

Originalni naučni rad

VARIJABILNOST DVA ANTIOKSIDATIVNA ENZIMA U ŠKRGAMA BODORKE (*RUTILUS RUTILUS*) U ZAVISNOSTI OD USLOVA ŽIVOTNE SREDINE

Jelena Vranković, Katarina Jovičić, Vesna Đikanović

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Bulevar despota Stefana 142, 11000 Beograd, Srbija, email: jeca.s@ibiss.bg.ac.rs

REZIME

Ovo istraživanje je imalo za cilj da se izmere aktivnosti dva antioksidativna enzima kod bodorke izlovljene sa dva lokaliteta koja su pod različitim antropogenim pritiskom. Riba je uzorkovana u reci Dunav, kod Velikog ratnog ostrva (VRO) – „referentni lokalitet“ i kod Višnjice (VIS) – lokalitet sa intenzivnim zagađenjem. Aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT) su merene u škragama riba. Aktivnosti oba merena enzima se statistički značajno razlikuju ($p < 0.05$) kod riba sa lokaliteta VIS u odnosu na one sa lokaliteta VRO. Dobijeni rezultati ukazuju na znake stresa kod uzoraka poreklom sa lokaliteta na kome je prisutna intenzivna antropogena aktivnost.

KLJUČNE REČI: superoksid dismutaza, katalaza, bodorka

VARIABILITY OF TWO ANTIOXIDANT ENZYMES IN GILLS OF ROACH (*RUTILUS RUTILUS*) IN RELATION TO ENVIRONMENTAL CONDITIONS

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine two antioxidant enzymes in roach caught at two sites with different anthropogenic pressure. Fish were sampled in the Danube at Veliko Ratno ostrvo (VRO), “the reference point”, and Višnjica (VIS), the site with intensive pollution. The activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured in the gills of the fish. A statistically significant difference ($p < 0.05$) was found in the activity of both enzymes in fish from site VIS compared to site VRO. These results indicate signs of stress in fish from the area with intense anthropogenic activities.

KEY WORDS: Superoxide dismutase, catalase, roach

UVOD

Brzo napredovanje u razvoju tehnologije i industrije dovelo je do povećanja zagađujućih čestica u životnoj sredini. U otpadnim vodama se mogu naći kako organske, tako i

neorganske supstance koje ugrožavaju vodenu sredinu i životne zajednice u njoj (Khoshnoud i sar., 2011). Ribe su na vrhu g lanca ishrane u akvatičnim ekosistemima i predstavljaju važne bioindikatore za monitoring vodene sredine (Meng i sar., 2023).

Efekti izlaganja riba subletalnim nivoima zagađivača mogu se meriti upotrebom njihovih biohemijskih, fizioloških, ili histoloških odgovora. Zagađivači iz životne sredine koji se akumuliraju u tkivima riba mogu dovesti do reakcija u organizmu koje proizvode slobodne radikale. Kad nastajanje i nagomilavanje slobodnih radikala nadmaši kapacitet organizma da eliminiše njihov višak, dolazi do oksidativnog stresa (Livingstone, 2003).

Organizmi imaju antioksidativni sistem zaštite koja se sastoji od enzimske i neenzimske komponente. Ovaj sistem održava sadržaj slobodnih radikala na fiziološkim nivoima i ublažava štetan efekat koji nastaje usled njihove visoke koncentracije. Varijacije u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite su predložene kao biomarkeri oksidativnog stresa nastalog usled prisustva zagađivača u životnoj sredini. Pošto su odgovori na oksidativni stres direktno povezani sa ćelijskom funkcijom, biomarkeri mogu da ukažu na status zagađenja životne sredine (Jena i sar., 2009).

Cilj ovog istraživanja je bio da se proceni uticaj zagađenja na bodorke iz Dunava u okviru beogradskog regiona merenjem dva enzima iz prve linije odbrane od oksidativnih oštećenja.

MATERIJAL I METODE

Bodorka je izlovljena u proleće 2021. godine sa dva lokaliteta u beogradskom delu Dunava. Prvi lokalitet, Veliko Ratno ostrvo (VRO, N 44.8289559, E 20.4297724) je udaljen od industrijskih postrojenja, bez vidljivih izvora zagađenja i smatran je referentnim lokalitetom. Drugi lokalitet, Višnjica (VIS, N 44.8295251, E 20.5498088) je pod intenzivnim antropogenim uticajem i smatra se zagađenim lokalitetom. U vreme uzorkovanja izmereni su osnovni fizičko-hemijski parametri kvaliteta vode, uključujući temperaturu vode, pH vrednost i koncentraciju rastvorenog kiseonika (Tabela 1, Table 1).

