

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
кафедра біохімії та біотехнології**

**АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ТКАНИН ЛИЧИНОК
СТЕРЛЯДІ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ПРОБІОТИКУ
LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS IMB B-7279**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 407 групи

Гудан Олександра

Олександрівна

Керівник:

к.б.н., доц. кафедри біохімії та
біотехнології Худа Л.В.

*До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № _____ від _____ 2023 р.
Зав. кафедрою _____ проф. Копильчук Г.П.*

Чернівці – 2023

Анотація

Ключові слова: антиоксидантна активність, стерлядь прісноводна, *Lactobacillus acidophilus*, супероксиддисмутаза, каталаза

Бакалаврська робота присвячена визначенню супероксиддисмутази та каталазної активності личинок стерляді прісноводної в період раннього вигодовування живим кормом з додаванням пробіотичних мікроорганізмів *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279.

Встановлено, що максимальний рівень супероксиддисмутази та каталазної активності гомогенату личинок стерляді припадає на 7у добу вигодовування наупліями артемії. Використання як живого корму артемії, інкапсульованої пробіотичними лактобактеріями *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279, призводить до зниження величини активності СОД в гомогенаті личинок стерляді через тиждень вигодовування. Застосування пробіотику супроводжується істотним зростанням рівня каталазної активності – у 1,6 рази у порівнянні з контролем та більш як в 3 рази в порівнянні зі значенням до годівлі.

Annotation

Keywords: antioxidant activity, freshwater sterlet, *Lactobacillus acidophilus*, superoxide dismutase, catalase

The bachelor's thesis is devoted to the determination of superoxide dismutase and catalase activity of freshwater sterlet larvae during the period of early feeding with live food with the addition of probiotic microorganisms *Lactobacillus acidophilus* IMV B-7279.

It was found that the maximum level of superoxide dismutase and catalase activity of sterlet larvae homogenate occurred on the 7th day of feeding with artemia nauplii. The use of artemia encapsulated with probiotic lactobacilli *Lactobacillus acidophilus* IMV B-7279 as live feed leads to a decrease in the value of SOD activity in the homogenate of sterlet larvae after a week of feeding. The use of the probiotic is accompanied by a significant increase in the level of catalase activity - 1.6 times compared to the control and more than 3 times compared to the value before feeding.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

(підпис) О.О. Гудан

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
Розділ 1. Огляд літератури.....	6
1.1 Проблема оксидативного стресу при вирощуванні риб в аквакультурі.....	6
1.2 . Функціонування антиоксидантної системи в організмі риб.....	9
1.2.1 Складові антиоксидантної системи	9
1.2.2 Структурно-функціональні особливості супероксиддисмутази	14
1.2.3 Антиоксидантні властивості ензиму каталаза	17
1.3 Застосування пробіотичних мікроорганізмів роду <i>Lactobacillus</i> в промисловому вирощуванні риб	22
Розділ 2. Матеріали та методи досліджень	27
2.1. Матеріали досліджень.....	27
2.2 Методи досліджень	27
2.2.1 Культивування та інкапсуляція артемії.....	27
2.2.2 Метод визначення каталазної активності	28
2.2.3 Метод визначення супероксиддисмутазної активності	29
2.2.3 Метод визначення вмісту загального білку за Лоурі.....	30
Розділ 3. Результати досліджень та їх обговорення	31
Список використаної Літератури	38
ДОДАТОК	40

ВСТУП

Постійну загрозу для виробництва продукції аквакультури несуть інфекційні захворювання, особливо в умовах рециркуляційних систем, де обробка терапевтичними біоцидними засобами є ускладненою внаслідок роботи біофільтрів. В цьому аспекті профілактика бактеріальних захворювань пробіотичними препаратами є перспективним напрямком вирішення проблеми. Пробіотичні мікроорганізми роду *Lactobacillus* в аквакультурі мають потенціал для покращення росту, зміцнення імунної системи та загального стану риб. Вивчення біології роду *Lactobacillus* та механізму дії пробіотиків у аквакультурі є важливим для оптимізації умов утримання риб та підвищення продуктивності аквакультурних систем.

Одним з найбільш уразливих для дії патогенів періодів в ранньому онтогенезі риб є період переходу від живлення за рахунок поживних речовин жовткового мішка до екзогенного – так зване змішане живлення, в якому поживні речовини отримуються як з жовткового мішка, так і з кормом. Саме в цей період спостерігається пік смертності личинок, який може сягати 50% та вище, що зумовлено незрілістю харчової поведінки та функціональних механізмів живлення личинок.

Оксидативний стрес, що супроводжує ці явища, провокує інтенсифікацію вільнорадикального окислення основних біомолекул та поглиблює патологічні зміни. Антиоксидантна система організму риби є важливим механізмом захисту від окислювального стресу. У цій системі ключову роль відіграють ензими, такі як супероксиддисмутаза і каталаза.

СОД є одним з найактивніших антиоксидантних ферментів, який безпосередньо забезпечує блокування ланцюгів окиснен-залежних вільнорадикальних процесів у клітинах, адже каталізує реакцію знешкодження супероксидних радикалів ($O_2^{\bullet}$) шляхом їх дисмутації з утворенням менш реакційно здатних молекул пероксиду водню і синглетного кисню. Ензим каталаза утилізує пероксид водню H_2O_2 та виступає одним з біомаркерів

пероксидного окиснення сполук. Дослідження активності цих ензимів дозволяють зрозуміти прогалини у балансі окислювальних та антиоксидантних процесів за дії стресорних чинників.

Метою даної роботи було визначення супероксиддисмутази та каталази активності личинок стерляді прісноводної в період раннього вигодовування живим кормом з додаванням пробіотичних мікроорганізмів *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279.

Були поставлені такі завдання:

1. Визначити супероксиддисмутази та каталази активності гомогенату личинок стерляді прісноводної на 7-му та 14-у доби вигодовування наупліями артемії.
2. Визначити супероксиддисмутази активність гомогенату личинок стерляді в період двотижневого вигодовування артемією з додаванням пробіотичних мікроорганізмів *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279.
3. Визначити каталази активність гомогенату личинок на 7-му та 14-у доби вигодовування наупліями артемії, збагаченими *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Проблема оксидативного стресу при вирощуванні риб в аквакультурі

Окислювальний стрес - це стан, викликаний дисбалансом між формуванням і знешкодженням активних форм кисню в клітинах і тканинах організмів. Оксидативний стрес становить необхідну ланку неспецифічної реактивності організму, елемент та етап його адаптації до умов життя, чинник збереження гомеостазу. Симптоматика окисного стресу включає ряд біологічних і біохімічних чинників, зумовлених утворенням в клітині вільних радикалів — вкрай реактивних сполук, які здатні спричиняти окислювальні процеси. Найчастіше наслідком порушення окисно-відновного балансу організму, викликаного утворенням вільних радикалів, є стрімке та тривале посилення інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів.

Вільні радикали можуть бути вироблені при нормальному метаболізмі клітин або при наявності зовнішніх чинників, таких як ультрафіолетове випромінювання, дія токсикантів тощо.

Якщо продукція активних форм кисню перевищує їх вилучення, вони можуть пошкоджувати клітинні структури, зокрема білки, ліпіди та ДНК. Це може призводити до появи різних захворювань.

Знешкодження вільних радикалів, активних форм кисню забезпечується системою антиоксидантів, дія яких запобігає пошкодженню клітинних структур. Однак, при довготривалому оксидативному стресі, навіть ці системи можуть бути перенавантажені, що може призвести до появи патологій.

У риб, як і в інших організмах, оксидативний стрес може бути спричинений різними факторами, таких як:

- Вік організму. З віком риби збільшується оксидативний стрес, це може бути пов'язано зі зниженням активності роботи антиоксидатної системи, за рахунок чого збільшується кількість вільних радикалів в клітинах організму.

- Забруднення навколишнього середовища. Забруднення хімічними речовинами, металами та токсинами можуть провокувати окиснювальний стрес, що призводить до пошкодження тканин і клітин риби.
- Підвищення температури води. Зі збільшення температури води, підвищується швидкість окислення ліпідів в тканинах риби.
- Раціон риби. Наприклад, недостатній вміст вітамінів С та Е, які володіють антиоксидантними властивостями, може підвищити ризик оксидативного стресу у риби.
- Рівень кисню у воді. Зміни кисневого режиму води можуть спровокувати
- Захворювання риби. Інфекційні агенти можуть спричиняти запальні процеси, а це призводить до активного вироблення вільних радикалів. Деякі паразити можуть безпосередньо впливати на функціонування антиоксидантної системи риби.
- Генетичні фактори. Деякі види риби більшою мірою схильні до оксидатного стресу через вроджені дефекти антиоксидантної системи.

Оксидативний стрес може мати серйозні наслідки для функціонування організму. Наприклад, він може спричинити пошкодження клітин мозку, нирок та печінки, що може призвести до зниження імунітету та збільшення ризику виникнення захворювань. Крім того, оксидативний стрес може знизити інтенсивність росту та розмноження риби, що може призвести до зниження чисельності їх популяції.

З огляду на те, що риби є важливою складовою біорізноманіття водойм, стан їх популяцій має велике значення. Загальні заходи, які можуть допомогти у боротьбі з оксидативним стресом у риби, включають:

1. Зменшення викидів забруднюючих речовин у навколишнє середовище. Це може бути досягнуто шляхом встановлення суворих норм та стандартів викидів для промислових підприємств, а також

шляхом застосування більш екологічно чистих технологій у сільському господарстві.

