , характеризує резистентність ліпідів до перекисного окислення ліпідів. Величина амплітуди прямопропорційна окисненню ліпідів і концентрації металів перехідної валентності.

Ще один важливий показник індукованої ХЛ – світлосума. Відомо (Журавлев, 1985), що величина даного показника залежить, з одного боку, від загальної кількості антиоксидантів у тканині, а з іншого – від доступності, якісного і кількісного складу субстратів, які є легкодоступною мішенню для агресивної дії вільних радикалів. Вони виникають при введенні в систему індуктора ліпопероксидації – перексиду водню. Показник світлосуми ХЛ, ініційованої  $H_2O_2$ , вказує на швидкість витрати вільних радикалів ліпідної природи внаслідок їх взаємодії з антиоксидантами. Проведені дослідження виявили, що світлосума ХЛ за 300с найбільша для *N. coriiceps*. Це вказує на активацію процесу знешкодження вільних радикалів ліпідів за допомогою антиоксидантів (Барабой, Сутковой, 1997). Відповідно, сироватка крові

риб цієї групи має високий антиоксидантний потенціал, що свідчить про забезпечення компенсації надлишку вільно радикальних продуктів, які утворюються внаслідок інтенсивного перебігу реакцій пероксидного окислення. Значення  $I_k$  для крові цього виду більше в 1,3–2,5 рази порівняно з іншими видами, що характеризує наявність більшої кількості субстратів для окислення в зразках крові цієї групи, зокрема, насичених жирних кислот. Окрім *N. coriiceps* кров риб інших видів характеризується низькою інтенсивністю пероксидних процесів і, відповідно, невеликою кількістю субстратів для окислення та від'ємним антиоксидантним потенціалом. Окремо слід відмітити, що ці процеси для *C. aceratus* характеризуються найменшою інтенсивністю.

Таблиця 2. Параметри індукованої хемілюмінесценції гемолізату крові та антиоксидантна активність сироватки крові антарктичних риб ( $M \pm m$ ).

| Групи | $\Sigma_{300}$ , імп за 300 с | $I_{max}$ , імп/с | $I_k$ , імп/с | АОА, % |
|-------|-------------------------------|-------------------|---------------|--------|
| 1     | 100620 ± 9181                 | 1216 ± 143        | 163 ± 14      | +13,3  |
| 2     | 55427 ± 4865                  | 565 ± 67          | 125 ± 18      | -37,5  |
| 3     | 45445 ± 3604                  | 640 ± 122         | 90 ± 12       | -1,7   |
| 4     | 18181 ± 930                   | 60 ± 20           | 60 ± 15       | -      |

Примітка: позначення груп див. у табл. 1

При оцінці протікання окисно-антиоксидантних процесів у крові риб визначали вміст одного із продуктів ПОЛ - малонового діальдегіду (МДА) та активність каталази і супер-

