

Akademia Pomorska w Słupsku
Wydział Matematyczno - Przyrodniczy
Instytut Biologii i Ochrony Środowiska

Katarzyna Pałczyńska - Guguła

Kształtowanie się mechanizmów reakcji antyoksydacyjnych oraz wybranych parametrów biochemicznych w różnych stadiach rozwojowych troci wędrownej (*Salmo trutta m. trutta* L.).
(streszczenie rozprawy doktorskiej)

Praca doktorska
wykonana pod kierunkiem
dr hab. prof. nadzw. Natalii Kurhaluk
dr Halyny Tkachenko
w Zakładzie Zoologii i Fizjologii Zwierząt
Akademii Pomorskiej w Słupsku

Słupsk 2016

STRESZCZENIE

Troć wędrowna (*Salmo trutta* m. *trutta* L.) jest jednym z najcenniejszych pod względem przyrodniczym i gospodarczym przedstawicielem ichtiofauny ryb łososiowatych Słupi i obszarów jej zlewni (Nilsson et al., 2008, Antychowicz, Mazur, 2010). Gatunek ten ma olbrzymie znaczenie wędkarskie, przez co wpływa na rozwój gospodarki rybackiej w województwie pomorskim (Miller 2006, Utracka-Minko 2006, Ziomek et al., 2016). Charakterystyczną cechą troci wędrownej są wędrówki między zbiornikami słodkowodnymi a słonymi (Olsen et al., 2006, Thomson et al., 2007), przez co stanowi ona doskonały obiekt testowy wykorzystywany do oceny czystości środowiska wodnego (Łuknjanienco 1974, Nyk 1997, Repecka 2003).

W ostatnich latach obserwuje się niekorzystne zmiany stanu populacji ryb łososiowatych w Bałtyku. Stąd opracowanie schematów migracji i ekofizjologii tych ryb jest jednym z niezbędnych elementów zarządzania gospodarką wodną (Kallio-Nyberg et al., 2002, Milner et al., 2006, Degerman et al., 2012).

Stan ekologiczny wód otwartych ma decydujący wpływ na występowanie ryb wędrownych (Cucherousset et al., 2005, Ayllon et al., 2006, Uusitalo et al. 2007). Środowisko wodne z roku na rok jest zanieczyszczane przez wiele różnych form przemysłowych i odpadów z rolnictwa. Ścieki zawierają wiele substancji chemicznych, farmaceutycznych i metali (Koksvik¹, Steinnes, 2005), co znacząco oddziałuje na kondycję fizyczną wielu gatunków tych akwenów (Kružiková, Svobodová 2014, Horvath et al., 2015).

Na przestrzeni ostatnich lat obserwuje się niekorzystne zmiany stanu populacji ryb łososiowatych w Bałtyku i rzekach przybałtyckich ze względu na zanieczyszczenia prekursorami dioksyn (Kobusińska et al., 2014) (Lucas i Baras 2001, Bartel 2002, Wiśniewolski i Engel 2006, Jutila et al. 2006, Degerman, 2012).

Do głównych czynników przyczyniających się do znacznego zmniejszenia się terenów tarliskowych oraz miejsc nadających się do wzrostu narybku ryb anadromicznych (de Leeuw et al., 2007) w większości rzek i cieków zalicza się: zanieczyszczenie wód (Chitra, Sajitha, 2014), stopień przekształceń antropologicznych doliny, regulację nadbrzeży i dna rzek (Kallio-Nyberg et al., 2007), wylesianie dolin rzecznych oraz zabudowę hydrotechniczną (Sych 1998, Dembowski 2000), ograniczenie liczebności ryb wskutek procesu przejściowego smoltyfikacji (Dieperink et al., 2001) oraz eutrofizację Bałtyku (Ronnberg, Bonsdorff, 2004).