2. Підвищення ефективності очищення стічних вод. Очищені стічні води мають менший вплив на навколишнє середовище та стан гідробіонтів.
3. Використання антиоксидантів у раціоні риб. Антиоксиданти можуть забезпечити зниження рівня вільних радикалів в організмі риб та запобігання оксидативного стресу.
4. Збільшення зон відведення забруднених стоків від водойм. Це допоможе у зменшенні негативного впливу забруднених стоків на стан риб та інших водних організмів.
5. Проведення моніторингу рівня забруднення водойм та рівня оксидативного стресу у риб. Це допоможе вчасно виявляти проблеми та вживати необхідні заходи для підтримки функціонального стану риб та попередження погіршення екологічної ситуації.
6. Заборона вилову риби в період розмноження. Це може допомогти зберегти популяції риб та забезпечити їхнє природне відтворення.

Біомаркери оксидативного стресу є індикаторами цього стану і дозволяють визначити рівень оксидативного стресу та оцінити ступінь їх захворювання.

Основні біомаркери окисного стресу у риб включають: рівень малонового діальдегіду (продукту пероксидного окислення ліпідів, можна виявити в плазмі та тканинах риб); активність антиоксидантних ферментів, (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза та глутатіонпероксидаза); рівень вільних радикалів (пероксид водню, гідроксильні радикали та супероксидні радикали в плазмі та тканинах); рівень окислених білків, (окислені сироваткові білки, наприклад, альбумін та окислений гемоглобін у плазмі та тканинах риб).

Ці біомаркери можна використовувати для діагностики функціональних станів риб, пов'язаних з окислювальним стресом, і для оцінки ефективності заходів щодо запобігання та лікування цих станів.

1.2. Функціонування антиоксидантної системи в організмі риб

1.2.1 Складові антиоксидантної системи

Антиоксидантна система (АОС) – це механізм, що запобігає розвитку вільнорадикальних та перекисних реакцій в організмі. Основним завданням даної системи в організмі є зменшення кількості вільних радикалів до мінімально можливого рівня, оскільки антиоксидантна система захисту організму контролює і гальмує всі етапи вільнорадикальних реакцій.

Вільні радикали потенційно можуть окислювати всі клітинні біомолекули, включаючи нуклеїнові кислоти, білки та ліпіди. При вільнорадикальному пероксидному окисленні (ВРПО) разом з активними формами кисню (АФК) утворюються і інші активні радикали (пероксиди, епоксиди, альдегіди, кетони, спирти, діальдегіди та ін.), які здатні ковалентно взаємодіяти з окремими функціональними групами білків, що приводить до їх полімеризації і руйнування амінокислотних залишків, особливо які містять SH-групи (цистеїну, метіоніну), NH-групи лізину тощо. Усе це може викликати модифікацію білків, у тому числі ферментів, зміну їх активності, руйнування біоантиокислювачів (вітамінів, убіхінону, стероїдних гормонів тощо), зміну фосфоліпідного складу, появу в гідрофобній частині продуктів окислення, які ініціюють процеси іонного транспорту, зміну конформації білків і ліпідного складу, а звідси структурних і функціональних властивостей мембран.

Активність протікання ВРПО в організмі залежить від концентрації кисню в тканинах, а також від антиоксидантних ферментних і неферментних систем. Специфічні ферментні системи ВРПО виявлені у пероксисомах. Біоантиоксиданти здатні в невеликих концентраціях гальмувати вільнорадикальні процеси шляхом впливу на одну або декілька ланок систем утворення активних форм кисню, реактивувати антиоксидантні ферменти, тощо.

Існує кілька підходів до класифікації АОСЗО. Найперша класифікація базується на основі фізико-хімічних властивостей самих антиоксидантів, які, у свою чергу, розділяються на жиророзчинні та водорозчинні. До жиророзчинних

антиоксидантів належать вітаміни групи Е (токофероли), ряд фосфоліпідів, зокрема фосфатидилхолін і фосфатидилетаноламін, вітаміни групи К, білірубін, білівердин, убіхінон та деякі стероїдні гормони.

До водорозчинних відносять низько- і високомолекулярні сполуки, які містять SH-групи (цистеїн, цистін, глутатіон), моно-, ди- і трикарбонові кислоти та аніони, що зв'язують залізо; тироксин, нікотинову кислоту, адреналін, інозин, вітаміни групи Р, сечовину, селен. Вказані антиоксиданти є природного походження, проте існує ціла низка синтетичних фізіологічно активних речовин, до яких, крім перерахованих, належать представники різних класів хімічних сполук.

Багато авторів проводять умовний розподіл АОС на ферментативну і неферментативну, віднісши до першої і антиоксидантні (АО) ферменти: супероксиддисмутази (СОД), каталазу, глутатіонпероксидази (ГП) тощо, а до другої: токофероли, убіхінони, ретиноли, Se- і S-похідні та метаболіти.

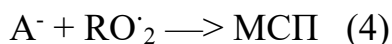
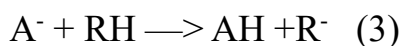
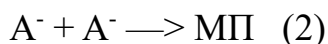
Останнім часом з'явилися підходи до класифікації АОСЗО за механізмом реалізації АО ефекту. Екзогенні АФК завжди впливають на клітину тільки опосередковано через стимуляцію ПОЛ у плазматичній мембрані. Тому захист від ушкодження екзогенними АФК спрямований, у першу чергу, на утилізацію жирнокислотних і ліпідних гідропероксидів — продуктів ПОЛ, що стимулюють вільнорадикальні реакції ліпопероксидації за принципом ланцюгової реакції. Експресія в клітинах різних форм глутатіонпероксидази (ГП) приводить до значного підвищення їх стійкості до екзогенних окислювачів. Інша частина вільно-радикальних продуктів у мембрані перехоплюється SH-групами мембранних білків, а більшість з них, головним чином, поблизу зовнішньої поверхні мембрани, знешкоджується токоферолами.

В залежності від того, на яку ланку метаболізму спрямована дія антиоксидантів, їх можна умовно розділити на такі групи.

До першої групи антиоксидантної системи захисту можна віднести жиророзчинні ендогенні антиоксиданти: вітаміни групи Е (токофероли),

убіхінон, вітаміни групи А (ретіноли) та провітаміни групи А (α -, β - та γ -каротини), вітаміни групи D (кальцифероли), К (філохінони і менахінон), ліпоєва кислота, деякі стероїдні гормони, мелатонін та інші.

Механізм антиоксидантної дії цих сполук обумовлений їх потужними донорними властивостями (зменшення кількості вільного кисню в клітині, наприклад, шляхом активації його утилізації, підвищення активності процесів окислення і фосфорилування) і здатністю відновлювати ліпідні радикали. Усі перераховані сполуки належать до речовин антирадикального захисту або "прямих" антиоксидантів. Однак сумарна антиоксидантна активність цих речовин (здатність гальмувати вільнорадикальні перекисні реакції на всіх етапах ВРО) визначається не тільки їх антирадикальною активністю, але й здатністю утвореного радикалу самого антиоксиданту паралельно з реакціями рекомбінації з утворенням стабільних молекул, ініціювати нові ланцюги ВРО при взаємодії з кожною новою молекулою окисленої сполуки.



де А — антиоксидант прямого типу дії;

$A^{\cdot}$ — радикал антиоксиданту;

ROOH — гідропероксид ліпіду;

$R^{\cdot}$ — ліпідний алкільний радикал;

RH — ліпід;

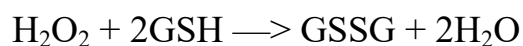
MP — молекулярний продукт;

MSP — молекулярний стабільний продукт

До другої групи можна віднести захисні ферменти: СОД, каталазу, глутатіонредуктазу (ГР), а також низько- та високомолекулярні сполуки, що містять тіольні- та селеногрупи, зокрема цистеїн, цистін та інші.

Дані ферменти запобігають утворенню надлишкових активних форм кисню та приймають участь в нерадикальному розкладі перекисів ліпідів.

Основним сірковмісним антиоксидантом в організмі є глутатіон відновлений. Крім інактивації ферментативним шляхом гідроперекисів ліпідів, глутатіон неферментативним шляхом інактивує H_2O_2 і інгібує активні форми кисню й одночасно окислює тіольні угруповання, у першу чергу глутатіон (GSH) до дисульфідів.



Крім того, в організмі антиоксидантну функцію виконують також селенвмісні сполуки. Включення селену в активний центр селензалежної ГП відбувається у вигляді Se-цистеїну. Так, селенвмісні амінокислоти (Se-цистеїн, Se-метіонін) виявляють самостійну антиоксидантну дію, виступаючи у ролі "пастки" для алкоксильних радикалів, і беруть участь у неферментативному розкладі гідроперекисів ліпідів. Крім того, селен входить до активного центру селензалежної глутатіонпероксидази.

Третя ланка захисної системи — це два ферменти: глутатіонпероксидаза (ГП) і глутатіонтрансфераза (ГТ). ГП каталізує розклад гідроперекисів ліпідів нерадикальним шляхом за допомогою глутатіону відновленого. Більше 70 % ГП локалізуються у цитозолі, тоді як 25-30 % — у матриксі мітохондрій.

Відновлений глутатіон та іони двовалентного заліза є антагоністами: іони Fe^{2+} активують ВРПО, розгалужуючи ланцюги окиснення, а глутатіон перешкоджає цьому, видаляючи (детоксикуючи) гідропероксида, що утворюються у ході самого процесу ВРПО. Двовалентне залізо дуже токсична сполука, оскільки у водному середовищі з його участю відбувається утворення вільних радикалів з пероксиду водню (реакція Фентона), а у ліпідній фазі мембран Fe^{2+} розгалужує ланцюги окиснення ліпідів, розкладаючи гідроперекиси ліпідів з утворенням алкоксильних вільних радикалів.

