

Katarzyna Pałczyńska-Guguła, Halyna Tkachenko, Natalia Kurhaluk

Zakład Zoologii i Fizjologii Zwierząt, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska, Akademia Pomorska w Słupsku

Zawartość mikro- i makroelementów oraz markerów stresu oksydacyjnego w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej (*Salmo trutta* L.) pozyskanych z dopływów Słupi w latach 2009-2011

Wstęp

Zanieczyszczenia wód wywołują różnorakie niekorzystne efekty zarówno bezpośrednio po ekspozycji, jak i w okresie późniejszym, co określane jest terminem „odległe skutki toksyczne” (Kuczyńska i in. 2003). Metale ciężkie wywierają negatywny wpływ na parametry morfologiczne krwi, aktywność enzymów, transport białek oraz funkcjonowanie tkanek i narządów (Järup 2003, Jomova i Valko 2011, Jaishankar i in. 2014). Zatrucia ryb przejawiają się w postaci uszkodzenia strukturalnego, biochemicznego (hematologiczne lub morfologiczne), funkcjonalnego (wzrost, rozwój oraz reprodukcja) (Damek-Poprawa i Sawicka-Kapusta 2004, Hussain i in. 2014, Sfakianakis i in. 2015). Ksenobiotyki wnikają do organizmów ryb poprzez układ oddechowy, skórę oraz układ pokarmowy (Rakowska i in. 2012). Do najczęściej występujących zanieczyszczeń wód zalicza się: pestycydy, detergenty, barwniki, fenole, węglowodory ropopochodne (alifatyczne i aromatyczne), substancje powierzchniowo czynne, aminy aromatyczne, chloropochodne bifenylu, sole (azotany, chlorki, fosforany, siarczany), jony metali ciężkich (ołowiu (Pb), miedzi (Cu), rtęci (Hg), kadmu (Cd), arsenu (As) i innych), radioizotopy (Ritter i in. 2002). Wymienione powyżej substancje związane są z działalnością człowieka i pochodzą głównie ze ścieków, z powierzchniowych i gruntowych spływów z terenów przemysłowych, rolniczych i składowisk odpadów komunalnych (Dźygóra 2009).

Czynniki antropogeniczne mają znaczący wpływ na zaburzenie obiegu geochemicznego metali, zarówno na skalę regionalną, jak i globalną. Pierwiastki chemiczne podlegają nierównomiernej dystrybucji w poszczególnych komponentach środowiska. Ich stężenia zmieniają się lokalnie, a także wraz z upływem czasu. Zastosowanie bioindykatorów stanowi użyteczne narzędzie w monitoringu zanieczyszczenia środowiska wodnego (Sarkar i in. 2006, Torres i in. 2008). Światowa Organizacja Zdrowia (WHO)

zaleca wykorzystanie ryb bardzo wrażliwych na zmiany klimatyczne i antropogeniczne. Do takich ryb należy m.in. troć wędrowna (Pagenkopf 1983).

Miernikiem, który umożliwia ocenę zagrożenia związaną z obecnością czynników szkodliwych w środowisku jest analiza tkanek lub płynów ustrojowych organizmów, w celu stwierdzenia obecności obcych substancji chemicznych, ich metabolitów, zmienionych poziomów enzymów oraz innych substancji biochemicznych. Analizowane substancje nazywa się biomarkerami lub markerami biologicznymi (Sarkar i in. 2006, Torres i in. 2008, Traczewska 2011). Według WHO, biomarkerem jest każdy pomiar interakcji zachodzącej w systemach biologicznych z potencjalnymi zagrożeniami, mogącymi mieć charakter chemiczny, fizyczny lub biologiczny. Mierzona odpowiedź organizmu wywołana interakcją może mieć charakter funkcjonalny, fizjologiczny, biochemiczny na poziomie komórkowym lub molekularny na poziomie subkomórkowym (Mielżyńska 2000).

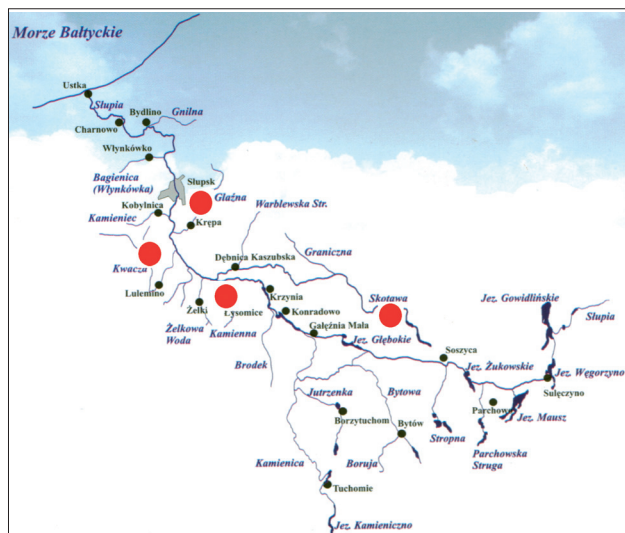
Wcześniejsze badania (Pałczyńska-Guguła i in. 2014a, b) na młodocianych osobnikach troci wędrownej pozwoliły na ocenę kondycji zdrowotnej ryb w oparciu o markery stresu oksydacyjnego (wysoki poziom dialdehydu malonowego w procesie peroksydacji lipidów i tworzeniu grup aldehydowych i ketonowych pochodnych w oksydacyjnej modyfikacji białek), aktywności enzymatycznych antyoksydantów (dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy i reduktazy glutationowej, katalazy) oraz gospodarkę pierwiastkową (stężenia mikroelementów – Mn, Cu, Zn, Fe i makroelementów – Ca, Mg). Uzyskane wyniki wskazywały na znaczne zanieczyszczenie Słupi oraz jej dorzeczy (Pałczyńska-Guguła i in. 2014b). Z danych literaturowych wynika (Opuszyński 1983), że zanieczyszczenia środowiska powodują stres oksydacyjny u ryb, prowadzący do zmian metabolizmu, zwiększających podatność organizmu na zakażenia i choroby. Prowadzone przez nas badania sprzyjają prowadzeniu czynnej ochrony troci w Słupi, gdyż uwzględniają

wpływ środowiska ich bytowania na organizm smoltów (Pałczyńska-Guguła i in. 2014a). W związku z powyższym za celowe uznano ocenę zawartości mikro- i makroelementów (Mn, Cu, Zn, Fe) oraz markerów stresu oksydacyjnego (poziom dialdehydu malonowego, aldehydowych i ketonowych pochodnych, aktywność aminotransferazy alaninowej i asparaginowej, dehydrogenazy mleczanowej oraz poziom mleczanu) w tkance mięśniowej smoltów w latach 2009-2011 pozyskanych z dopływów Słupi (Głaźna, Skotawa, Kamienna, Kwacza).

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiło 175 smoltów troci wędrownej pozyskanych z czterech dopływów rzeki Słupi (Pomorze środkowe, Polska zachodnia) – rzek Głaźna, Skotawa, Kamienna i Kwacza (cztery stanowiska badawcze) (rys. 1).

Słupia jest jedną z głównych rzek Pomorza środkowego, w których trocie odbywają swoje tarło. Cały obszar jej dorzecza znajduje się na terenie województwa pomor-



Rys. 1. Dorzecze rzeki Słupi. Dopływy Słupi, z których pobrano do badań młodociane osobniki troci wędrownej: Głaźna, Skotawa, Kamienna i Kwacza.

skiego, w jego północno-zachodniej części. Słupia zaliczana jest do rzek małych, ma długość 138,6 km, natomiast obszar jej zlewni to 1310 km² (Dębowski i in. 2000).

Ryby pozyskano metodą elektropułłowów za pomocą agregatu prądotwórczego z przystawką na prąd stały, w ścisłej współpracy z Parkiem Krajobrazowym „Dolina Słupi” oraz Zarządem Okręgu Polskiego Związku Wędkarskiego w Słupsku.