Tabela 1. Vrednosti fizičko-hemijskih parametara vode na lokalitetima Veliko Ratno ostrvo (VRO) i Višnjica (VIS) izmerenih *in situ* na dan uzorkovanja

Table 1. Values of water physicochemical parameters at Veliko Ratno ostrvo (VRO), and Višnjica (VIS) *in situ* on the day of fish collection

Parametar	VRO	VIS
Temperatura (°C)	9.3	10
pH	8.1	8.3
Rastvoreni O ₂ (mg ⁻¹)	9.7	9.8

Uzorkovanje riba je urađeno od strane profesionalnih alasa, primenom standardnih mrežarskih metoda. Odrasle jedinke bodorke (n=7) su istog dana prenete u laboratoriju na ledu u ledenim kontejnerima (0–4 °C). Ribe su diskovane i škrge su brzo odvojene i zamrznute na -80 °C gde su čuvane za dalje analize.

Tkivo škrge je isitnjeno i homogenizovano u saharoznom puferu pH 7.5 pomoću IKA-Werk Ultra-Turrax homogenizer (Rossi i sar., 1983), zatim je sonifikovano brzinom od 10 kHz po 15 sekundi na ledu (Takada i sar., 1982). Dobijeni sonikati su centrifugirani na 100,000 × g

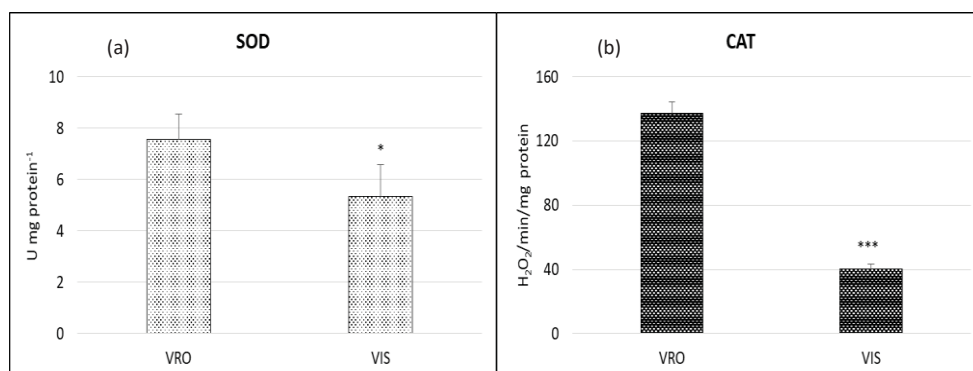
u vremenu od 90 min. na 4°C. Nakon centrifugiranja, izolovani su supernatanti koji su korišćeni za određivanje sadržaja proteina i aktivnosti enzima.

Sadržaj proteina je kvantifikovan po Bradfordovoj metodi (1976). Aktivnost superoksid dismutase je merena po metodi koju su opisali Misra i Fridovich (1972), a aktivnost katalaze po metodi koju je dao Claiborne (1985). Za upoređivanje aktivnosti svakog od enzima u ribama sa različitih lokaliteta je korišćena jednofaktorska analiza varijanse (One way- ANOVA).

REZULTATI I DISKUSIJA

Superoksid dismutaza je enzim koji katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala do molekuskog kiseonika i vodonik peroksida (H_2O_2). Katalaza reaguje sa H_2O_2 stvarajući vodu i kiseonik. Oba enzima igraju ključnu antioksidativnu ulogu čineći prvu liniju odbrane organizma od napada slobodnih radikala (Ozmen i sar., 2004).

U ovoj studiji, dobijena je statistički značajno niža ($p < 0,05$) aktivnost SOD enzima kod riba sa lokaliteta VIS u poređenju sa jedinkama sa lokaliteta VRO (Slika 1a, Figure 1a). Za aktivnost katalaze kod jedinki sa lokaliteta VIS je takođe dobijena značajno niža aktivnost ($p < 0,001$) u odnosu na jedinke sa VRO (Slika 1b, Figure 1b).