Для детоксикації Fe^{2+} в організмі існує четверта захисна система: окиснення і зв'язування іонів Fe^{2+} . У плазмі крові ця система представлена ферментом фероксидазою, що окислює Fe^{2+} до Fe^{3+} киснем без утворення вільних радикалів, та білком трансферином, який зв'язує і переносить у кров'яному руслі іони Fe^{3+} , а потім захоплюється клітинами.

Отже, основні групи антиоксидантів, які є частинами антиоксидантних систем у риб, можуть бути класифіковані на ендогенні та екзогенні антиоксиданти.

Ендогенні антиоксиданти, що виробляється безпосередньо в організмі, представлені ферментативними (СОД, каталаза, пероксидаза тощо) та неферментативними (наприклад, глутатіон). Екзогенні антиоксиданти, що надходять в організм риб із зовнішнього середовища - це поліфеноли, каротиноїди, аскорбінова кислота тощо.

Функціонування антиоксидантної системи забезпечує захист клітинних мембран від пошкодження, підтримку імунної системи, захист від хвороботворних мікроорганізмів. Загалом, вони забезпечують захист від шкідливого впливу зовнішніх факторів, наприклад, таких як ультрафіолетове випромінювання та токсикантів.

Антиоксиданти забезпечують основну ланку захисту риб від оксидативного стресу. Проте, існують й інші механізми. Наприклад, активізація метаболічних процесів (риби можуть збільшувати вироблення антиоксидантів під час стресових ситуацій, таких як інфекції або забруднення довкілля); функціонування імунної системи (макрофаги та нейтрофіли можуть виробляти реактивні види азоту (наприклад, NO), які можуть бути ефективними антиоксидантами та протизапальними засобами.

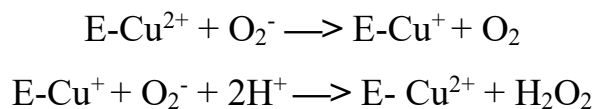
Риби мають ефективні механізми детоксикації, які допомагають у видаленні токсинів та інших шкідливих сполук з організму. Ці механізми включають у себе ферментативні системи, які розкладають токсичні сполуки на менш токсичні або невідчутні форми. Окрім того, риби можуть використовувати терморегуляцію, щоб зменшити окислювальний стрес. Наприклад, деякі види риб можуть знаходитися у прохолодних водоймах, щоб знизити швидкість метаболізму та зменшити вироблення вільних радикалів.

1.2.2 Структурно-функціональні особливості супероксиддисмутази

Супероксиддисмутаза (СОД) – металовмісний ензим, який каталізує реакцію інактивації, тобто, дисмутації супероксидних радикалів. Як правило, ензими, що володіють СОД-активністю є внутрішньоклітинними і в міжклітинних рідинах (лімфа, плазма, синовіальна рідина) швидко руйнуються.

СОД - металопротеїн, який складається з двох ідентичних субодиниць, кожна з яких містить або купрум або цинк (Cu/Zn-супероксид-дисмутаза), або ферум (Fe-супероксид-дисмутаза), або манган (Mn-супероксид-дисмутаза), або нікель (Ni-супероксид-дисмутаза). СОД каталізує дисмутацію супероксиду в кисень і пероксид водню. Вона відіграє найважливішу роль в антиоксидантному захисті всіх типів клітин, які знаходяться у контакті з киснем. Основною функцією є нейтралізація дії найрозповсюджених і найбільш небезпечних вільних радикалів – супероксидів.

Механізм дії супероксиддисмутази можна представити за схемою:



На рисунку 1 зображено схему, яка показує можливий механізм СОД у знешкодженні різних супероксидних радикалів, окислювального стресу та АФК.

Незважаючи на високу специфічність, у певних умовах СОД може взаємодіяти з пероксидом водню і виступати як прооксидант, ініціюючи утворення супероксидного аніону і гідроксильного радикалу. Важливо відзначити, що як зниження, так і підвищення активності СОД є причиною розвитку патологічних процесів. У першому випадку внаслідок недостатнього захисту від активних форм кисню, у другому – в результаті посилення цитотоксичної дії пероксиду водню, що утворюється в результаті дисмутації супероксиду.

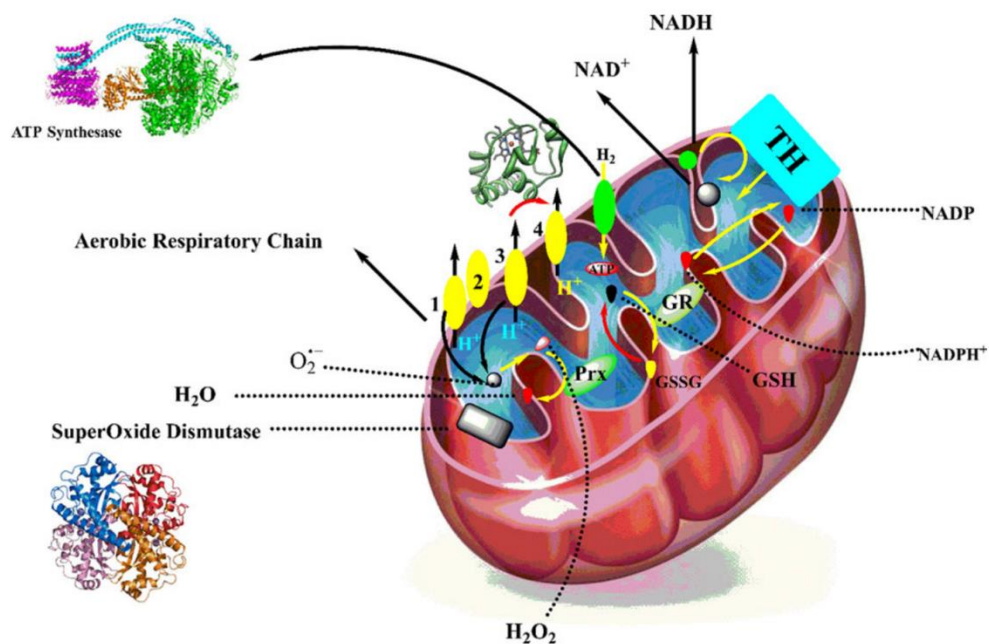


Рис. 1 Можливий механізм дії СОД у знешкодженні різних супероксидних радикалів, окислювального стресу та АФК.

ROS: активні форми кисню; GPx: глутатіонпероксидаза.

Супероксиддисмутаза в крові як первинний антиоксидант підтримує та контролює рівень вільних радикалів і таким чином створює умови нормального використання кисневого середовища організму. СОД успішно деактивує один з найнебезпечніших для клітин токсинів – АФК, (активні форми кисню). Після розпаду АФК утворюються перекис водню, який здатний пошкодити супероксиддисмутаза (її молекули), з цієї причини СОД завжди функціонує разом із каталазою. Каталаза досить швидко розщеплює шкідливий для СОД перекис на воду і кисень.

Вперше супероксиддисмутаза (СОД), представили, як один з найважливіших антиоксидантних ферментів захисної системи МакКорд і Фрідович у 1969 році.

Розрізняють чотири форми СОД, за різними типами металевих центрів: Fe-, Zn-Cu-, Mn- та Ni- залежні СОД. Fe-залежна СОД у більшій мірі є представленою в еритроцитах, Zn-Cu-залежна — у цитоплазмі, а Mn-залежна — у мітохондріях.

Метали виконують каталітичну функцію, які послідовно відновлюються і окиснюються в активному центрі ензиму. Гомодимерна форма, відома як Cu/Zn СОД, локалізована або у внутрішньоклітинній цитоплазматичній області (Cu/Zn- СОД або СОД 1), або в позаклітинній області (ЕС- СОД або СОД 3). Крім того, СОД 1 зазвичай зустрічається в хлоропластах рослин, периплазмі бактерій (СОД -С) і багатьох ділянках клітини, таких як лізосома, ядро та цитозоль, серед іншого, а ферменти СОД 3 існують як гомотетрамери, підтримуючи екстрацелюлярну локалізацію з сильною спорідненістю до гепарину, який виявлений у плазмі крові людини, спинномозковій рідині, асциті та лімфі.

СОД мають великий потенціал у медичній, косметичній, харчовій, сільськогосподарській та хімічній промисловості через їх антиоксидантну дію.



Рис. 2 Схема промислового застосування препаратів СОД

Ці ферменти комерційно отримують з морського фітопланктону, бичачої печінки, бактерій. Клінічні експерименти показали, наприклад, що СОД можуть запобігати онкогенезу та знижувати цитотоксичність. Нещодавно було виявлено, що СОД запобігають різноманітним захворюванням. Вони також

застосовуються у тваринництві для зменшення окислювального стресу та покращення якості продуктів тваринного походження, таких як м'ясо, яйця, молоко. Крім того, СОД може інгібувати отруєння 2 мМ KCN (28%) і ціанідом (50%) шляхом автоокислення пірогалолу в мітохондріях.

Зменшуючи окислювальний стрес, активність СОД може індукуватися в мікробних організмах. Дослідники звернули свою увагу на виробництво СОД з бактеріальних джерел. Деякі бактерії використовувалися в біореакторах з мікрофільтрацією, наприклад як : *Proteus mirabilis*, який проявляє три активності СОД, що залежить від вмісту розчинного заліза та кисню в культуральному середовищі.

Крім того, активність СОД відрізнялась в екстрактах клітин, вирощених у присутності кадмію, що підтверджує припущення про взаємодію між іонами токсичних металів і залізом. Таким чином, добавки, що містять Fe, можуть протидіяти впливу іонів важких металів, таких як Cd і Pb, які конкурують з Fe. Крім того, штам *Lactobacillus fermentum* ME-3 використовувався для лікування окислювального стресу через високу активність СОД порівняно з іншими відомими антимікробними властивостями.