Proces tarłowy ryb jest jednym z najważniejszych etapów reprodukcyjnych, zapewniających ochronę gatunku w trakcie onto- i filogenezy (Pedersen et al., 2006). Ten proces składa się z kilku cykli, które charakteryzują się istotnymi zmianami funkcjonowania układów: neuroendokrynnego, immunologicznego i rozrodczego (Dziewulska et al., 2007, Dziewulska et al., 2011) oraz gospodarki wodno-elektrolitowej. Te zmiany w znacznym stopniu spowodowane są odchyleniami w funkcjonowaniu homeostazy pierwiastkowej, redystrybucją dróg metabolicznych wykorzystania energii, znacznym nakładem energii dla dojrzwania ikry i mlecza oraz realizacji samych procesów tarłowych (Alami, Cosson, 2005, Horvath et al., 2015). Wg Selye (1960) obserwowane zmiany w okresie reprodukcyjnym ryb mają przebieg podobny do ogólnego stresowego zespołu metabolicznego i są przystosowaniami adaptacyjnymi (Hochacka, Somero, 1971). Zmiana warunków bytowania i przebiegu reakcji fizjologicznych w akwakulturze stanowią elementy stresowy dla ryb (Barton, Iwama, 1991, Berea et al., 2005, Kenari et al., 2013).

Do oceny kondycji fizjologicznej ryb stosuje się różne metody badań; dobrym miernikiem jest ocena poziomu stresu oksydacyjnego organizmu (Bartosz 2009, Sinha i in. 2014, Kar, Choudhury 2016). Pod pojęciem

„stres oksydacyjny” rozumie się zakłócenie równowagi pro- i antyoksydacyjnej, do której można zaliczyć nadprodukcję reaktywnych form tlenu (RFT) lub spadek aktywności obrony antyoksydacyjnej organizmu (Ziemiański i Wartanowicz 1999, Kurhalyuk i in. 2009, Jargic-Munih i in., 2012). Wchodząc w reakcje z biomolekułami, RFT wyrządzają szkody w komórce, co skutkuje uszkodzeniami białek i lipidów biologicznie istotnych związków (Kolakowska, Bartosz, 2010) i indukcję apoptozy. Niekorzystne zmiany dotyczą wzrostu poziomu procesów peroksydacji lipidów, oksydacyjne uszkodzenia białek i DNA (Deaton i Marlin 2003, Kinnunen i in. 2005, Kirschvink i in. 2008), proliferację i dyferencjację komórek (Jiang et al., 2013).

Powodem wystąpienia zachwiań prooksydacyjno - antyoksydacyjnej równowagi u ryb jest w głównej mierze pogorszenie warunków środowiskowych i hodowlanych. Wśród czynników wpływających na taki stan rzeczy można wyróżnić te o pochodzeniu naturalnym, m.in. nieodpowiednia temperatura (Passi et al., 2005, Rikardsen et al., 2007, Lahnsteiner. Mansour, 2012, Radke, 2013, Réalis-Doyelle et al., 2016), pH (Alami, Cosson, 2005), niski poziom rozpuszczonego tlenu, związki azotowe i antropogeniczne, np. zanieczyszczenie wód (Leliuna 2010, Degerman 2012, Sinha et al., 2014). Dochodzi wówczas do względnie szybkich zmian neurohormonalnych na poziomie całego organizmu. Konsekwencją neurohormonalnej stymulacji narządów ryb, wskutek wędrówek tarliskowych, jest wystąpienie zaburzeń przemiany materii (Kenari et Al., 2013), zmiany hematologiczne i biochemiczne krwi, występowanie stresu oksydacyjnego (Wilson et al., 2014) oraz zaburzenie równowagi elektrolitycznej w organizmie (Włodarczyk and Wenne 2001, Dziewulska et al., 2008, Tkachenko et al., 2015).

Dla oceny poziomu stresu oksydacyjnego (Patil et al., 2014, Li et al., 2016) stosuje się metody pozwalające na analizę aktywności poszczególnych enzymów antyoksydacyjnych, do których zaliczamy m.in.: dysmutazę ponadtlenkowa (SOD), katalazę (KAT), glutation peroksydazę (GPx) i glutation reduktazę (GR) (Van der Oost i in. 2003, Ekinci i Şentürk 2013, Kurutas, 2016). Indukcja procesów prooksydacyjnych i osłabienie mechanizmów antyoksydacyjnych mogą wynikać z zaburzeń równowagi pierwiastkowej organizmu na niektóre metale (Dziewulska 2008, Ekinci i Şentürk 2013). Toksyczność i udział pierwiastków chemicznych w powstaniu stresu oksydacyjnego są zależne od ich właściwości oksydoredukcyjnych oraz reaktywności z innymi związkami i ich aktywnymi grupami chemicznymi (Culotta 2000, Almroth i in. 2012).