Od każdej ryby pobrano tkankę mięśniową do oznaczeń chemicznych i biochemicznych. Do przeprowadzenia analiz biochemicznych uzyskana tkanka mięśniowa została zhomogenizowana w schłodzonym buforze 0,1 M Tris-HCl (pH 7,2) w stosunku 1:10. Przygotowany homogenat sta-



Rys. 2. Młodociany osobnik troci wędrownej.

nowił właściwy materiał badawczy, poddawany dalszym analizom biochemicznym. Poziom białka oznaczono metodą Bradford (1976). Intensywność procesów peroksydacji lipidów wyznaczono 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. 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 tkance mięśniowej poddano je mineralizacji w mieszaninie kwasu azotowego (HNO₃) i nadtlenku wodoru H₂O₂. Oznaczenia zawartości mikro- i makroelementów dokonano metodą płomieniowej spektrofotometrii absorpcji atomowej (płomień powietrze – acetylen), stosując spektrometr Analyst 300. Poszczególne pierwiastki oznaczano przy wykorzystaniu następujących długości fali: 285,2 nm, 422,7 nm, 213,9 nm, 279,5 nm, 324,8 nm i 248,3 nm. Oznaczając Ca i Mg, w celu wyeliminowania oddziaływania fosforu, do wszystkich próbek dodawano roztwór chlorku lantanu w ilości, która zapewniałaby 0,5% stężenia La³⁺ w badanych roztworach. Wyniki zawartości Mn, Cu, Zn, Fe wyrażono w mg na kg świeżej masy, natomiast wyniki zawartości Ca, Mg, Na wyrażono w mg na 100 g świeżej masy.

Otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej za pomocą programu STATISTICA 10.0 (StatSoft, Polska). Test Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lilleforsa oraz test Shapiro-Wilka użyto do sprawdzenia normalności rozkładu danych. Wszystkie uzyskane dane znajdowały się poza rozkładem normalnym. Do określenia istotności różnic pomiędzy stężeniem metali i biomarkerami stresu oksydacyjnego oraz parametrami biochemicznymi

w grupach ryb z różnych rzek wykorzystano rangowy test statystyczny Kruskala-Wallisa ($p < 0,05$) (Zar 1999).

Wyniki badań i dyskusja

Dynamikę zmian stężenia metali w tkance mięśniowej młodocianych osobników troci wędrownej bytujących w dorzeczech Słupi (rzeki Głaźna, Skotawa, Kwacza, Kamienna) przedstawiono w tabeli 1.

Mangan przedostaje się do wód w stopniu zależnym od warunków utleniająco-redukcyjnych. Intensywne wymywanie manganu z podłoża następuje w warunkach redukcyj-

powstające w czasie przemiany aerobowej. W dużych stężeniach pierwiastek ten jest bardzo toksyczny dla komórek, ponieważ generuje rodnik hydroksylowy powodując peroksydację lipidów (Gaetke i Chow 2003, Gaetke i in. 2014). Toksyczność związków miedzi dla ryb zależy od stopnia twardości wody (Skrajnowska i in. 2010).

Różnice istotne statystycznie pomiędzy stężeniami miedzi stwierdzono dla lat 2009 i 2010 oraz 2009 i 2011. W tkance mięśniowej młodocianych osobników troci wędrownej w okresie 2009-2010 oraz 2009-2011 zaobserwowano wzrost stężenia miedzi odpowiednio o 49% ($p < 0,05$) i 77% ($p < 0,05$) (tab. 1). Prze-

Zawartość mikro- i makroelementów w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej (*Salmo trutta* m. *trutta* L.) bytujących w dorzeczech Słupi w latach 2009, 2010 i 2011, M \pm m

Lata	Mn	Cu	Zn	Fe	Ca	Mg
	mg kg ⁻¹ świeżej masy				mg 100 g ⁻¹ świeżej masy	
2009	0,022 \pm 0,001 ^a	0,426 \pm 0,045 ^{ac}	2,28 \pm 0,20 ^{ac}	4,62 \pm 0,68 ^c	9,38 \pm 1,34	15,25 \pm 1,44 ^{ac}
2010	0,030 \pm 0,002 ^a	0,635 \pm 0,034 ^a	7,11 \pm 0,31 ^{ab}	3,52 \pm 0,30 ^b	12,11 \pm 0,72 ^b	32,67 \pm 1,80 ^a
2011	0,034 \pm 0,003	0,753 \pm 0,044 ^c	5,96 \pm 0,37 ^{bc}	7,52 \pm 0,52 ^{bc}	9,27 \pm 0,56 ^b	27,83 \pm 1,20 ^c

^a zmiany statystycznie istotne ($p < 0,05$) między wartościami z 2009 i 2010 roku;

^b zmiany statystycznie istotne ($p < 0,05$) między wartościami z 2010 i 2011 roku;

^c zmiany statystycznie istotne ($p < 0,05$) między wartościami z 2009 i 2011 roku.

nych. Jego brak w wodzie wywołuje u ryb zaburzenia wzrostu i rozmnażania. Pierwiastek ten bierze udział w reprodukcji i prawidłowym funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego (Paluch 1973, Hudnell 1999, Elsner i Spangler 2005, Menezes-Filho i in. 2009). Jony manganu biorą udział w aktywacji glikozylotransferaz zaangażowanych w syntezie glikoprotein. Mangan występuje w niektórych enzymach, np. karboksylazie pirogronianowej mitochondriów. Aktywuje enzymy związane z rozpadem węglowodorów i wraz z żelazem bierze udział w redukcji azotanów. Głównym wewnątrzkomórkowym miejscem występowania manganu są mitochondria (Starmach i in. 1978).

W naszych badaniach, najwyższy poziom manganu (0,034 mg kg⁻¹) oraz miedzi (0,753 mg kg⁻¹) w tkance mięśniowej smoltów odnotowano w 2011 r. Różnice istotne statystycznie pomiędzy stężeniami manganu odnotowano dla lat 2009 i 2010. Zauważono tendencję wzrostową badanego pierwiastka o 36% ($p < 0,05$) w okresie 2009-2010 (tab. 1). Pstrągi i łososie badane przez Łuczyńską i in. (2011) zawierały wyższe stężenia manganu w mięśniach – 0,072 mg kg⁻¹ (pstrąg) i 0,081 mg kg⁻¹ (łosoś).

Bardzo istotnym składnikiem różnych białek, metaloenzymów i niektórych naturalnie występujących barwników jest miedź. Jest ważnym biochemicznie składnikiem kilku enzymów, przede wszystkim oksydazy cytochromowej, która w łańcuchu oddechowym mitochondriów aktywuje tlen i redukuje go do wody. Pierwiastek ten zawierają także oksydaza fenylowa i dysmutaza nadtlenkowa, które wychwytyją i unieszkodliwiają rodniki nadtlenkowe

TABELA 1

Różnice istotne statystycznie pomiędzy stężeniami miedzi stwierdzono dla lat 2009 i 2010 oraz 2009 i 2011. W tkance mięśniowej młodocianych osobników troci wędrownej w okresie 2009-2010 oraz 2009-2011 zaobserwowano wzrost stężenia miedzi odpowiednio o 49% ($p < 0,05$) i 77% ($p < 0,05$) (tab. 1). Prze-

prowadzone badania poziomu miedzi są w zgodności z danymi innych autorów. Według badań Řehulka (2002), zawartość miedzi w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego wynosiła 0,360 mg kg⁻¹. Podobne wyniki poziomu miedzi w mięśniach pstrąga tęczowego (0,54 mg kg⁻¹) uzyskała Drąg-Kozak i in. (2011). Kolejnym badanym mikroelementem był cynk. Cynk jest niezbędny do prawidłowego wzrostu i reprodukcji. Ma korzystny wpływ na proces regeneracji tkanek i gojenie ran (Cai i in. 2005). Jest składnikiem niektórych enzymów występujących w tkankach zwierzęcych, takich jak dehydrogenazy alkoholowej, fosfatazy zasadowej, anhidrazy węglowej, prokarboksypeptydazy i dysmutazy nadtlenkowej (Chimienti i in. 2003). Zmagazynowany jest w komórkach w postaci metaloproteiny zwanej metalotioneiną, która wiąże np. miedź. Narybek jest bardzo wrażliwy na działanie soli cynku. Ryby wchłaniają związki cynku przez przewód pokarmowy, a następnie kumulują je w wątrobie. W wodach lekko kwaśnych i miękkich bardzo wzrasta toksyczność tego pierwiastka. Wodorotlenek cynku [Zn(OH)₂] osadza się na skrzelach, przez co utrudnia lub uniemożliwia oddychanie rybom i powoduje ich śnięcie (Paluch 1973).