СОД виявляє високу антиоксидантну активність і бере участь у лікуванні різноманітних захворювань та як профілактичні засоби. Супероксиддисмутаза має багато переваг для того, щоб її використовували для розробки нових дієтичних добавок і ліків, які покращать відновлення, відтворюваність і стабільність продуктів.

1.2.3 Антиоксидантні властивості ензиму каталаза

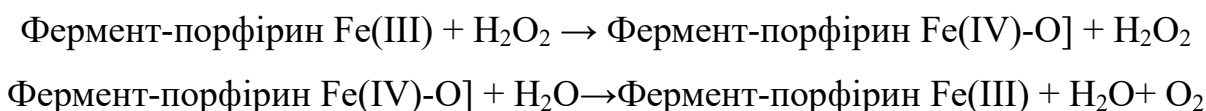
Каталаза (К.Ф. 1.11.1.6) – ензим класу оксидоредуктаз, що бере участь у дезінтоксикації нерадикальної активної форми кисню – H_2O_2 . Це хромопротеїд, складається з чотирьох ідентичних субодиниць з молекулярною масою 62 000. Каталізує розкладання H_2O_2 до води і кисню. До активного центру ферменту входить тривалентне залізо, протопорфірін, який взаємодіє з

пероксидом водню за каталазним, або пероксидазним механізмом, в залежності від концентрації субстрату. Фермент міститься практично у всіх тканинах, у яких його концентрація сягає 10^{-6} М.

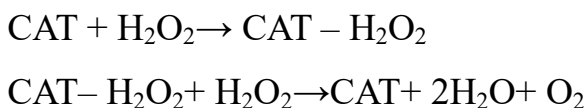
Молекула каталази складається з 4-х субодиниць, кожна містить гем, який входить до складу активного центру і пов'язаний з молекулою NADPH. До активного центру йде вузький канал, який запобігає проникненню значно більших молекул, ніж H_2O_2 . За дисоціації субодиниць каталаза втрачає свою активність. Ензим присутній майже у всіх аеробних організмах. Каталаза розщеплює дві молекули перекису водню на одну молекулу кисню і дві молекули води в двостадійній реакції.

Перший крок механізму реакції включає утворення спектроскопічно відмінної проміжної сполуки I, яка є ковалентним оксиферилем, що має π -катионний радикал порфірину, шляхом відновлення однієї молекули перекису водню.

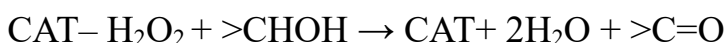
На другій стадії реакції сполука I відновлюється за допомогою окисно-відновних реакцій шляхом перенесення двох електронів від донора електронів (другої молекули перекису водню) з утворенням вільного ферменту, кисню та води.



Ензим, локалізований переважно в пероксисомах клітин. Велика молекулярна маса ензиму перешкоджає його проникненню через клітинну мембрану. Розклад каталазою H_2O_2 здійснюється у два етапи.



За цих умов в окисненому стані каталаза працює і як пероксидаза, яка каталізує окиснення спиртів або альдегідів:



Каталітична активність каталази досить висока і складає приблизно 45 тис. молекул H_2O_2 за секунду. Найбільша концентрація каталази у печінці. У

пероксисомах гепатоцитів частина каталази становить 40% всіх білків, також висока її концентрація в мітохондріях і ендоплазматичному ретикулумі.

Каталаза є важливим ферментом, який бере участь у мутагенезі та станах запалення, а також під час пригнічення апоптозу, які, як відомо, пов'язані з станами окисного стресу.

При високих концентраціях пероксиду водню основною функцією ензиму є участь у його розщепленні до води та кисню (каталазна активність). Однак при низьких концентраціях H_2O_2 домінує пероксидазна активність каталази, а субстратами є сполуки-донори водню, наприклад етанол, метанол, фенол та інші.

Каталаза може бути отримана з різних джерел. Біологічним матеріалом можуть бути як рослинні, так і тваринні організми, а також бактерії та дріжджі (наприклад, тютюн, дріжджі, кров, бичача печінка, еритроцити людини та інші тканини). На сьогоднішній день каталаза є ферментом з найбільш добре вивченою хімічною структурою.

Присутність каталази також була продемонстрована в бактеріальних клітинах. Більшість анаеробних бактерій (крім *Propionibacteria shermanii*) і деяких аеробних бактерій, наприклад, *Baccillus popillie*, *Mycoplasma pneumoniae*, не мають цього ферменту.

У прокаріот каталаза розташована в міжмембранному просторі між внутрішньою та зовнішньою клітинними мембранами. Натомість, в еукаріотичних клітинах каталаза розташована в основному в пероксисомах, де вона зустрічається разом з іншими ферментами класу оксидоредуктаз. У пероксисомах печінки ссавців каталаза може становити до 16% усіх білків. Одночасна присутність у пероксисомах ферментів, що генерують H_2O_2 , і ферменту, відповідального за її розкладання, є біологічно корисною.

H_2O_2 також утворюється в клітинах у реакціях, які каталізуються ксантиноксидазою та мітохондріальною та мікросомальною системою транспорту електронів.

Невеликі кількості каталази були виявлені в мітохондріях (наприклад, печінки) та ендоплазматичному ретикулумі. Оскільки пероксид водню може легко дифундувати крізь мембрани *in vivo*, невеликі його кількості також можуть з'являтися в цитозолі.

Найвища активність каталази виявлена в печінці, нирках, крові (еритроцитах), кістковому мозку та слизових оболонках, найменша — у сполучній тканині.

Наявність каталази в пероксисомах клітин організму забезпечує їм захист від токсичної дії перекису водню та інших похідних. Це можливо тому, що він перетворює H_2O_2 на молекулярний кисень і воду без утворення вільних радикалів, а кисень, що утворюється в цій реакції, використовується в інших метаболічних процесах.

Каталаза відіграє особливу роль у метаболізмі еритроцитів, які піддаються дії високих концентрацій кисню. Разом з іншими антиоксидантними ферментами (глутатіонпероксидазою і редуктазою) і метгемоглобінредуктазою він захищає еритроцити від наслідків окисного стресу. Це особливо важливо для еритроцитів, оскільки вони піддаються впливу відносно високих концентрацій супероксидів і пероксидів. Було помічено, що кількість метгемоглобіну, що утворюється в еритроцитах під впливом перекису водню, обернено пропорційна активності каталази.

Перші відомості про біохімічні властивості каталази з'явилися в 1900 році. У 1937 році в лабораторії Самнера і Дунса білок вперше кристалізували з бичачої печінки. Перша прокаріотична каталаза була очищена з аеробної бактерії *Micrococcus lysodeikticus* у 1948 році. Генем, що кодує каталазу, є ген CAT, який розташований у хромосомі 11 у людини.

Існує три різних типи каталази. Найбільш поширеним є монофункціональний гемвмісний фермент. Біфункціональна каталаза-пероксидаза належить до другого класу, який порівняно менш поширений у природі. Цей фермент також містить гемову групу. Він тісно пов'язаний з

рослинними пероксидазами зі схожістю структури та послідовності. Третій клас належить до Mn-вмісної групи каталази, яка не має групи гему.

Люди мають типову монофункціональну каталазу, що містить гем, що має простетичну групу протопорфірину IX заліза, який реагує з перекисом водню. Розташований у пероксисомах фермент має молекулярну масу приблизно 220-240 кДа. Це тетрамерний білок, кожна субодиниця якого поділена на чотири домени: N-кінцеве плече, C-кінцеві спіралі, обгортаюча петля та β -ствол. Кожна субодиниця має гідрофобне ядро, що складається з восьми скручених β -стволів, оточених α -спіралями. Ці β бочки антипаралельні одна одній

Дистальна сторона субодиниці гема складається з перших чотирьох β -ланцюгів ($\beta 1$ - $\beta 4$) β -стволкового домену, а решта чотирьох ланцюгів ($\beta 5$ - $\beta 8$) відіграють роль у кишені зв'язування NADPH. N-кінцеве плече субодиниці (залишки 5-70) складним чином з'єднує дві субодиниці шляхом зачеплення через довгу обгортаючу петлю (залишки 380-438). Нарешті, спіральний домен на одній стороні β -стволка складається з чотирьох C-кінцевих спіралей. Тетрамеризація примушує N-кінцеві плечі від димера, що обмінюється плечем, покривати активний сайт гему для іншої пари димерів, і припускає, що каталаза відповідає більш загальній моделі обміну доменами, причому обмін плечем є пізнішим тетрамером -залежне опрацювання. По всьому протейну вода заповнює дефекти упаковки між чотирма доменами субодиниці та між субодиницями в тетрамері. Лише гідрофобний β -ствол і безпосереднє оточення активного центру практично позбавлені цих структурних молекул води. Кристалічні структури каталази людини показують, що залізо активного центру є п'ятикоординованим. Негативно заряджений гем-карбоксилатний радикал утворює сольові містки до трьох залишків аргініну (Arg72, Arg117 та Arg365), які, ймовірно, сприяють збільшенню окисно-відновного потенціалу порфіринового радикала.

Каталаза застосовується при численних захворюваннях, пов'язаних з окислювальним стресом, як терапевтичний засіб. Складність застосування

залишається в доставці ферменту каталази до відповідного місця в адекватних кількостях. Наночастинки полімолочної кислоти спільно з гліколевою кислотою використовувалися для доставки каталази до нейронних клітин людини. Ефективність такої інкапсуляції каталази була дуже високою з приблизно 99% ферментативною активністю інкапсульованої каталази поряд зі значною стійкою активністю протягом місяця. Наповнена наночастинками каталаза показала позитивний вплив на клітини нейронів, які попередньо піддавалися впливу перексиду водню, зменшуючи опосередковане перекисом водню окислення білка, пошкодження ДНК, відкриття пор мітохондріальної мембрани та втрату цілісності мембрани. Таким чином, дослідження свідчать про те, що каталазу, завантажену наночастинками, можна використовувати як терапевтичний засіб при захворюваннях, пов'язаних з окислювальним стресом.