Z danych literatury wynika, że mechanizmy funkcjonowania przeciwutleniaczy i obrony antyoksydacyjnej w organizmach ryb w dużym stopniu zależą od wahań temperatury (Lahnsteiner. Mansour, 2012) i poziomu zanieczyszczenia wody (Yadav et al., 2015). W tym celu ryby zostały zaproponowane jako wskaźniki do monitorowania zanieczyszczenia akwenów wodnych, ponieważ mogą kumulować je w swoich tkankach bezpośrednio z wody przez oddychanie, a także poprzez pokarm (Valon et al., 2013).

Niestety, niewiele jest pozycji z dostępnej literatury dotyczących opisu zmian w funkcjonowaniu bariery antyoksydacyjnej na poziomie tkanek czy narządów ryb wędrownych w powiązaniu ze stadiami rozwojowymi i wpływem pierwiastków w tych warunkach. W większości prowadzonych prac doświadczalnych materiał badawczy stanowiły: pełna krew, surowica bądź erytrocyty (Czeczot i in. 2006). Dlatego zwracając uwagę na aktualność podjętego problemu, głównym celem pracy była analiza ekofizjologicznych uwarunkowań bilansu antyoksydacyjnego i procesów lipoperoksydacji pomiędzy poszczególnymi stadiami rozwojowymi (wylęg, parr, smolt, srebrniak, tarlak, kelt) troci wędrownej (*Salmo trutta* m. *trutta* L.) z środowiska słodkowodnego i

morskiego, a stopniem bioakumulacji metali w odpowiedzi na zróżnicowany stan ich naturalnych środowisk bytowania.

Materiał do badań pobrano w latach 2008 - 2011 od 426 osobników troci wędrowej (*Salmo trutta* m. *trutta* L.), w różnych stadiach rozwojowych: wylęg (n=59), parr (n=113), smolt (n=122), srebrniak (n= 20), tarlak (n=88), kelt (n=24).

W celu dokonania oznaczeń biochemicznych na każdym stadium rozwojowym, z każdej ryby pobrano: tkankę mięśniową, serce, skrzelę, wątrobę, które następnie zhomogenizowano w schłodzonym buforze 0,1M Tris-HCl (pH 7,2) w stosunku 1:10. Przygotowany homogenat stanowił podstawowy materiał badawczy, poddawany dalszym analizom biochemicznym.

Intensywność procesów peroksydacji lipidów analizowano przez pomiar poziomu produktów reagujących z kwasem 2-tiobarbiturowym (TBARS), które są biomarkerami oksydacyjnych zmian lipidowych błon komórkowych (Kamyshnikov 2004). Produkty oksydacyjnej modyfikacji białek (OMB) oznaczono przez pomiar poziomu aldehydowych i ketonowych pochodnych w związkach reszt aminokwasowych białek (Levine i in. 1990, Dubinina i in. 1995). Stężenie pochodnych OMB i produktów TBARS wyrażono w nmol na mg białka. Poziom całkowitej aktywności antyoksydacyjnej (CZA) określono przez pomiar stopnia inhibicji askorbat- i żelazo-indukowanego utleniania Tween-80 do dialdehydu malonowego (Galaktionova i in. 1998). Poziom CZA wyrażono w procentach.

Aktywność enzymu dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oznaczono w reakcji z kwercetyną (Kostiuk i in. 1990). Aktywność katalazy (KAT) oznaczono w reakcji z solami molibdenianu (Koroliuk i in. 1988). Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) oznaczono w reakcji z odczynnikiem Elmana (Moin 1986). Aktywność reduktazy glutationowej (GR) oznaczono w reakcji utlenionego glutationu z wykorzystaniem jako ekwiwalentu NADPH₂ (Glatzle i in. 1974).

Aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) i aminotransferazy asparaginianowej (AST) oznaczono w reakcji z 2,4-dinitrofenylohydrazyną (Reitman i Frankel 1967). Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oznaczono w reakcji z 2,4-dinitrofenylohydrazyną (Sevela i Tovarek 1959). Poziom mleczanu oznaczono w reakcji z hydrochinonem, pirogronianu – z dimetyloaminobenzaldehydem (Herasimov i Plaksina 2000).