Najwyższy poziom cynku w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej bytujących w dorzeczech Słupi (7,11 mg kg⁻¹) stwierdzono w 2010 roku, natomiast najniższy (2,28 mg kg⁻¹) – w 2009. Różnice istotne statystycznie pomiędzy stężeniami cynku stwierdzono dla lat 2009 i 2010, 2010 i 2011 oraz 2009 i 2011. Zaobserwowano bardzo wysoki wzrost stężenia cynku w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej (o 212%, $p < 0,05$) w 2010 w stosunku do roku 2009. Natomiast zmniejszenie stężenia badanego pierwiastka w tkance mięśniowej smoltów o 19% ($p < 0,05$) zanotowano w 2011 w stosunku do roku 2010 (tab. 1). Podobne wyniki uzyskali Čelechovska i in. (2007) w tkance mięśniowej karpi (5,3 mg kg⁻¹) oraz Łuczyńska i in. (2000a,

b, 2011) w przypadku pstrąga (3,34-4,99 mg kg⁻¹) i łososia (2,80-4,02 mg kg⁻¹).

Żelazo występuje w wodach naturalnych w postaci wodorotlenków, siarczanów i kwaśnych węglanów, a także w kompleksach sorpcyjnych oraz w połączeniach organicznych. W wodach o odczynie obojętnym sole żelazowe pod wpływem tlenu utleniają się na sole żelazowe (Podolecki i in. 2009). Rola żelaza w organizmie jest związana z procesami oddychania komórkowego (Beaumont i Delaby 2009). Porfiryne związki żelaza (grupy hemowe) są istotnymi składnikami hemoglobiny, mioglobiny, cytochromów oraz enzymów katalazy i peroksydazy. Pozostała część żelaza w organizmie (żelaza niehemowe) jest prawie wyłącznie związana z białkami (Cairo i Recalcati 2007). Wśród nich występują wewnątrzkomórkowe żelazoflawoproteiny (dehydrogenaza zredukowanego NAD i dehydrogenaza bursztynianowa) i białka siarkowo-żelazowe łańcucha oddechowego (Beaumont i Delaby 2009). Funkcja żelaza w przemianach metabolicznych wynika z jego własności chemicznych. Występuje ono na dwóch stanach utlenienia, w postaci jonów Fe²⁺ i Fe³⁺, dzięki czemu może być akceptorem i donorem elektronów (Silva i Faustino 2015). Regulując transkrypcję kilku genów jony żelaza wpływają na cykl komórkowy (Cairo i Recalcati 2007). Poprzez swoją reaktywność i duży potencjał oksydacyjny żelazo może mieć negatywny wpływ na organizm poprzez katalizowanie reakcji tworzenia wolnych rodników (Beaumont i Delaby 2009). W reakcji Habera-Weissa powstaje rodnik hydroksylowy, który może reagować z DNA oraz lipidami i, w konsekwencji, może być przyczyną wielu chorób (Cairo i Recalcati 2007, Podolecki i in. 2009, Beaumont i Delaby 2009, Silva i Faustino 2015).

Przeprowadzone badania wykazały, że najwyższe stężenie żelaza odnotowano w 2011 roku (7,52 mg kg⁻¹). Statystycznie istotne różnice stężeń żelaza wykazano dla lat 2009 i 2011 oraz 2010 i 2011. Zaobserwowano zmniejszenie stężenia żelaza w tkance mięśniowej o 31% ($p < 0,05$) w grupie badanych ryb z roku 2010 w stosunku do roku 2009 oraz wzrost o 114% ($p < 0,05$) w roku 2011 w stosunku do roku 2010 (tab. 1).

W wodach powierzchniowych wapń występuje pod postacią rozpuszczonego węglanu wapnia, a jego zawartość jest uzależniona od obecności dwutlenku węgla w wodzie. Źródłem Ca²⁺ w wodach słodkich są przede wszystkim wapień, pokłady kredowe. Wapń jest składnikiem, który wraz z magnezem, wodorowęglanami i siarczanami, decyduje o typie hydrochemicznym większości wód krążących w zlewniach strefy młodoglacjalnej, a jego duża zawartość w wodach powierzchniowych wynika przede wszystkim z intensywnego wypłukiwania go z gleb (Paluch 1973). Pierwiastek ten wchodzi w skład enzymów biorących udział w reakcjach biochemicznych dostar-

czających energii i zwalczających stres oksydacyjny (Saris i Carafoli 2005, Brini i in. 2013).

W 2009 i 2011 roku, stężenie wapnia w tkance mięśniowej młodocianych osobników troci wędrownej było na zbliżonym poziomie (tab. 1). Różnice istotne statystycznie stężeń wapnia odnotowano dla lat 2010 i 2011. Zaobserwowano zmniejszenie stężenia wapnia w tkance mięśniowej o 31% ($p < 0,05$) w grupie badanych ryb z roku 2011 w stosunku do roku 2010.

Związki magnezu w wodach pochodzą przede wszystkim z procesów rozpuszczania minerałów, takich jak dolomity czy magnezyty. Zmiana stężeń magnezu w wodach powierzchniowych jest związana m.in. z obecnością w wodzie substancji humusowych. Substancje te mogą występować w formie rozpuszczonej lub koloidalnej, tworząc kompleksy magnezowo-humusowe. Zdolność wiązania kationów magnezu przez substancje humusowe zależy w dużej mierze od odczynu (pH), a co za tym idzie również od stopnia dysocjacji grup funkcyjnych (Paluch 1973). W mięśniach i innych tkankach jony Mg²⁺ działają prawdopodobnie jako aktywatory licznych enzymów transportujących grupy fosforanowe. Pierwiastek ten zmniejsza przepuszczalność błon komórkowych oraz warunkuje prawidłowe funkcjonowanie układu mięśniowego i nerwowego (Bourre 2006). W miarę stopnia mineralizacji wód udział procentowy jonów magnezu zwiększa się z uwagi na większą rozpuszczalność jego soli (Paluch 1973).

Z przeprowadzonych badań wynika, że w tkance mięśniowej badanych smoltów zaobserwowano wzrost poziomu magnezu w 2010 roku oraz spadek stężenia badanego pierwiastka w 2011 roku. Różnice istotne statystycznie stężeń magnezu uzyskano dla lat 2009 i 2010 oraz 2009 i 2011. Zaobserwowano wzrost stężenia magnezu w tkance mięśniowej o 114% ($p < 0,05$) w grupie badanych ryb z roku 2010 w stosunku do roku 2009, a następnie zmniejszenie o 17% ($p < 0,05$) w roku 2011 w stosunku do roku 2010 (tab. 1).

Uzyskane wyniki są porównywalne z danymi innych autorów (Łuczyńska i in. 2000a, b, 2011). Przykładowo stężenie magnezu w tkance mięśniowej pstrąga kształtowało się na poziomie 21,9-26,4 mg 100 g⁻¹, a u łososia – 22,1-24,5 mg 100 g⁻¹. Natomiast w przypadku wapnia: 7,6-10,3 mg 100 g⁻¹ i 10,0-16,5 mg 100 g⁻¹ odpowiednio.

Do najczęściej oznaczanych markerów stresu oksydacyjnego u ryb należą m.in. grupy aldehydowe i karbonylowe oksydacyjnie zmienionych białek. Zmiany oksydacyjne w białkach są nieodłącznym efektem tlenowego metabolizmu komórkowego (Berlett i Stadtman 1997, Stadtman i in. 2003). Gromadzenie się utlenionych produktów białkowych prowadzi do uszkodzeń, takich jak: fragmentacja, modyfikacja reszt aminokwasowych oraz agregacji (Balcerczyk i Bartosz 2003). W konsekwencji tych procesów możliwa jest utrata biologicznej funkcji białka. Oksydacyjne modyfikacje białek zachodzą na skutek stresu oksydacyjnego,

który może się pojawić w komórkach podczas zaburzenia procesów fizjologicznych, w wyniku działania czynników zewnętrznych, takich jak promieniowanie jonizujące, ultradźwięki, ksenobiotyki (Berlett i Stadtman 1997, Bartosz 2003, Stadtman i in. 2003). Głównymi utleniaczami w organizmie są: reaktywne formy tlenu (ROS) – anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy, rodniki nadtlenkowe oraz reaktywne formy azotu (RNS) – tlenek azotu, nadtlenoazotyn (Rodacka i in. 2014).

W tabeli 2 przedstawiono dynamikę zmian poziomu TBARS oraz aldehydowych i ketonowych pochodnych w tkance mięśniowej smoltów bytujących w dopływach Słupi.