1.3 Застосування пробіотичних мікроорганізмів роду *Lactobacillus* в промисловому вирощуванні риб

Рід *Lactobacillus* є найбільшим з групи молочнокислих бактерій і включає сотні видів. Лактобацили — це грампозитивні бактерії, що не утворюють спор, і мають різноманітні форми та розміри. Вони можуть бути у формі коротких або довгих ниткоподібних паличок, поодинокі, парами або короткими ланцюжками. Лактобактерії є облигатними або факультативними анаеробами з високою ферментативною активністю. В залежності від шляхів ферментації вуглеводів, рід ділиться на три групи: облигатні гомоферментативні, облигатні гетероферментативні та факультативні гетероферментативні

При нормальному метаболізмі *Lactobacillus* здатні утворювати молочну кислоту, перексид водню, виробляти лізоцим і речовини з антибіотичною дією: реутерин, фітохімікал, лактобактерії, лактозу.

Лактобактерії мають різноманітну біологічну активність: вони сприяють стимуляції шлункового соку та виробленню ферментів, необхідних для

ефективності процесу травлення, зменшують побічну дію антибіотиків, сприяють розщепленню жовчних солей та нормалізації ліпідного обміну.

Лактобацили зустрічаються в різних екологічних нішах, де є висока концентрація поживних речовин, мікро- та макроелементів та факторів росту. Лактобацили є складовими епіфітної мікрофлори рослин та ризоїдної (прикореневої) мікрофлори рослин. Також бактерії роду *Lactobacillus* виявляють в харчових продуктах рослинного та тваринного походження, найрізноманітніших ферментованих продуктах, в побутових та промислових відходах, куди вони можуть потрапляти з фекаліями людини і тварин.

Пробіотики роду *Lactobacillus* можуть бути використані у промисловому вирощуванні риб. Механізм дії пробіотиків роду *Lactobacillus* полягає в тому, що вони можуть конкурувати зі шкідливими бактеріями за простір та живильні речовини, що допомагає знизити популяцію шкідливих мікроорганізмів та запобігти їхньому розмноженню. Крім того, пробіотики можуть продукувати ряд сполук, таких як молочна кислота та перекис водню, які можуть мати антибактеріальну дію та сприяти збереженню біорізноманіття.

Для досягнення максимального ефекту використання пробіотиків роду *Lactobacillus* в аквакультурі, важливо дотримуватись оптимальних умов їхнього зберігання та застосування, а також досліджувати взаємодію пробіотиків з різними видами риб, щоб визначити найбільш ефективний варіант застосування для кожного випадку.

Систематичне застосування пробіотиків на основі лактобацил підвищує колонізаційну резистентність, посилює імунітет, запобігає розвитку алергічних реакцій, нормалізує пул гістаміну та щавелевої кислоти, чинить антимутагенний, протипухлинний та інші ефекти.

Пробіотики роду *Lactobacillus* можуть покращувати імунну відповідь риб, зокрема, збільшувати активність фагоцитів та сприяти розвитку специфічних антитіл. Це може допомогти знизити ризик виникнення захворювань та підвищити загальний стан здоров'я риб, що в свою чергу може позитивно позначитись на продуктивності та якості вирощуваних організмів.

Використання пробіотиків роду *Lactobacillus* може позитивно впливати на склад та якість мікробіоти кишківника риб, сприяти розвитку корисних мікроорганізмів та зниженню кількості шкідливих бактерій. Це може позитивно впливати на перетравлення їжі, забезпечити краще всмоктування поживних речовин та сприяти збереженню енергії.

Застосування пробіотиків може бути виконано за допомогою різних методів, таких як введення пробіотичних бактерій в корм або пряме додавання їх до водного середовища. Для того, щоб додавання пробіотиків було ефективним, необхідно знати деякі характеристики, такі як оптимальна температура та рН-середовище для розвитку бактерій, що можуть бути різними для різних штамів *Lactobacillus*.

Основні переваги та недоліки використання пробіотиків роду *Lactobacillus* в аквакультурі:

Переваги:

Підвищення імунітету. *Lactobacillus* здатні стимулювати імунну систему риб, збільшуючи вироблення антитіл та інших елементів імунної відповіді, що допомагає знизити ризик захворювання.

Зниження ризиків захворювань. Пробіотики роду *Lactobacillus* можуть конкурувати з патогенними бактеріями та іншими мікроорганізмами в кишковій флорі риб, що допомагає знизити ризик захворювання.

Покращення засвоєння харчових речовин. Пробіотики роду *Lactobacillus* можуть підвищити засвоєння поживних речовин у кормі, що дозволяє підвищити ефективність годівлі та знизити витрати на корм.

Підвищення виробництва. Використання пробіотиків роду *Lactobacillus* може призвести до підвищення приросту маси риби, що може бути важливим для комерційної аквакультури.

Використання пробіотиків роду *Lactobacillus* в аквакультурі має багато переваг, але існують деякі недоліки, які слід враховувати при їх використанні, зокрема:

Ризик резистентності. Постійне використання пробіотиків може спричинити розвиток резистентності до цих бактеріальних препаратів, що може призвести до зниження їх ефективності взаємодії з іншими мікроорганізмами. Інші мікроорганізми, які присутні у кишкової флорі риб, можуть взаємодіяти з пробіотиками роду *Lactobacillus*, що може знизити їх ефективність.

Вартість. Використання пробіотиків роду *Lactobacillus* може бути витратним за рахунок їх високої вартості, що може бути неприйнятно для більшості виробників аквакультури.

Обмеженість. Ефективність пробіотиків роду *Lactobacillus* залежить від багатьох факторів, таких як температура води, рН середовища, склад корму тощо. Ці фактори можуть змінюватися в різних умовах вирощування риб, що може призвести до обмеженості використання цих пробіотиків.

Стадія росту личинок є найбільш придатною для використання пробіотиків в аквакультурі, і вплив ранньої колонізації цими мікроорганізмами може посилюватися протягом життєвих стадій риби.

Пробіотичні мікроорганізми вважаються безпечними, виробляють природні сполуки з антимікробним потенціалом і стимулюють імунну систему. Метаболічна активність пробіотиків може викликати антиоксидантну дію шляхом поглинання окисних сполук або запобігання їх утворенню в кишечнику.

Використання пробіотичних мікроорганізмів у експериментах з гідробіонтами показало багатообіцяючі результати, а додаткові ефекти можна отримати, перевібивши різні підходи до використання пробіотиків для оптимізації ефективності кормових добавок, включаючи використання пробіотичних сумішей.

Штами *Lactobacillus* часто рекомендуються для використання в аквакультурі, а харчові добавки можуть покращити активність ферментів, імунну відповідь, розвиток, збільшення ваги та навіть покращити якість води.

Стимуляція вироблення травних ферментів, таких як амілаза, протеаза, ліпаза та лізоцим, може бути важливим наслідком застосування пробіотиків.

Покращена засвоюваність корму рибою може бути результатом того факту, що пробіотики прямо чи опосередковано сприяють активності мікробних ферментів для метаболізму неперетравлених поживних речовин, викликаючи зміни у складі кишкової мікробіоти. Однак збільшення площі поверхні/здатності до поглинання поживних речовин також може сприяти цьому результату через стимулюючу дію пробіотичних мікробів на розвиток кишкового епітелію та функціонування кишечника.

Наприклад, коротколанцюгові жирні кислоти, що утворюються в результаті метаболізму пробіотиків, впливають на метаболізм епітеліальних клітин, допомагаючи запобігти різноманітним енерговитратним клітинним процесам в ентероцитах, таким як синтез муцинів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали досліджень

Дослідження проводили на личинках стерляді прісноводної, яких утримували у 35л-ємностях по 100 особин в кожній в умовах рециркуляційної системи. Температуру води підтримували в межах +20-22°C, гідрохімічні показники підтримували в межах рибогосподарських нормативів.

Експеримент розпочали від початку переходу личинок на екзогенне живлення та тривав 14 діб. Риб було поділено на дві групи – контрольну та дослідну, яким протягом двох тижнів як живий корм надавали артемію.

Дослідну групу вигодовували артемією, насиченою пробіотичним штамом лактобактерій *L. acidophilus* IMB B-7279, наданим для досліджень Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Контрольна група риб отримувала артемію в такій самій кількості, але не інкапсульовану пробіотиком.

У зв'язку з малими розмірами дослідних особин використовували збірні проби, які відбирали на початку експерименту, через 7 та 14 діб вигодовування.

2.2 Методи досліджень

2.2.1 Культивування та інкапсуляція артемії

Цисти *Artemia* sp («Ocean Nutrition», Belgium) інкубували апаратах Вейса об'ємом 8 л. Інкубацію цист здійснювали протягом 24 годин у сольовому розчині (NaCl (30 г/л), при постійній аерації та освітленні, рН 7,5, температурі 28 °C. Очищення науплій від оболонок та цист, які не проклінувались, здійснювали шляхом 3-4 разового промивання через сито.

Надалі частину науплій артемії переносили у нове середовище, в яке додатково вносили ліофілізовану культуру пробіотичних мікроорганізмів з концентрацією 5×10^5 КУО/л. Іншу частину науплій переносили у свіже

середовище без пробіотику. Додаткових кормових субстратів не використовували.