W celu zbadania poziomu biopierwiastków, próby tkanki mięśniowej każdorazowo pobierano na wysokości płetwy grzbietowej powyżej linii bocznej. W celu określenia stężenia Mg, Ca, Zn, Mn, Cu i Fe w tkankach mięśniowych, poddano je mineralizacji w mieszaninie kwasu azotowego (HNO₃) i nadtlenu wodoru (H₂O₂). Oznaczając wapń i magnez, w celu wyeliminowania oddziaływania fosforu, do wszystkich próbek dodano roztwór chlorku lantanu w ilości, która zapewniałaby 0,5 % stężenie La³⁺ w badanych roztworach. Powyższe pierwiastki oznaczono według instrukcji dołączonej do spektrometru AAnalyst 300 PerkinElmer. Wyniki zawartości Mn, Cu, Zn, Fe wyrażono w mg na kg świeżej masy, natomiast wyniki zawartości Ca i Mg w mg na 100g świeżej masy (Analytical Methods for Absorption Spectroscopy 1996).

Otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej przy pomocy programu STATISTICA 8.0 (StatSoft, Polska) i przedstawiono jako średnie i błąd standardowy średniej. Test Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lillieforsa oraz test Shapiro-Wilka użyto w celu sprawdzenia normalności rozkładu danych. Uzyskane dane częściowo znajdowały się poza rozkładem normalnym. W tym celu do określenia istotności różnic pomiędzy

stężeniem metali i biomarkerami stresu oksydacyjnego oraz parametrami biochemicznymi w grupach ryb z różnych stadiów rozwojowych wykorzystano rangowy test statystyczny Kruskala-Wallisa ($p < 0,05$) oraz test Manna Whitneya dla oceny istotności pomiędzy dwiema grupami danych. (Zar 1999). Dla oceny zależności korelacyjnych występujących pomiędzy parametrami biochemicznymi, markerami stresu oksydacyjnego i biopierwiastkami w każdej z grup wykorzystano test rang opracowany przez Spearmana. Do oceny siły związku korelacyjnego między zmiennymi zastosowano skalę zaproponowaną przez Stanisza (2001).

Odłowy ryb przeprowadzono metodą elektropołówów, za pomocą agregatu prądowórczego z przystawką na prąd stały, dzięki ścisłej współpracy z Parkiem Krajobrazowym „Dolina Słupi” oraz Zarządem Okręgu Polskiego Związku Wędkarskiego w Słupsku.

Analiza intensywności procesów lipoperoksydacji, oksydacyjnej modyfikacji białek, całkowitej zdolności antyoksydacyjnej, aktywności enzymów antyoksydacyjnych, wybranych wartości biochemicznych oraz gospodarki pierwiastkowej tkanek (mięśniowej, sercowej, skrzeli, wątroby) w zależności od stadium rozwojowego troci wędrowej (*Salmo trutta m. trutta* L.) pozwoliła na sformułowanie następujących wniosków:

1. Funkcjonowanie pro/antyoksydacyjnego bilansu wybranych tkanek odzwierciedla przebieg poszczególnych etapów rozwojowych troci (wylęg, parr, smolt, srebrniak, tarlak i kelt) i jest powiązane z istotnym nasileniem procesów lipoperoksydacji, oksydacyjnej modyfikacji białek i obniżeniem całkowitej zdolności antyoksydacyjnej organizmu ryb wraz z wiekiem. Otrzymane wyniki dotyczące kształtowania podstawowych mechanizmów obrony antyoksydacyjnej (dysmutazy nadadtlenkowej (SOD), katalazy (KAT), glutation peroksydazy (GPx) i glutationreduktazy, (GR) i stężenia biomarkerów przemian metabolicznych (alanin- i aspartataminotransferazy, dehydrogenazy mleczajowej, stężenia mleczanu i pirogronianu) wykazują kompensacyjne działanie składników ochrony antyoksydacyjnej oraz występujących powiązań dotyczących utrzymania homeostazy ustrojowej w odpowiedzi na stres przemian oksydacyjnych w zależności od stadium rozwojowego. Największy poziom toksycznych produktów reakcji utleniania, jak i oksydacyjnej modyfikacji białek, odnotowano w stadium kelt troci wędrowej.
2. Profil stężenia badanych składników mineralnych w tkance mięśniowej troci wędrowej w trzech stadiach rozwojowych był następujący: smolt i srebrniak Mg>Ca>Zn>Fe>Cu>Mn; tarlak: Mg>Ca>Fe>Zn>Cu>Mn; ogółem: Mg>Ca>Fe>Zn>Cu>Mn.
3. W tkance mięśniowej ryb stadium smolt, wraz ze wzrostem poziomu Cu i Mn będących kofaktorami enzymów antyoksydacyjnych, następuje wzrost stężeń Fe, Mg oraz Zn. Stadium ryb tarłowych charakteryzowało się najwyższym stężeniem żelaza. Wraz ze wzrostem żelaza zaobserwowano wzrost poziomu oksydacyjnej modyfikacji białek, co można powiązać z udziałem tego pierwiastka w reakcjach utleniania lipidów i innych metabolitów komórkowych.
4. W tkance mięśniowej troci wędrowej stadium parr odnotowano najwyższy poziom całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w stosunku do pozostałych badanych grup ryb. W stadium rozwojowym parr dla tkanek (serca, skrzeli, wątroby) wykazano zależności między markerami procesów oksydacyjnych, obrony antyoksydacyjnej i wskaźnikami przemian metabolicznych. Stadium parr jest okresem, w którym ryba