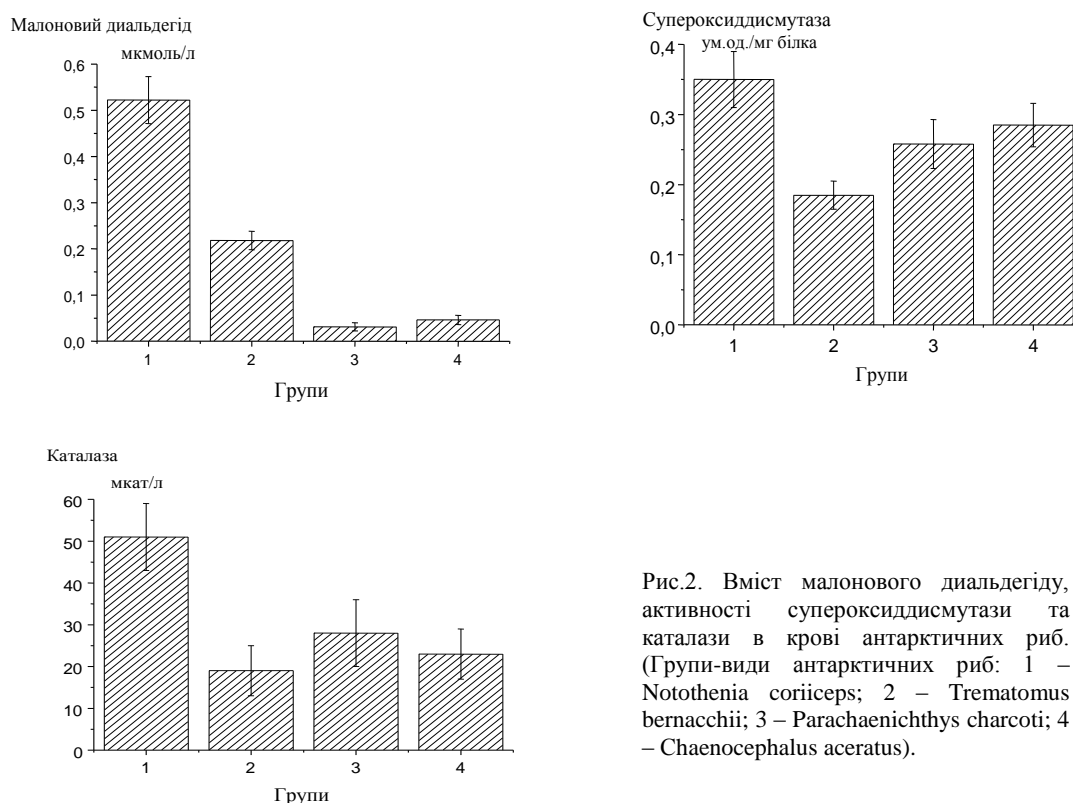


Рис.2. Вміст малонового діальдегіду, активності супероксиддисмутази та каталази в крові антарктичних риб. (Групи-види антарктичних риб: 1 – *Notothenia coriiceps*; 2 – *Trematomus bernacchii*; 3 – *Parachaenichthys charcoti*; 4 – *Chaenocephalus aceratus*).

оксиддисмутази. Встановлено, що найбільший вміст МДА у крові риб, які відносяться до виду *N. corticeps*. Крім того, в них також виявлено більші, у порівнянні з іншими видами риб, активності каталази та СОД, що свідчить про інтенсивніше протікання процесів окислення. Риби, що відносяться до інших видів характеризуються низьким вмістом МДА. Причому, активність досліджуваних ферментів антиокислювального захисту в них також нижча, хоча і спостерігається перерозподіл у величинах активності ферментів, в залежності від виду риб (рис. 2).

#### 4. Висновки

Аналізуючи отримані результати можна зробити висновок про низьку інтенсивність протікання пероксидних процесів у крові досліджених видів антарктичних риби (Серкіз и др., 1989). Високий рівень пероксидних процесів у крові *N. corticeps*, у порівнянні з іншими видами риб, може бути обумовлений більшою інтенсивністю протікання метаболічних процесів. Відповідно, активність каталази та СОД у них вища, а сироватка крові цієї групи має високий антиоксидантний потенціал, що необхідно для забезпечення компенсації надлишку вільнорадикальних продуктів, які утворюються внаслідок інтенсивного перебігу реакцій пероксидного окислення. Слід відзначити різку відмінність у протіканні окисно-антиоксидантних процесів для *S. aceratus*, які відносяться до білокровних риб. Низький рівень окисних процесів для цього виду риб, можливий завдяки незначному вмісту в крові субстратів для окислення та іонів перемінної валентності, що можуть виступати ініціаторами процесу окислення, оскільки в них майже відсутній гемоглобін.

#### Література

- Барабой В.А.,** Сутковой Д.А. Окислительно-антиокислительный гомеостаз в норме и патологии. – К.: Чернобыльинформ, 1997. - Ч.1. - 220с.
- Дружина М.О.,** Моисеев А.Ю. Хемилюминесцентный метод оценки антиоксидантных влаивостей плазмы крови // Укр. журн. гематології та трансфузіології. - 2003. - № 4. - С. 12-13.
- Дружина Н.А.,** Моисеев А.Ю. Хемилюминесцентные методы в биохимических исследованиях / Укр. Биохим. журнал. - 2005. - Т.77, №2. - С.58-65.
- Журавлев А.К.,** Шерстнев М.П., Метод регистрации перекисной хемилюминисценции плазмы крови // Лабораторное дело. - 1985. - №10. - С. 586-587.
- Королюк М.А.** Метод определения активности каталазы в биологическом материале // Лабораторное дело. - 1988. - №2. - С. 31-34.
- Кучеренко М.Є.,** Бабенюк Ю.Д., Войціцький В.М. Сучасні методи біохімічних досліджень. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. - С. 109-152.
- Методы** биохимических исследований. / Под ред. Прохоровой М.Н. - Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. - 272 с.
- Орехович В.Н.** Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. - 268с.
- Плохинский Н.А.** Математические методы в биологии – М.: Изд-во МГУ, 1981. - 265с.
- Серкіз Я.І.,** Чеботарев Є.Ю., Федорова З.П. та ін. Кінетичні хемилюминесцентні характеристики сироватки крові тварин і людини // Фізіологічний журнал. - 1977. - Т.23, № 2. - С. 274-276.
- Хемилюминесценция** крови при радиационном воздействии / Я.И. Серкіз, Н.А. Дружина, А.П. Хриенко и др. – К.: Наукова думка, 1989. - 176 с.
- Lowry O.H.,** Rosenbrouch N.J., Fair A.L., Randal R T. Protein measurement with the Folin Phenol reagent // J.Biol.Chem. - 1951. - V.193, № 1. - P.265-275.
- Nichikimi N.,** Rao N.A., Yagi K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1972. - Vol. 46. - P. 849-854.
- Roda A.,** Pasini P., Guardigli M. et. al. Bio- and chemiluminescence in bioanalysis // Fresenius J. Anal. Chem. - 2000. - Vol.366. - P. 752-759.