Насичення артемії пробіотиком тривало 12 годин, після чого вона використовувалась як живий корм для личинок стерляді.

2.2.2 Метод визначення каталазної активності

Метод визначення каталазної активності базується на здатності пероксиду водню утворювати з молібдатом амонію стійкий кольоровий забарвлений комплекс з максимумом поглинання при довжині хвилі 410 нм.

Реактиви:

1. 0,1М трис-НСІ буфер (рН 7.4)
2. H_2O_2 (0,08%)
3. Буферно-субстратна суміш: 0,1М трис-НСІ буфер (рН-7.6) та H_2O_2 (0,08%) у співвідношенні 1:3;
4. 4,5% розчин амонію молібденовокислого.

Хід визначення:

Реактиви	Контроль	Дослід	Примітки
Буферно-субстратна суміш	2 мл	2 мл	10 хв при 37°C
Досліджувальний матеріал	-	0,1 мл	3 хв при 37°C
Молібдат амонію	2 мл	2 мл	Зупинка реакції
Досліджувальний матеріал	0,1 мл	-	-

Оптичну густину дослідної та контрольної проб виміряти при 410 нм в 10 мм кюветі. Як розчин для порівняння використати: 1мл буфера, 3мл дистильованої води і 0,1 мл досліджуваного матеріалу

Розрахунок здійснювали за формулою:

$$A = (E_k - E_d) \cdot 12 \cdot 10^3 \cdot 4,1 \cdot 10^6 / 22,2 \cdot 10^6 \cdot 3, \text{ де}$$

A – активність каталази, МО / мл;

$12 \cdot 10^3$ – фактор розведення;

10^6 – коефіцієнт перерахунку на мкмоль;

$22,2 \cdot 10^6$ – коефіцієнт молекулярної екстинкції пероксиду водню;

3 – час інкубації, який відповідає 3 хв.

Для визначення питомої каталазної активності отримане значення ділили на вміст білка (в мг) в 1 мл гомогенату.

2.2.3 Метод визначення супероксиддисмутазної активності

Методика базується на здатності ензиму супероксиддисмутази інгібувати аутоокислення адреналіну, продукти якого кількісно виявляють спектрофотометрично за довжини хвилі 347 нм.

Реактиви:

1. 0,1% розчин адреналіну;

2. 0,2М розчин карбонатного буфера (рН 10,65).

Готували дослідну та контрольну проби для кожного зразка.

Дослідна проба: До 2 мл 0,2М карбонатного буфера додавали 10 мкл гомогенату та 100 мкл 0,1% розчину адреналіну.

Контрольна проба: До 2,5 мл 0,2М карбонатного буфера додавали 100 мкл 0,1% розчину адреналіну.

Оптичну густину вимірювати на спектрофотометрі при довжині хвилі 347 нм протягом 3 хв кожні 30 сек.

Відсоток інгібування СОД визначається за формулою:

$$\% \text{ інгібування (од. акт.)} = [1 - (D_d / D_k)] \cdot 100 \%, \text{ де}$$

D_d і D_k – швидкості реакції аутоокиснення адреналіну в присутності і у відсутності проби відповідно. Про швидкість окиснення адреналіну судили за зміною оптичної щільності.

Питому активність ензиму надалі вираховували на 1 мг білка. Для цього паралельно визначали вміст білка у гомогенаті.

2.2.3 Метод визначення вмісту загального білку за Лоурі

Метод базується на формуванні забарвлених продуктів синього кольору в результаті двох окремих реакцій: біуретової (купрум-іонів з пептидним зв'язком у лужному середовищі) та реакції відновлення фосфатномолібденової та фосфатновольфрамової солей реактиву Фоліна. Для цього методу використовуються такі реактиви:

1. Реактив А: 1 г NaOH + 5 г Na₂CO₃ (до 250 мл H₂O)
2. Реактив В: 0,5 г цитрату Na + 0,25 г CuSO₄ (до 50 мл H₂O)
3. Реактив С: 50 мл р-ву А + 1 мл р-ву В (готується у день дослідю, може зберігатись 2 доби)
4. Реактив Е: розведений реактив Фоліна 1:1

До 0,1 мл досліджуваного розчину додавали 0,9 мл H₂O, 2 мл реактиву С та перемішували й витримували 10 хв. Надалі додавали 0,2 мл реактиву Е та утримували 30 хв у темряві.

У контрольній пробі замість дослідного зразка використовували H₂O. Колориметрували при 750 нм. Розрахунок здійснювали за калібрувальною кривою, яку будували з використанням бичачого сироваткового альбуміну.

Статистичну обробку одержаних даних здійснювали за допомогою пакету аналізу даних Microsoft Excel. Достовірність різниці визначали з допомогою двовибіркового t-тесту за t-критерієм Стьюдента ($p \leq 0.05$).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Перехід на екзогенне живлення личинок риб є стресовим чинником для них, оскільки процес переходу від живлення за рахунок нутрієнтів жовткового мішка до самостійного пошуку їжі вимагає фізіолого-біохімічних змін. У перехідний період (змішаного живлення), коли личинки риб починають споживати екзогенну їжу, такий стресовий стан може супроводжуватись збільшеною продукцією вільних радикалів, що можуть перевищити здатність організму нейтралізувати їх антиоксидантами, наслідком чого є прояв ознак оксидативного стресу.

Активність каталази та супероксиддисмутази є показниками стану антиоксидантної системи організму, які відповідають за нейтралізацію вільних радикалів та запобігання оксидативному стресу. Підвищена активність цих ферментів може свідчити про зростання оксидативного стресу, оскільки вони залучаються до боротьби з перевищеною кількістю вільних радикалів.

Вимірювання активності цих ферментів може дати інформацію про стан оксидативного стресу у личинок риб під час переходу на екзогенне живлення. Зокрема, підвищена активність каталази та супероксиддисмутази може вказувати на збільшену продукцію вільних радикалів та потребу організму у більш інтенсивному антиоксидантному захисті.

Lactobacillus acidophilus є одним з видів пробіотичних бактерій, які використовуються для поліпшення здоров'я тварин, включаючи риб. Дослідження на личинках коропа показали, що застосування молочнокислих пробіотичних мікроорганізмів сприяє покращенню травлення та всмоктування поживних речовин та призводить до збільшення резервів антиоксидантів у організмі.

В нашому дослідженні активність антиоксидантних ферментів ми досліджували у личинок стерляді прісноводної віком 8 діб, яким в якості живого корму використовували науплії артемії. Годівля тривала 14 днів, а

вимірювання активності даних ферментів проводились до початку, а також на 7-й та 14-й день вигодовування.

Результати проведеного дослідження показали спільні тенденції в динаміці супероксиддисмутази та каталазної активності.

Так, перший тиждень переходу личинок на зовнішнє живлення супроводжується 1,5-разовим зростанням активності супероксиддисмутази (рис. 3.1.)

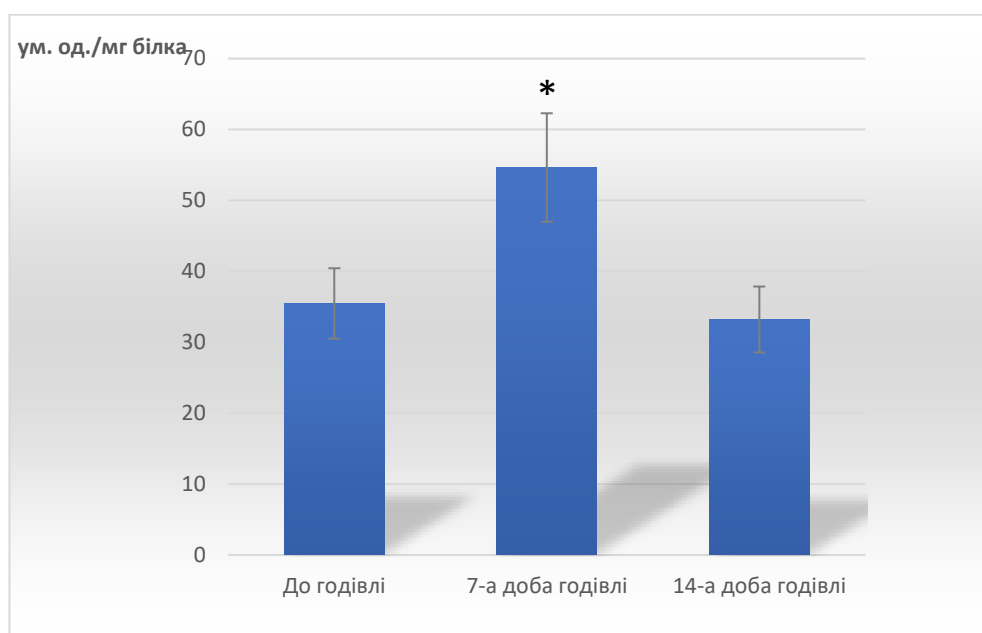


Рис 3.1. Рівень супероксиддисмутази активності гомогенату личинок стерляді прісноводної за умов вигодовування нативною артемією

*Примітка: * - різниця достовірна порівняно зі значенням до початку годівлі ($p \leq 0,05$)*

Відомо, що супероксиддисмутаза безпосередньо забезпечує блокування ланцюгів окисген-залежних вільнорадикальних процесів у клітинах, адже каталізує реакцію знешкодження супероксидних радикалів ($O_2^{\bullet}$) шляхом їх дисмутації з утворенням менш реакційно здатних молекул пероксиду водню і синглетного оксигену. Відповідно, зростання її активності може вказувати на посилення вільнорадикальних процесів. Попередніми дослідженнями

показано інтенсифікацію пероксидного окиснення ліпідів в період змішаного живлення у личинок риб.