TABELA 2

Stężenie markerów stresu oksydacyjnego w tkance mięśniowej smoltów troci wędrowniej (*Salmo trutta m. trutta* L.) bytujących w dorzeczach Słupi w latach 2009, 2010 i 2011, M±m

Lata/Markery	2009	2010	2011
TBARS, nmol mg ⁻¹ białka	52,65±2,80	54,20±3,63	49,48±2,62
Aldehydowe pochodne OMB, nmol mg ⁻¹ białka	35,20±1,78 ^a	21,34±0,29 ^{ab}	28,43±0,44 ^b
Ketonowe pochodne OMB, nmol mg ⁻¹ białka	47,37±1,33 ^{ac}	29,91±0,53 ^{ab}	37,37±0,43 ^{bc}

^a zmiany statystycznie istotne ($p < 0,05$) między wartościami z 2009 i 2010 roku;

^b zmiany statystycznie istotne ($p < 0,05$) między wartościami z 2010 i 2011 roku;

^c zmiany statystycznie istotne ($p < 0,05$) między wartościami z 2009 i 2011 roku.

Najwyższy poziom aldehydowych pochodnych odnotowano w 2009 roku (35,20 nmol mg⁻¹ białka) w porównaniu do pozostałych lat. Różnice istotne statystycznie wykazano dla lat 2009 i 2010, 2010 i 2011 oraz 2009 i 2010. Od roku 2009 do 2010 zaobserwowano znaczny spadek poziomu aldehydowych pochodnych o 65% ($p < 0,05$) oraz o 24% ($p < 0,05$) w stosunku do roku 2011. Sytuację analogiczną jak w przypadku aldehydowych pochodnych odnotowano dla poziomu ketonowych pochodnych. Najwyższy poziom ketonowych pochodnych odnotowano w 2009 roku (47,37 nmol mg⁻¹ białka) w porównaniu do pozostałych lat. Różnice istotne statystycznie wykazano dla lat 2009 i 2010, 2009 i 2011 oraz 2010 i 2011. W dynamice lat 2009-2011 zaobserwowano znaczny spadek poziomu ketonowych pochodnych o 58% ($p < 0,05$) w 2010 r i o 27% ($p < 0,05$) w roku 2011 w stosunku do roku 2009 (tab. 2).

Peroksydacja lipidów stanowi jeden z głównych mechanizmów, który pokazuje szkodliwe działanie reaktywnych form tlenu na organizm poprzez szereg patologicznych zmian. Końcowym produktem peroksydacji lipidów mogą być aldehydy i hydroksyaldehydy, które powstają w wyniku rozpadu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych do kilkunastowęglowych fragmentów (Sakharov i in. 2005). Produkty peroksydacji lipidów są związkami cytotoksycznymi, działają mutagennie i kancerogennie (Nidernhofer i in. 2003). Związki te modyfikują właściwości fizyczne błon komórkowych, zwiększając przepuszczalność błon dla jonów H⁺ i innych polarnych

substancji. Mogą także hamować aktywność niektórych enzymów błonowych i białek transportujących (Griffiths i in. 2002). Reakcje oksydacyjne, które zachodzą w błonie komórkowej odgrywają szczególną rolę, ponieważ prowadzą do osłabienia interakcji pomiędzy białkami i lipidami, modyfikacji i fragmentacji białek błonowych oraz utraty zaburzenia integralności błony (Grosicka-Maciąg 2011).

Średni poziom TBARS w tkance mięśniowej troci wędrowniej w 2009 roku wynosił 52,65 nmol mg⁻¹ białka, w 2010 roku – 54,20 nmol mg⁻¹, a w 2011 roku – 49,48 nmol mg⁻¹. Przeprowadzone badania pokazują, że poziom TBARS w badanych grupach ryb w dynamice lat 2009-2011 kształtował się na zbliżonym poziomie. Jednak nie zanotowano zmian statystycznie istotnych (tab. 1).

Wiele badań naukowych dotyczących stresu oksydacyjnego wykazało podwyższone stężenie markerów w warunkach zanieczyszczonego środowiska. Potwierdzają to badania Kaya i Akbulut (2015) przeprowadzone na tkance mózgowej i skrzelach tilapii w Mozambiku narażonych na działanie ołowiu. W tkankach tych odnotowano wysoki poziom TBARS. Wysoki poziom TBARS w wątrobie klenia (*Leuciscus cephalus*) uzyskali Hermenean i in. (2015) prowadząc badania dotyczące wpływu oddziaływania zanieczyszczonego środowiska wodnego metalami ciężkimi na organizm ryb.

W przypadku wielu enzymów włączonych w adaptację zmieniających się warunków środowiska, szczególnie ważną rolę jest odpowiedzialność za procesy bioenergetyczne (Titcomb i in. 2003, Carobene i in. 2013). Stres może zaburzyć normalną metaboliczną równowagę lub homeostazę zwierzęcia poprzez zmuszenie do realokacji energii w obrębie systemu. Każda odpowiedź lub adaptacja do stresu wymaga energii, która mogłaby być w innym wypadku wykorzystana do utrzymania normalnych funkcji organizmu takich jak wzrost, trawienie, odporność na choroby, leczenie czy reprodukcję (Barton i Iwama 1991). Na tempo metabolizmu u ryb mają wpływ hormony (np. kortyzol), warunki środowiskowe (temperatura, poziom tlenu, zasolenie), poziom aktywności ryb, wielkość organizmu (większe ryby posiadają niższy poziom metabolizmu na jednostkę wagi), wiek związany ze wzrostem i kosztem zużycia energii w celach reprodukcji, zdrowia i kondycji (Bartelme 2006). Regulacja gospodarki mineralnej ma duże znaczenie w przypadku zwierząt żyjących w wodzie. Stężenie soli w krwi ryb słodkowodnych jest znacznie większe niż w ich otoczeniu; w przypadku ryb morskich jest odwrotnie (Solomon i in. 1996).

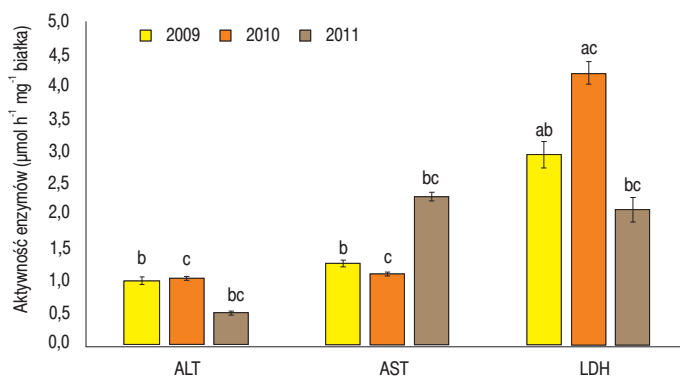
ALT jest enzymem wskaźnikowym pochodzenia cytoplazmatycznego. Katalizuje reakcję przeniesienia grupy aminowej z L-alaniny na L-ketoglutaran, a produktami tej reakcji są L-glutaminian i pirogronian. Miarą aktywności aminotransferazy alaninowej jest przyrost ilości pirogronianu, który z 2,4-dinitrofenylohydrazyną tworzy w środowi-

sku zasadowym fenylolhyrazon o barwie brunatnoczerwonej. Natężenie barwy jest wprost proporcjonalne do aktywności enzymu (Ktyszejko-Stefanowicz 2005).

ALT jest enzymem wskaźnikowym pochodzenia cytoplazmatyczno-mitochondrialnego. Katalizuje transfer grupy aminowej kwasu asparaginowego do kwasu alfa-ketoglutarowego, co przyczynia się do powstania kwasu asparaginowego i kwasu glutaminowego (Carobene i in. 2013). Aminotransferaza ta wymaga fosforanu-5-pirydoksalu (P5P) jako niezbędnego kofaktora w celu osiągnięcia maksymalnej aktywności enzymu. Enzym ten znajduje się głównie w cytoplazmie komórek i mitochondriach oraz komórkach nabłonka nerek i mózgu. AST nie jest enzymem charakterystycznym dla jednego organu (Titcomb i in. 2003). Największe stężenie tego enzymu występuje w mięśniach szkieletowych, wątrobie oraz mięśniu sercowym. Zwiększenie stężenia izoenzymu AST może powstać na skutek delikatnego uszkodzenia komórek wątroby (Ktyszejko-Stefanowicz 2005). Uwolnienie AST znajdującego się w mitochondriach następuje wtedy, gdy dojdzie do poważniejszego uszkodzenia wątroby (Carobene i in. 2013). Kiedy enzym ten pojawi się we krwi, oznacza to, iż doszło do uszkodzenia komórki, w której się znajdował, dlatego jest on nazywany enzymem wskaźnikowym. Uszkodzenie mięjszu wątrobowego przez czynnik zakaźny lub toksyczny skutkuje wzrostem aktywności obydwu aminotransferaz w osoczu nawet do 20-50 razy, powyżej normy. Wzrost tych aktywności jest proporcjonalny do stopnia i rozległości uszkodzenia danego narządu (Murray i in. 1995).