Slika 1. Aktivnost enzima superoksid dismutaze – SOD (a) i katalaze – CAT (b) u škrgama bodorke uzorkovane sa lokaliteta Veliko Ratno ostrva (VRO) i Višnjica (VIS)

Figure 1. Activity of superoxide dismutase - SOD (a) and catalase - CAT (b) in the gills of roach from Veliko Ratno ostrva (VRO) and Višnjica (VIS) localities

Jasno se vidi da postoji isti trend promena aktivnosti oba enzima. U ranijim studijama je pokazano da indukovano povećanje aktivnosti enzima SOD i CAT ima za rezultat smanjenje koncentracije slobodnih radikala i redukciju oksidativnog srtresa (Wilhelm-Filho i sar., 1993). Međutim, može doći do smanjenja aktivnosti ovih enzima kao što su pokazali naši rezultati. Smanjena aktivnost SOD enzima može da ukaže na njenu smanjenu sposobnost da zaštiti ćelije od napada slobodnih radikala. Njena smanjena aktivnost dovodi do manje produkcije H_2O_2 i posledično do smanjene aktivnosti CAT enzima. Postoji mogućnost da je opadanje SOD aktivnosti nastalo kao rezultat oštećenja ćelija sa superoksid anjon radikalom (Karadag i sar., 2014). Višak ovog radikala može nastati kao posledica prisustva velike koncentracije zagađivača na lokalitetu VIS.

ZAKLJUČAK

Rezultati u ovom radu ukazuju na to da zagađenje vodene sredine dovodi do promene u fiziološkom odgovoru riba. To se ogleda u pojavi oksidativnog stresa i poremećaja u funkcionisanju antioksidativnog sistema odbrane kod vodenih organizama.

Zahvalnica

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, ugovor br. 451-03-47/2023-01/ 200007.

LITERATURA:

- Bradford, M.M., Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248–254
- Claiborne, A. Catalase activity. R.A. Greenwald (Ed.), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, Florida, (1985) 283–284
- Jena, K.B., Verlecar, X.N., Chainy, G.B.N., Application of oxidative stress indices in natural populations of *Perna viridis* as biomarker of environmental pollution, *Marine Pollution Bulletin*, 58 (2009) 107–113
- Karadag, H., Firat, Ö., Firat, Ö., Use of oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* L. for the evaluation of water pollution in Ataturk Dam Lake (Adiyaman, Turkey), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 92 (2014) 289–293
- Khoshnoud, M.J., Mobini, K., Javidnia, K., Hosseinkhezri, P., Aeen Jamshid, K., Heavy metals (Zn, Cu, Pb, Cd and Hg) contents and fatty acids ratios in two fish species (*Scomberomorus commerson* and *Otolithes ruber*) of the Persian Gulf, *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 7 (2011) 191–196
- Livingstone, D.R., Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture, *Revue de Medicine Veterinaire* 154 (2003) 427–430
- Meng, H., Lin, Y., Zhong, W., Zhao, Z., Shen, L., Ling, Z., Zhao, K., Xu, S., Fish biomonitoring and ecological assessment in the Dianchi Lake basin based on environmental DNA. *Water* 15 (2023) 399.
- Misra, H.P. Fridovich, I., The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a sample assay for superoxide dismutase *Journal of Biological Chemistry* 247 (1972) 3170–3175
- Ozmen, I., Bayir, A., Cengiz, M., Sirkecioglu, A.N., Atamanalp, M., Effects of water reuse system on antioxidant enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W, 1792), *Veterinárni medicína Czech* 49 (2004) 373–378
- Rossi, M.A., Cecchini, G., Dianzani M.U., Glutathione peroxidase, glutathione reductase, and glutathione transferase in two different hepatomas and in normal liver, *IRCS Medical Science and Biochemistry* 11 (1983) p. 805
- Takada, Y., Noguchi, T., Okabe, T., Kajiyama, M., Superoxide dismutase in various tissues from rabbits bearing the Vx-2 carcinoma in the maxillary sinus, *Cancer Research* 42 (1982) 4233–4235
- Wilhelm Filho, D., Boveris A., Antioxidant defenses in marine fish: II. Elasmobranchs, *Comparative Biochemistry and Physiology* 106C (1993) 415–418