Слід зауважити, що в цей період відмічалась висока смертність личинок стерляді, що сягала 30% особин.

Надалі, успішний перехід на активне живлення, який відбувається після повного розсмоктування жовткового мішка, супроводжується поступовим поверненням величини супероксиддисмутази до початкових значень.

Аналогічна тенденція спостерігається і для каталази (рис. 3.2.), що вказує на спільне підґрунтя – активацію оксидативних процесів - для роботи обох антиоксидантних ферментів протягом першого тижня вигодовування.

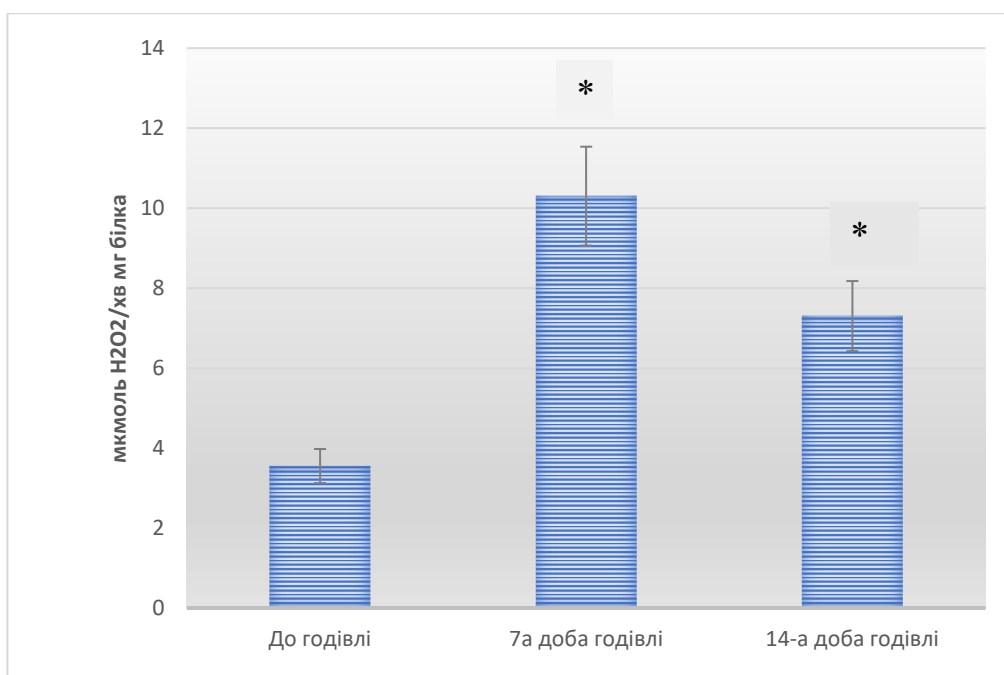


Рис 3.2. Рівень каталазної активності гомогенату личинок стерляді прісноводної за умов вигодовування нативною артемією

*Примітка: * - різниця достовірна порівняно зі значенням до початку годівлі ($p \leq 0,05$)*

Проте, слід відмітити, що каталазна активність на 14у добу, хоча й має тенденцію до зниження, все ж залишається удвічі підвищеною у порівнянні зі значенням, притаманним до годівлі.

Застосування як пробіотичного препарату *Lactobacillus acidophilus* призводить до істотного зростання рівня каталазної активності – у 1,6 рази у порівнянні з контролем та більш як в 3 рази в порівнянні зі значенням до годівлі (рис. 3.3.)

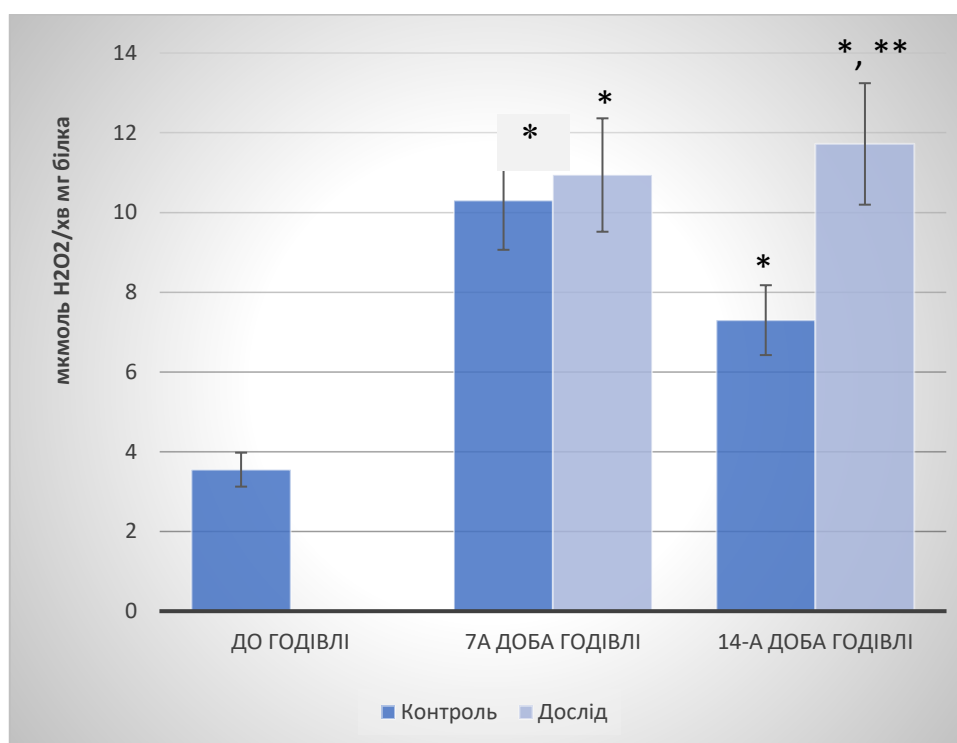


Рис 3.3. Рівень каталазної активності гомогенату личинок стерляді прісноводної за умов вигодовування артемією, збагаченою *L. acidophilus*

Примітка: * - різниця достовірна порівняно зі значенням до початку годівлі; ** - різниця достовірна порівняно з групою тварин, що вигодовувались артемією без пробіотика ($p \leq 0,05$)

Порівнюючи активність каталази при годівлі лише артемією та артемією з інкапсульованим пробіотиком можна зробити висновок, що *L. acidophilus* при метаболізмі забезпечує утворення певної кількості пероксиду водню, і відповідно, сприяє збільшенню активності ферменту каталаза. Застосування

молочнокислих бактерій як пробіотичних мікроорганізмів з метою підвищення імунного захисту та адаптивних можливостей в деякій мірі може супроводжуватись зростанням вмісту пероксиду водню внаслідок його синтезу лактобактеріями. Відомо, що при наявності кисню, деякі види молочнокислих бактерій можуть утворювати певну кількість гідроген пероксиду, який є субстратом для НАДН-оксидазного і супероксиддисмутазного комплексу ензимів та забезпечує антимікробний ефект. Антимікробний ефект H_2O_2 пов'язаний із сильною окислювальною дією. Він може бути посилений за наявності лактопероксидази і тіоціанату, які є в середовищі існування лактобактерій – молоці.

Для супероксиддисмутазної активності достовірні зміни ми спостерігали лише на 7у добу проведення експерименту (рис. 3.4.).

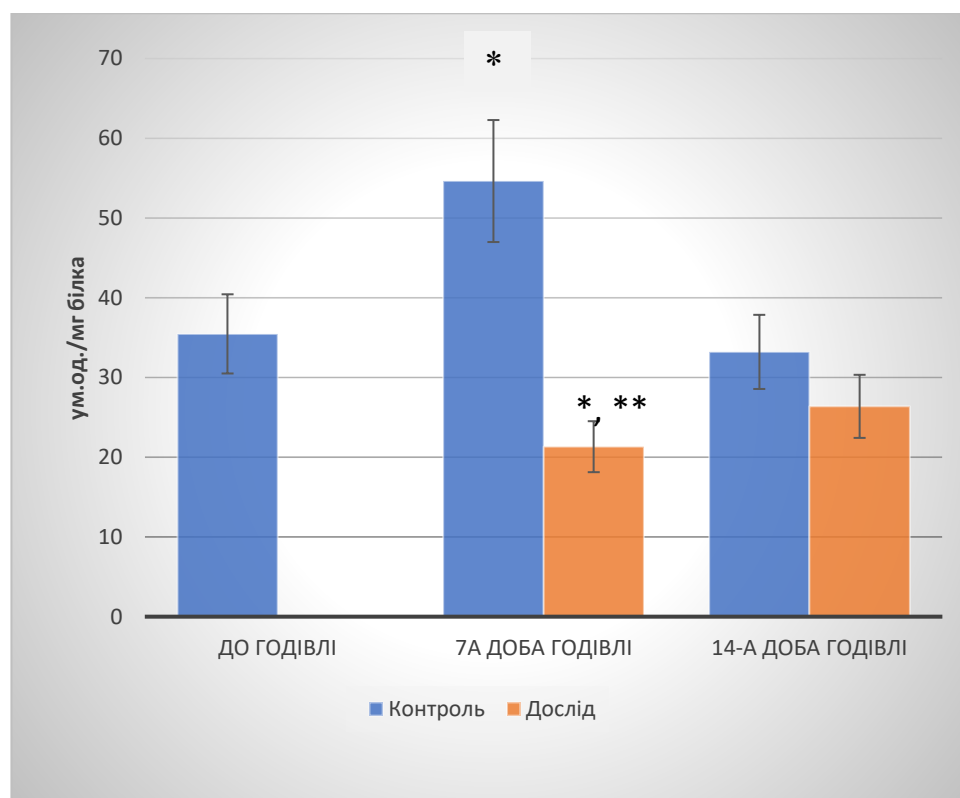


Рис 3.4. Рівень супероксиддисмутазної активності гомогенату личинок стерляді прісноводної за умов вигодовування артемією, збагаченою *L. acidophilus*

Примітка: * - різниця достовірна порівняно зі значенням до початку годівлі; ** - різниця достовірна порівняно з групою тварин, що вигодовувались артемією без пробіотика ($p \leq 0,05$)

Отже, зробивши аналіз даних, можна зробити висновки, що перехід на екзогенне живлення у личинок риб протягом перших 7 діб супроводжується проявами оксидативного стресу, внаслідок чого спостерігаються підвищені активності супероксиддисмутази та каталази. Застосування артемії, інкапсульованої лактобацилами, призводить до зниження величини активності СОД, проте підвищує каталазну активність, що, ймовірно, зумовлено синтезом пробіотиком перексиду водню.