Dehydrogenazy katalizują odłączenie atomów wodoru od utlenionego substratu, a następnie są one przenoszone na inne enzymy lub związki pośrednie, jednak nie mają zdolności bezpośredniego przenoszenia elektronów na tlen. Dehydrogenazy różnią się rodzajem koenzymu, czyli właściwego akceptora atomów wodoru (może to być NAD^+ , $NADPH^+$, FMN, FAD). Związki te są specyficzne zarówno względem substratów, jak i koenzymów. Dehydrogenazy takie jak aldehyd 3-fosfoglicerynowy, 2-glicerofosforan, mleczan, jabłczan, 3-hydroksymaślan, glutamian-współpracują z NAD^+ , z kolei glukozo-6-fosforan, izocytrynian z $NADP^+$. Do dehydrogenaz które nie potrzebują udziału NAD^+ i $NADP^+$ zaliczamy bursztynian, dehydrogenazę 2-glicerofosforanu, pirogronianu czy 2-oksoglutaranu (Filipowicz i Więckowski 1979).

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) jest enzymem, który katalizuje konwersję mleczanu do pirogronianu w obecności związku NAD^+ i odwrotnie – pirogronian do mleczanu w obecności $NADH^+$. Jest to enzym występujący we wszystkich komórkach oraz płynach ustrojowych (Murray i in. 1995). Dehydrogenaza mleczanowa, uczestniczy w przemianie aminokwasów i węglowodanów. Duże stężenie LDH odnotowuje się w mięśniach szkieletowych, wątro-



Rys. 3. Aktywność enzymów przemian metabolicznych w tkance mięśniowej smoltów troci wędrowniej (*Salmo trutta m. trutta* L.) bytujących w dorzeczach Słupii w latach 2009, 2010 i 2011, $M \pm m$. ^a zmiany statystycznie istotne ($p < 0,05$) między wartościami z 2009 i 2010 roku; ^b zmiany statystycznie istotne ($p < 0,05$) między wartościami z 2010 i 2011 roku; ^c zmiany statystycznie istotne ($p < 0,05$) między wartościami z 2009 i 2011 roku.

bie, a także w mózgu. Wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej obserwuje się we wszystkich stanach chorobowych, które przebiegają z martwicą tkanek. Aktywność enzymu wzrasta w ostrym uszkodzeniu mięśnia sercowego, krwinek czerwonych, nerek, a także mięśni szkieletowych, wątroby, płuc oraz w uszkodzeniach skóry (Szutowicz i Raszei-Szpecht 2009).

Aktywność enzymów przemian metabolicznych w tkance mięśniowej smoltów troci wędrowniej zasiedlających Słupię przedstawiono na rys. 3.

Najwyższą aktywność aminotransaminazy alaninowej odnotowano w 2010 roku ($1,034 \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ białka). Zmiany istotne statystycznie wykazano dla aktywności ALT z lat 2009 i 2011 oraz 2010 i 2011. W dynamice lat 2009-2011 zaobserwowano wzrost aktywności o 4% ($p < 0,05$) w 2010 roku, a następnie spadek o 109% ($p < 0,05$) w roku 2011 w stosunku do roku 2010. Najwyższą aktywność transaminazy asparaginowej ($2,293 \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ białka) odnotowano w 2011 roku. Zmiany istotne statystycznie odnotowano dla lat 2009 i 2011 oraz 2010 i 2011. Zaobserwowano wzrost aktywności tego enzymu w 2011 roku o 109% ($p < 0,05$) w stosunku do roku 2010 oraz o 81% ($p < 0,05$) w stosunku do roku 2009 (rys. 3).

Z dostępnej literatury (Renaud i Moon 1980, Foster i Moon 1991, Treberg i in. 2003) wynika, że ryby wykazują nadzwyczajne zdolności do utylizacji białek i aminokwasów w celu wyprodukowania energii. Aminotransferaza alaninowa została uznana za wrażliwy i kluczowy enzym pod tym względem. Dostarcza ona podłoża dla transferu jabłczanu i asparagianu, a reakcja ta staje się narzędziem w transporcie kluczowych metabolitów przez membranę mitochondrialną, a co za tym idzie przekazuje alaninę do głównych dróg metabolicznych (Renaud i Moon 1980, Foster i Moon 1991, Treberg i in. 2003). Jak wynika z przeprowadzonych badań, zmiany w kluczowych enzymach metabolicznych (aminotransferaza alaninowa i asparagi-

nowa) odgrywają zasadniczą rolę w mediacji metabolicznych zmian adaptacyjnych zarówno pod wpływem czynników zewnętrznych, jak i wewnętrznych.

Uzyskane wyniki są porównywalne z danymi innych autorów (DiBattista i in. 2006). Przykładowo, u pstrąga tęczowego aktywność aminotransferazy alaninowej wynosiła $(2,08 \pm 0,17) \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ białka, natomiast aminotransferazy asparaginowej – $(2,47 \pm 0,27) \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ białka. Z badań Srivastava i in. (2004) wynika, że aminotransferaza alaninowa wykazuje znaczące zmiany zarówno pod wpływem czynników środowiskowych, jak i kompozycji diety.

Według Tiwari i Singh (2006), spadek glikogenu powoduje wzrost zapotrzebowania na karbohydraty w celu utrzymania na odpowiednim poziomie cyklu glikolitycznego i cyklu Krebsa, tak aby móc poradzić sobie z zapotrzebowaniem na energię w warunkach stresowych. Zwiększenie w takiej sytuacji poziomu aminokwasów powoduje wzrost aktywności aminotransferazy alaninowej i asparaginowej w celu sprostania wciąż rosnącemu zapotrzebowaniu na energię (Tiwari i Singh 2006).

Przeprowadzone badania pokazują (rys. 3), że najwyższą aktywność dehydrogenazy mleczanowej w tkance mięśniowej troci wędrowniej zanotowano w 2010 roku, natomiast w 2009 i 2011 powyższa aktywność była na zbliżonym poziomie. Zmiany statystycznie istotne wykazano dla lat 2009 i 2010, 2010 i 2011 oraz 2009 i 2011. Zaobserwowano wzrost dehydrogenazy mleczanowej o 43% ($p < 0,05$) w 2010 roku w stosunku do 2009, a następnie spadek aktywności o 101% ($p < 0,05$) w 2011 roku w stosunku do 2010.

Kumar i in. (2010) udowodnili, że zwiększona ilość skrobi żelowanej w diecie staje się mediatorem wywołującym stres metaboliczny. W myśl tej teorii wyższa aktywność LDH świadczy o zwiększonej produkcji mleczanu w warunkach stresu (Coppes 1992, Tripathi 1993). Udowodniono, że w sytuacji, kiedy w wodzie występuje zmniejszona ilość tlenu, metabolizm tlenowy nie może sprostać zapotrzebowaniu na energię i wiele ryb reaguje zwiększając produkcję energii poprzez przeprowadzenie beztlenowego metabolizmu węglowodanów (Van den Thillart i von Waarde 1985, Virani i Rees 2000).

Z danych literaturowych wynika, że u wielu gatunków beztlenowy metabolizm jest powiązany z enzymatycznymi zmianami odzwierciedlającymi reorganizację zdolności metabolicznej tkanek. Na przykład, ekspozycja na niedotlenie u *Fundulus heteroclitus* prowadzi do zwiększenia aktywności LDH (Rees i in. 2009), a u amazońskich pielęgnic niedotlenie prowadzi do zmian w kompozycji tkanek z izoenzymami LDH (Almeida-Val i in. 1995).