nabiera cech i zachowań biologicznych decydujących w dalszych etapach jej życia w zbiornikach wodnych.

5. Proces smoltyfikacji ryb był powiązany z nagromadzeniem aldehydowych i ketonowych pochodnych oksydacyjnej modyfikacji białek (OMB) w sercu w stosunku do stadium wylęg i parr. Uzyskane wyniki dowodzą możliwości występowania objawów stresu oksydacyjnego i natężenia funkcjonowania mechanizmów obronnych dla inaktywacji wolnych rodników pod wpływem zmian rozwojowych.
6. U samców w stadium srebrniak odnotowano wzrost poziomu aldehydowych i ketonowych pochodnych z aktywacją kompleksu całkowitej zdolności antyoksydacyjnej zależnej od aktywności reduktazy glutationowej. Niski poziom peroksydacji lipidów w tkance mięśnia sercowego w stosunku do pozostałych grup ryb był uzależniony od aktywności SOD, GPx oraz KAT. Zarówno w wątrobie, jak i skrzelach, wysoka zdolność antyoksydacyjna oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych (m.in. SOD, GPx) wykazywały tendencję do adaptacyjnych zmian organizmu ryb w odpowiedzi na zmianę warunków wewnętrznych, neurohormonalnych i zewnętrznych (środowiskowych). W stadium srebrniak samice w tkankach (mięśniowej, sercu i wątrobie) odnotowano najniższą aktywność KAT w stosunku do pozostałych grup. W tkance mięśniowej zanotowano także istotne obniżenie aktywności SOD oraz GR.
7. Uzyskane wyniki w stadium rozwojowym tarlak troci wędrowniej, dotyczące: okresu głodowego i godowego tych ryb, wykazały, że tarło i związany z tym duży wysiłek mogą mieć bezpośredni wpływ na interakcje: układów antyoksydacyjnych, pierwiastkowego i przemian metabolicznych w wybranych tkankach. Wśród grupy tarlak samice zaobserwowano, że przy aktywacji procesów peroksydacji lipidów oraz zwiększeniu poziomu aldehydowych i ketonowych pochodnych OMB dochodzi do wzrostu przemian metabolicznych. Nagromadzenie markerów stresu oksydacyjnego było powiązane z istotnym wzrostem aktywności enzymów antyoksydacyjnych (m.in. KAT, układu glutationowego oraz CZA).
8. Na uwagę zasługuje fakt wysokiego poziomu zawartości produktów OMB i intensyfikacji procesów lipopreoksydacji w stadium rozwojowym kelt troci wędrowniej we wszystkich badanych tkankach z wyjątkiem tkanki mięśnia sercowego w stosunku do pozostałych grup. Uzyskane wyniki świadczą o nasileniu stresu oksydacyjnego związanego z wycieńczeniem organizmu tych ryb po odbytych tarle oraz powrotną wędrówką do morza i biotransformacjami lipidów, których ilość w tym stadium rozwojowym jest największa. Podwyższony podczas wędrówki ryb wysiłek fizyczny pociąga za sobą wzrost produkcji reaktywnych form tlenu i natężenie kompensacyjnych mechanizmów przeciwdziałania ich toksycznemu wpływowi.