ВИСНОВКИ

1. Максимальний рівень супероксиддисмутази та каталази активності гомогенату личинок стерляді встановлено на 7у добу вигодовування наупліями артемії.
2. Використання як живого корму артемії, інкапсульованої пробіотичними лактобактеріями *Lactobacillus acidophilus* ІМВ В-7279, призводить до зниження величини активності СОД в гомогенаті личинок стерляді через тиждень вигодовування.
3. Застосування пробіотичного препарату *Lactobacillus acidophilus* супроводжується істотним зростанням рівня каталази активності – у 1,6 рази у порівнянні з контролем та більш як в 3 рази в порівнянні зі значенням до годівлі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180-183.)
2. Wu H., Song J., Zhang X., Liu Y., Liu J. (2020). The oxidative stress and antioxidant responses of fish under different stressors (review). *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(4), 1355-1370.)
3. Wang Y., Xu X., Liang X., Shi W. (2019). Effects of pollutants on oxidative stress in fish: A review. *Environment International*, 125, 250-259)
4. Чжан Х., Гонг Я., Лю Ш. та ін. Оксидативний стрес в риб: механізми, ефекти та заходи протидії // *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. - 2014. - Т. 24. - №. 2. - С. 427-461.
5. Міронюк І. Оксидативний стрес в риб // *Актуальні проблеми біології та екології*. - 2016. - Т. 1. - С. 45-49.
6. Галан Ю., Карпова Е. Оксидативний стрес у риб: механізми впливу та заходи протидії // *Біофізика*. - 2016. - Т. 61. - №. 6. - С. 1084-1094.
7. Костік, В.В., Мельниченко, Г.О., Безрук, М.О. та ін. (2016). Біомаркери оксидативного стресу у риб. *Мікроелектроніка та комп'ютерні системи*, 3(85), 53-58.
8. Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B. P. and Scarcelli, V. (2016). Oxidative stress biomarkers in two resident fish species, European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and mullet (*Liza aurata*), from a polluted area of the Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 107(1), 54-60.
9. Данчук, М. Антиоксидантні властивості ненасичених жирних кислот у риб'ячій олії / М. Данчук, О. І. Кульчицька, І. П. Загурський // *Харчова наука і технологія*. - 2015. - Т. 9, № 2. - С. 99-105.
10. Скворцова, В. П. Антиоксидантна система м'яких тканин риб різних екологічних груп / В. П. Скворцова, А. І. Тихонов // *Український біофармацевтичний журнал*. - 2017. - № 1 (46). - С. 11-16.

11. Rainieri, S., Zanetti, L., & Sacchi, R. (2019). Antioxidant and Immune Responses of Fish to Aquatic Pollution: A Review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 575–593.
12. De Angelis M, Gobbetti M. *Lactobacillus* spp.: General Characteristics. Reference Module in Food Science. University “Aldo Moro” of Bari, Ital; 2016. doi:10.1016/ b978-0-08-100596-5.00851-9.
13. Glushanova NA. [Biological properties of *Lactobacillus*]. *Bulletin of sebir medicine*. 2003; 4:50–58. Russian.
14. Tang W, Xing Z, Li C, Wang J, Wang Y. Molecular mechanisms and in vitro antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2. *Food Chemistry*. 2017; 221:1642–1649. doi:10.1016/ j.foodchem.2016.10.124.
15. Min WH, Fang XB, Wu T, Fang L, Liu CL, Wang J. Characterization and antioxidant activity of an acidic exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* JLAU103. *J Biosci Bioeng*. 2018; 1389–1723(18):30832–6. doi:10.1016/j.jbiosc.2018.12.004.
16. Aguilar-Toalá JE, Estrada-Montoya MC, Liceaga AM, Garcia HS, González-Aguilar GA, Vallejo-Cordoba B, et al. An insight on antioxidant properties of the intracellular content of *Lactobacillus casei* CRL-431. *LWT*. 2019 102:58–63. doi.org/10.1016/j. lwt.2018.12.015.

Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях

Дозволяється працювати лише на заземлених об'єктах.

Приміщення хімічних лабораторій обладнуються вентиляцією, а місця можливого накопичення шкідливих хімічних речовин – відсмоктувачами.

Підлоги лабораторій повинні мати рівну, неслизьку, зручну для очищення поверхню, бути стійкими до дії механічних навантажень, вологи і агресивних середовищ.

Кожен працівник у лабораторії повинен мати закріплене за ним робоче місце.

Перед початком роботи слід одягти спецодяг (халат).

У спецодязі забороняється знаходитись за межами лабораторії.

При можливості скляний посуд і скляні частини замінюють пластиковими.

Нагріваючи рідину в пробірці або інших посудинах, їх тримають спеціальними утримувачами так, щоб отвір був спрямований від себе і працюючих поруч.

При перенесенні посудин із гарячою рідиною користуються рушником, посудину при цьому тримають обома руками: однією за дно, а другою за горловину.

При переливанні рідин (крім тих, що містять біологічний матеріал) користуються лійкою.

При розведенні речовин, що супроводжуються виділенням тепла, користуються термостійким хімічним посудом.

При роботі з кислотами та лугами виконують такі заходи безпеки:

- усю роботу з концентрованими кислотами та лугами проводять у витяжній шафі, користуючись при цьому окулярами, гумовими рукавичками та фартухом;

- концентровану кислоту відбирають із посудини тільки за допомогою спеціальної піпетки з грушею або сифоном;
- при приготуванні розчинів кислот спочатку в посудину наливають необхідну кількість води, а потім додають кислоту. Забороняється додавати воду в кислоту;
- при приготуванні розчинів лугів наважку лугу опускають у велику широкогорлу посудину, заливають необхідною кількістю води і старанно перемішують. Шматки лугу варто брати тільки щипцями;
- концентровані кислоти і луги виливають у раковину після попередньої їх нейтралізації.

При роботі з легкозаймистими речовинами (ефір, бензин, бензол, ацетон, спирт та ін.) дотримуються такої вимоги:

- усі роботи проводяться у витяжній шафі при ввімкненій вентиляції, вимкнутих газових пальниках і нагрівальних електроприладах.

Категорично забороняється:

- доручати проведення робіт із вогнебезпечними речовинами недосвідченому співробітнику;
- під час роботи в приміщенні запалювати сірники, палити, включати прилади, при роботі яких може виникнути іскра.

Після закінчення роботи із шкідливими речовинами необхідно:

- привести в порядок робоче місце;
- залишки шкідливих речовин здати на зберігання;
- старанно вимити руки з милом.

Забороняється використовувати речовини без етикеток та із закінченим терміном зберігання;

Після закінчення роботи необхідно вимити та висушити посуд, прибрати робоче місце, провітрити приміщення, відключити всі нагрівальні та освітлювальні прилади, закрутити водопровідні та газові крани.

Категорично забороняється працювати в лабораторії одному.

Виходячи з лабораторії, обов'язково перевірити, чи вимкнені газ, вода,

електроенергія.

Надання першої допомоги

При виникненні пожежі в лабораторії необхідно негайно вимкнути газ та нагрівальні прилади, прибрати легкозаймисті рідини, вогонь засипати піском. Великий вогонь гасять за допомогою вогнегасника. Не можна задувати палаючу рідину або заливати її водою. Якщо на людині палає одяг, її треба швидко закутати в ковдру, халат або покласти на підлогу і, перекочуючи, збивати полум'я.

У всіх лабораторіях у доступному постійному місці має бути аптечка з набором необхідних матеріалів і медикаментів.

При теплових опіках роблять примочку з розчином 2 %-го KMnO_4 , а потім наносять мазь від опіків.

При хімічних опіках шкіри необхідно насамперед видалити речовину, що викликала опік, відповідним розчинником, а потім уражену ділянку обробити етиловим спиртом і змастити маззю від опіків.

При опіках кислотами ушкоджене місце обмивають водою з крану, а потім 3 %-вим розчином натрій гідрокарбонату (питної соди); при опіках їдкими лугами – водою, а потім 2 %-вим розчином оцтової або борної кислоти і знову водою.

При опіках очей кислотою необхідно промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у розчині питної соди, і знову змити водою; при опіках очей лугом – промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 2 %-му розчині борної кислоти, і знову промити водою. Після цього необхідно звернутись до лікаря.

При порізах склом у першу чергу необхідно пінцетом, попередньо промитим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, рану промити дистильованою водою або протерти тампоном, змоченим в етиловому спирті, а далі змастити 5 %-вим розчином йоду та забинтувати. Невеликі порізи можна

заклеїти антисептичним пластиром.

При ураженні електрострумом насамперед необхідно відключити електроенергію, а потім, якщо необхідно, зробити штучне дихання та викликати швидку допомогу.

При інгаляційних ураженнях потрібно негайно вийти на свіже повітря.