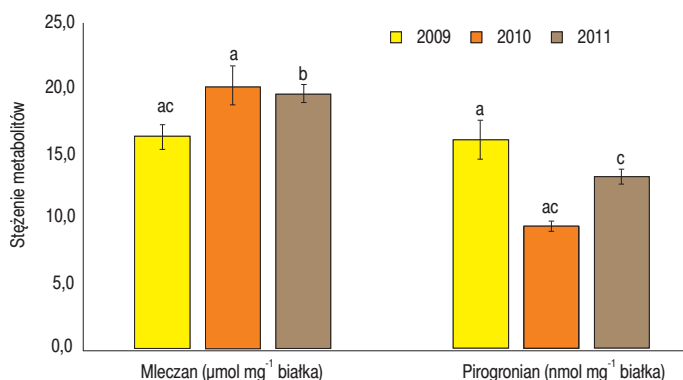
Mleczan jest końcowym produktem glikolizy zachodzącej w warunkach beztlenowych lub zachodzącej w komórkach niezdolnych do utleniania

pirogronianu. Mleczan z komórek mięśniowych usuwany jest do krwi, a następnie wychwytywany przez wątrobę. W mięśniu w wyniku glikolizy powstaje pirogronian, który zredukowany jest do mleczanu. Mleczan poprzez krew dostaje się do wątroby, gdzie może posłużyć jako substrat glukoneogeny w wyniku działania dehydrogenazy mleczanowej, która katalizuje odwracalną reakcję mleczanu. Mleczan może być powrotnie przekształcony w pirogronian, który przekształca się w glukozę na szlaku glukoneogenezy. Mleczan produkowany jest w sposób ciągły z glukozy w glikolizie beztlenowej w erytrocytach, siatkówce, rdzeniu nerki. W procesie cyklu Cori mleczan jest przekształcany w glukozę. Mleczan wędruje do wątroby i jest metabolizowany do glukozy przez glukoneogenezę (Karlson 1987, Basaglia 1989).

Pirogronian jest przekształcany w aldehyd octowy (dekarboksylaza pirogronianowa), a następnie w etanol. W warunkach tlenowych powstający pirogronian jest przekształcony w acetylo-koenzym A przez dehydrogenazę pirogronianową. Acetylo-CoA wchodzi w cykl kwasu cytrynowego. Przy wysokim poziomie energii w komórce (nadmiar ATP) intensywność cyklu kwasu cytrynowego maleje i dochodzi do kumulacji acetylo-CoA. Wówczas acetylo-CoA może być zużyty do syntezy kwasów tłuszczowych lub do syntezy ciał ketonowych (Basaglia 1989).

Stężenie metabolitów przemian metabolicznych w tkance mięśniowej smoltów troci wędrowniej bytujących w dorzeczach Słupi w dynamice lat 2009-2011 przedstawiono na rys. 4.

Najniższy poziom mleczanu uzyskano w 2009 roku ($14,99 \mu\text{mol mg}^{-1}$ białka), natomiast w latach 2010 i 2011 stężenie mleczanu było porównywalne. Zmiany istotne statystycznie wykazano dla lat 2009 i 2010 oraz 2009 i 2011. Z przeprowadzonych badań wynika, że nastąpił wzrost stężenia mleczanu o 24% ($p < 0,05$) w 2010 roku oraz o 21% ($p < 0,05$) w 2011 roku w stosunku do roku 2009 (rys. 4).



Rys. 4. Stężenie metabolitów przemian metabolicznych w tkance mięśniowej smoltów troci wędrowniej (*Salmo trutta m. trutta* L.) bytujących w dorzeczach Słupi w latach 2009, 2010 i 2011, $M \pm m$. ^a zmiany statystycznie istotne ($p < 0,05$) między wartościami z 2009 i 2010 roku; ^b zmiany statystycznie istotne ($p < 0,05$) między wartościami z 2010 i 2011 roku; ^c zmiany statystycznie istotne ($p < 0,05$) między wartościami z 2009 i 2011 roku.

Najwyższe stężenie pirogronianu uzyskano w 2009 roku ($14,83 \text{ nmol mg}^{-1}$ białka). Zmiany istotne statystycznie wykazano dla lat 2009 i 2010 oraz 2010 i 2011. Z przeprowadzonych badań wynika, że w 2010 roku nastąpił spadek stężenia pirogronianu o 71% ($p < 0,05$) w stosunku do roku 2009. Natomiast w 2011 roku zaobserwowano wzrost stężenia o 71% ($p < 0,05$) w stosunku do roku 2010 (rys. 4).

Wnioski

Analiza zawartości mikro- i makroelementów (Mn, Cu, Zn, Fe, Ca, Mg) oraz markerów stresu oksydacyjnego w tkance mięśniowej smoltów troci wędrównej w dynamice lat 2009-2011, określonej poprzez markery peroksydacji lipidów i oksydacyjnej modyfikacji białek, stężenie mleczanu i pirogronianu oraz aktywność enzymów przemian metabolicznych (ALT i AST oraz dehydrogenaza mleczanowa), pozwoliła na sformułowanie następujących wniosków:

1. Najwyższe stężenie manganu, miedzi oraz żelaza w tkance mięśniowej smoltów odnotowano w 2011 r., natomiast cynku, wapnia i magnezu – w 2010 roku.
2. Wysokie stężenie pierwiastków, m.in. Mn, Cu, Zn, Fe, Ca, Mg w tkance mięśniowej smoltów troci zwiększa poziom markerów stresu oksydacyjnego (dialdehydu malonowego oraz aldehydowych i ketonowych pochodnych oksydacyjnie zmodyfikowanych białek). Wysokie stężenie pierwiastków o zmiennej wartościowości może indukować zmiany prooksydacyjne.
3. Poziom reaktywnych substancji reagujących z kwasem 2-tiobarbiturowym w tkance mięśniowej smoltów troci wędrównej w dynamice lat 2009-2011 był na zbliżonym poziomie. Najwyższy poziom zarówno aldehydowych, jak i ketonowych pochodnych oksydacyjnie zmodyfikowanych białek w tkance mięśniowej smoltów troci wędrównej uzyskano w 2009 r., natomiast w 2010 r. zanotowano tendencję spadkową, po czym w roku 2011 – ponowny wzrost.
4. Aktywność enzymów przemian metabolicznych (aminotransferazy alaninowej i asparaginowej) w dynamice lat 2009-2010 była na zbliżonym poziomie. W przypadku aminotransferazy alaninowej w roku 2011 nastąpił spadek aktywności, a w przypadku aminotransferazy asparaginowej – jej wzrost. Znaczący wzrost aktywności aminotransferazy asparaginowej oraz dehydrogenazy mleczanowej, które pełnią funkcję markerów stresu oksydacyjnego w latach 2009-2011 może wskazywać na fluktuacje wartości tych parametrów pod wpływem czynników zewnętrznych (zmiany środowiska bytowania ryb), jak i wewnętrznych.
5. Wysoki poziom markerów peroksydacji lipidów, ketonowych i aldehydowych pochodnych oksydacyjnej modyfikacji białek w tkance mięśniowej smoltów troci wędrów-

nej może świadczyć o pewnym stopniu zanieczyszczenia środowiska bytowania ryb, zwłaszcza w 2011 roku.

Podziękowania

Do powstania niniejszego artykułu przyczynili się: prof. dr hab. Andrzej Icha – dziekan Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Akademii Pomorskiej w Słupsku, przyznając nam Grant Wydziałowy dla Młodych Naukowców, dzięki któremu powyższe badania zostały przeprowadzone; Pan Marcin Miller, dyrektor Parku Krajobrazowego „Dolina Słupi”, i jego współpracownicy oraz Zarząd Polskiego Związku Wędkarskiego w Słupsku. Za pomoc i zaangażowanie w przeprowadzeniu badań składamy tym wszystkim osobom serdeczne podziękowania.

Literatura

- Almeida-Val V.M., Farias I.P., Silva M.N., Duncan W.P., Val A.L. 1995 – Biochemical adjustments to hypoxia by Amazon cichlids – *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28(11-12): 1257-1263.
- Balcerczyk A., Bartosz G. 2003 – Thiols are main determinants of total antioxidant capacity of cellular homogenates – *Free Radic. Res.* 37(5): 537-541.
- Bartelme D. 2006 – Metabolism, energy use and feeding behaviors in fish diseases – *Advanced Aquarists* 1: 3-26.
- Barton B.A., Iwama, G.K. 1991 – Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids – *Ann. Rev. Fish Dis.* 1: 3-26.
- Bartosz G. 2003 – Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie – Wydawnictwo Naukowe PWN (wydanie drugie zmienione), Warszawa.
- Basaglia F. 1989 – Some aspects of isozymes of lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase and glucosylphosphate isomerase in fish – *Comp. Biochem. Physiol. B* 92(2): 213-226.
- Beaumont C., Delaby C. 2009 – Recycling iron in normal and pathological states – *Semin. Hematol.* 46(4): 328-338.
- Berlett B.S., Stadtman E.R. 1997 – Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress – *J. Biol. Chem.* 272(33): 20313-20316.
- Bourre J.M. 2006 – Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brain. Part 1: micronutrients – *J. Nutr. Health Aging* 10(5): 377-385.
- Bradford M.M. 1976 – Rapid and sensitive method for the quantitation of protein using the principle of protein dye binding – *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brini M., Ottolini D., Cali T., Carafoli E. 2013 – Calcium in health and disease – *Met. Ions Life Sci.* 13: 81-137.
- Cai L., Li X.K., Song Y., Cherian M.G. 2005 – Essentiality, toxicology and chelation therapy of zinc and copper – *Curr. Med. Chem.* 12(23): 2753-2763.
- Cairo G., Recalcati S. 2007 – Iron-regulatory proteins: molecular biology and pathophysiological implications – *Expert. Rev. Mol. Med.* 9(33): 1-13.
- Carobene A., Braga F., Roraas T., Sandberg S., Bartlett W.A. 2013 – A systematic review of data on biological variation for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and γ -glutamyl transferase – *Clin. Chem. Lab. Med.* 51(10): 1997-2007.
- Chimienti F., Aouffen M., Favier A., Seve M. 2003 – Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate – *Curr. Drug Targets* 4(4): 323-338.
- Coppes Z. 1992 – Lactate dehydrogenase in teleosts. The role of LDH-C4 isozyme – *Comp. Biochem. Physiol. B* 102(4): 673-677.
- Čelechovská O., Svoobodová Z., Žlabek V., Macharacková B. 2007 – Distribution of metals in tissues of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) – *Acta Vet. Brno* 76: 93-100.
- Damek-Poprawa M., Sawicka-Kapusta K. 2004 – Histopathological changes in the liver, kidneys and testes of bank voles environmentally exposed to heavy metal emissions from the steelworks and zinc smelter in Poland – *Environ. Res.* 96(1): 72-78.
- Dębowski P., Grochowski A., Miller M., Radtke G. 2000 – Ichthyofauna dorzeża Słupi – *Rocznik Naukowy PZW* 13: 109-136.
- DiBattista J.D., Levesque H.M., Moon T.W., Gilmour K.M. 2006 – Growth depression in socially subordinate rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*

- ss: more than a fasting effect – *Physiol. Biochem. Zool.* 79(4): 675-687.
- Drąg-Kozak E., Łuszczek-Trojnar E., Popek W. 2011 – Koncentracja metali ciężkich w tkankach i organach pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) w zależności od wieku i sezonu – *Ochrona środowiska i zasobów naturalnych* 48: 161-169.
- Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A., Porotov I.G. 1995 – Oxidative modification of human serum proteins. A method of determining it – *Vopr. Med. Khim.* 41: 24-26 (in Russian, Abstract in English).
- Dźygóra W. 2009 – Środowisko-człowiek-zdrowie: wybrane problemy ekologiczne ekologiczno-zdrowotne – *Kolegium Karkonoskie, PWSZ w Jeleniej Górze*.
- Elsner R.J., Spangler J.G. 2005 – Neurotoxicity of inhaled manganese: public health danger in the shower? – *Med. Hypotheses*, 65(3): 607-616.
- Filipowicz B., Więckowski W. 1979 – *Biochemia* – Wyd. PWN, Warszawa.
- Foster G., Moon T. 1991 – Hypometabolism with fasting in yellow perch (*Perca flavescens*): a study of enzymes of hepatocytes metabolism and tissue size – *Physiol. Zool.* 64: 259-274.
- Griffiths H.R., Müller L., Bartosz G., Bast A., Bertoni-Freddari C., Collins A., Cooke M., Coolen S., Haenen G., Hoberg A.M., Loft S., Lunec J., Oliniski R., Parry J., Pompella A., Poulsen H., Verhagen H., Astley S.B. 2002 – *Biomarkers* – *Mol. Aspects Med.* 23(1-3): 101-208.
- Grosicka-Maciąg E. 2011 – Biologiczne skutki stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem pestycydów – *Postępy Hig. Med. Dośw.* 65: 357-366.
- Herasimov I., Plaksina O. 2000 – Non-enzymatic determination of lactate and pyruvate concentrations in blood simple – *Laboratorna Diagnostyka* 2: 46-48 (Article in Ukrainian, Abstract in English).
- Hermenean A., Damache G., Albu P., Ardelean A., Ardelean G., Puiu Ardelean D., Horge M., Nagy T., Braun M., Zsuga M., Kéki S., Costache M., Dinischiotu A. 2015 – Histopathological alterations and oxidative stress in liver and kidney of *Leuciscus cephalus* following exposure to heavy metals in the Tur River, North Western Romania – *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 119: 198-205.
- Hudnell H.K. 1999 – Effects from environmental Mn exposures: a review of the evidence from non-occupational exposure studies – *Neurotoxicology*, 20(2-3): 379-397.
- Hussain M., Muhammad S., Malik R.N., Khan M.U., Farooq U. 2014 – Status of heavy metal residues in fish species of Pakistan – *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 230: 111-132.
- Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B.B., Beeregowda K.N. 2014 – Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals – *Interdiscip. Toxicol.*, 7(2): 60-72.
- Järup L. 2003 – Hazards of heavy metal contamination – *Br. Med. Bull.*, 68: 167-182.
- Jomova K., Valko M. 2011 – Advances in metal-induced oxidative stress and human disease – *Toxicology* 283(2-3): 65-87.
- Kamyschnikov V.S. 2004 – Reference book on clinic and biochemical researches and laboratory diagnostics – *MEDpress-inform, Moscow* (In Russian).
- Karlon P. 1987 – *Zarys biochemii* – Wyd. PWN, Warszawa.
- Kaya H., Akbulut M. 2015 – Effects of Waterborne Lead Exposure in Mozambique Tilapia: Oxidative Stress, Osmoregulatory Responses, and Tissue Accumulation – *J. Aquat. Anim. Health* 27(2): 77-87.
- Kłyszczko-Stefanowicz L. 2005 – *Ćwiczenia z biochemii* – Wyd. PWN, Warszawa, 521, 765.
- Kuczynska A., Wolska L., Namieśnik J. 2003 – Zastosowanie biotestów w badaniach środowiskowych – W: *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*. CEAM, Gdańsk.
- Kumar V., Sahu N.P., Pal A.K., Kumar S., Sinha A.K., Ranjan J., Baruah K. 2010 – Modulation of key enzymes of glycolysis, gluconeogenesis, amino acid catabolism, and TCA cycle of the tropical freshwater fish *Labeo rohita* fed gelatinized and non-gelatinized starch diet – *Fish Physiol. Biochem.* 36(3): 491-499.
- Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amic A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. 1990 – Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins – *Methods Enzymol.* 186: 464-478.
- Łuczzyńska J., Jaworski J., Markiewicz K. 2000a – Wybrane metale w tkance mięśniowej ryb z jeziora Łańskiego – *Komun. Ryb.* 3: 22-25.
- Łuczzyńska J., Jaworski J., Markiewicz K. 2000b – Wybrane metale w tkance mięśniowej ryb z jezior mazurskich – *Komun. Ryb.* 4: 22-25.
- Łuczzyńska J., Tońska E., Borejszo Z. 2011 – Zawartość makro- i mikroelementów oraz kwasów tłuszczowych w mięśniach łososia (*Salmo salar* L.), pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss* Walb.) i karpia (*Cyprinus carpio* L.) – *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 3(76): 162-172.
- Menezes-Filho J.A., Bouchard M., Sarcinelli Pde N., Moreira J.C. 2009 – Manganese exposure and the neuropsychological effect on children and adolescents: a review – *Rev. Panam. Salud. Publica*, 26(6): 541-548.
- Mielżyńska D. 2000 – Narażenie na substancje o działaniu rakotwórczym. Biomarkery narażenia. Ocena środowiskowego ryzyka zdrowotnego, zarządzanie i nadzór nad ryzykiem oraz komunikacja o ryzyku – Szkolenie zorganizowane w ramach Krajowego Programu Działań na Rzecz Środowiska i Zdrowia, Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Sosnowiec, 11-12 grudnia 2000 roku.
- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. 1995 – *Biochemia Harpera* – Wydanie III, (Red. nauk.) F. Kokot, Wyd. Lek. PZWL, S. 913, 917-918.
- Nidernhofer L.J., Daniels J.S., Rauzer C.A., Greene R.E., Marnett L.J. 2003 – Malonaldehyde, a product of lipid peroxidation is mutagenic in human cells – *J. Biol. Chem.* 278: 31426-31433.
- Opuszyński K. 1983 – *Podstawy biologii ryb* – Wyd. PWRiL, Warszawa.
- Pagenkopf G.K. 1983 – Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: Role of complexation, pH, and water hardness – *Environ. Sci. Technol.* 17: 342-347.
- Paluch J. 1973 – *Mikrobiologia wód* – Wyd. PWN, Warszawa.
- Patczyńska-Guguła K., Tkachenko H., Kurhaluk N. 2014a – Młodziociane osobniki troci wędrowniej (*Salmo trutta* L.) jako bioindykatory czystości wód dorzecza Stupi – W: *Praca zbiorowa "Globalizacja a problematyka ochrony środowiska"*, (Red. nauk.) T. Noch, J. Sączuk, A. Wesółowska. Wydawnictwo Gdańskiej Wyższej Szkoły Administracji, Gdańsk, 379-408.
- Patczyńska-Guguła K., Tkachenko H., Kurhaluk N. 2014b – Zmiany bioakumulacji pierwiastków i markerów stresu oksydacyjnego w tkance mięśniowej smoltów troci wędrowniej (*Salmo trutta* L.) w latach 2009-2011 – *Słupskie Prace Biologiczne* 11: 149-172.
- Podolecki T., Wasilewski J., Poloński L. 2009 – Potencjalna rola żelaza w etiopatogenezie choroby wieńcowej – *Choroby Serca i Naczyni* 6(4): 180-183.
- Rakowska J., Radwan K., Ślosarz Z., Pietraszek E., Łudzik M. 2012 – Usuwanie substancji ropopochodnych z dróg i gruntów – *CNBOP-BIP*.
- Rees B.B., Figueroa Y.G., Wiese T.E., Beckman B.S., Schulte P.M. 2009 – A novel hypoxia-response element in the lactate dehydrogenase-B gene of the killifish *Fundulus heteroclitus* – *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 154(1): 70-77.
- Reitman S., Frankel S. 1967 – A colorimetric method for the determination of serum GOT and GPT – *Am. J. Clin. Pathol.* 28: 56-63.
- Renard J., Moon T. 1980 – Starvation and metabolism of hepatocytes isolated from the American eel *Anguilla rostrata* – *J. Comp. Physiol.* 135: 127-137.
- Ritter L., Solomon K., Sibley P., Hall K., Keen P., Mattu G., Linton B. 2002 – Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry – *J. Toxicol. Environ. Health A*, 65(1): 1-142.
- Rodacka A., Gerson J., Puchała M. 2014 – Biologiczne znaczenie oksydacyjnych modyfikacji reszt cysteinowych w białkach na przykładzie dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego – *Postępy Hig. Med. Dośw.* 68: 280-290.
- Řehulka J. 2002 – Content of inorganic and organic pollutants in the fish from the Slezská Harta reservoir – *Czech J. Anim. Sci.* 1(47): 30-44.
- Sakharov D.V., Elstak E.D., Chernyak B., Wirtz K.W. 2005 – Prolonged lipid oxidation after photodynamic treatment. Study with oxidation-sensitive probe C11-BODIPY581/591 – *FEBS Lett.* 579(5): 1255-1260.
- Saris N.E., Carafoli E. 2005 – A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria – *Biochemistry (Mosc.)*, 70(2): 187-194.
- Sarkar A., Ray D., Shrivastava A.N., Sarker S. 2006 – Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring – *Ecotoxicology*, 15(4): 333-340.
- Sevela M., Tovarek J. 1959 – A method for estimation of lactic dehydrogenase in body liquids – *J. Czech Physiol.* 98: 844-848.
- Silva B., Faustino P. 2015 – An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies – *Biochim. Biophys. Acta*, 1852(7): 1347-1359.
- Skrainowska D., Połec A., Tokarz A. 2010 – Wpływ procesów termooksydacyjnych i nowotworowych na zawartość wybranych pierwiastków w tkankach szczurów – *Bromat. Chem. Toksykol. XLIII*: 336-342.
- Solomon E. Berg L., Martin D. 1996 – *Biologia* – Oficyna Wydawnicza Multico.
- Srivastava A.S., Oohara I., Suzuki T., Shenouda S., Singh S.N., Chauhan D.P., Carrier E. 2004 – Purification and properties of cytosolic alanine aminotransferase from the liver of two freshwater fish, *Clarias batrachus* and *Labeo rohita* – *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 137(2): 197-207.

- Stadtman E.R., Moskovitz J., Levine R.L. 2003 – Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences – *Antioxid. Redox Signal.*, 5(5): 577-582.
- Starmach K., Wróbel S., Pasternak K. 1978 – *Hydrobiologia* – Wyd. PWN, Warszawa.
- Szutowicz A., Raszei-Szpecht A. 2009 – *Diagnostyka laboratoryjna*. Tom I. – Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, 62-63.
- Titcomb C.P. Jr. 2003 – Liver function tests: what is the risk? – *J. Insur. Med.*, 35(1): 26-35.
- Tiwari S., Singh A. 2006 – Biochemical stress response in freshwater fish *Channa punctatus* induced by aqueous extracts of *Euphorbia tirucalli* plant – *Chemosphere* 64(1): 36-42.
- Torres M.A., Barros M.P., Campos S.C., Pinto E., Rajamani S., Sayre R.T., Colepicolo P. 2008 – Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review – *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 71(1): 1-15
- Traczewska T. 2011 – *Biologiczne metody oceny skażenia środowiska* – Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
- Treberg J., Lewis J., Driedzic W. 2003 – Comparison of liver enzyme in osmerid fishes: key differences between a glycerol accumulating species, rainbow smelt (*Osmerus mordax*) and a species that does not accumulate glycerol, capelin (*Mallotus villosus*) – *Comp. Biochem. Physiol.* 132: 433-438.
- Tripathi G. 1993 – A review on molecular physiology of malate and lactate dehydrogenases in fishes – *Biomed. Environ. Sci.*, 6(3): 286-318.
- Van den Thillart G., Van Waarde A. 1985 – Teleosts in hypoxia: aspects of anaerobic metabolism – *Molecular Physiology* 8: 393-409.
- Virani N., Rees B. 2000 – Oxygen consumption, blood lactate and interindividual variation in the gulf killifish, *fundulus grandis*, during hypoxia and recovery – *Comparative Biochemistry and Physiology* 126: 397-405.
- Zar J.H. 1999 – *Biostatistical Analysis*, 4th ed. – Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

Przyjęto po recenzji 03.12.2015 r.

CONTENT OF MICRO- AND MACROELEMENTS AND OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN THE MUSCLE TISSUES OF MIGRATORY SEA TROUT (*SALMO TRUTTA* L.) SMOLTS CAUGHT IN TRIBUTARIES OF THE SŁUPIA IN 2009-2011

Katarzyna Pałczyńska-Guguła, Halyna Tkachenko, Natalia Kurhaluk

ABSTRACT. The aim of our study was to analyze the content of elements (concentrations of the trace elements manganese, copper, zinc, iron, and of the macronutrients calcium and magnesium), oxidative stress biomarkers (2-thiobarbituric acid reactive substances, aldehyde and ketone derivatives of oxidatively modified proteins), and biochemical indices (activities of alanine and aspartate aminotransferases, lactate dehydrogenase, lactate and pyruvate levels) in the muscle tissue of juvenile sea trout from the drainage basin of the Słupia River (Głaźna, Skotawa, Kamienna, Kwacza) in 2009-2011. The highest concentration of manganese, copper, and iron in the muscle tissue of smolts was observed in 2011, while those of zinc, calcium, and magnesium were noted in 2010. High concentrations of elements with variable valence can induce prooxidative changes and increase the level of oxidative stress in muscle tissues. The level of 2-thiobarbituric acid reactive substances in the muscle tissue of sea trout smolts remained at a similar level throughout the 2009-2011 period. The highest levels of both aldehydic and ketonic derivatives of oxidatively modified proteins in the muscle tissue of sea trout smolts were obtained in 2009, while in 2010 a downward trend was recorded, and in 2011 re-growth was noted, which may indicate a certain degree of pollution of the fish habitat in 2011. The activity of alanine (ALT) and aspartate aminotransferases (AST) throughout the 2009-2010 period was at a similar level. In 2011, a decrease of alanine aminotransferase was noted, while aspartate aminotransferase activity was increased. Statistically significant changes in ALT and AST activity were demonstrated in 2009 and 2011 as well as 2010 and 2011. The highest lactate dehydrogenase activity in the muscle tissue of brown trout was observed in 2010, while in 2009 and 2011 it was at a similar level. High levels of lipid peroxidation biomarkers, ketone and aldehyde derivatives of oxidatively modified proteins, in the muscle tissue of brown trout smolts could indicate a certain degree of pollution in the fish habitat, especially in 2011.

Keywords: sea trout, Słupia basin, bioaccumulation of elements, oxidative stress