KOMUNIKATY RYBACKIE
Nr 2 (145)/2015, 4 – 13

Katarzyna Pałczyńska-Guguła, Halyna Tkachenko, Natalia Kurhaluk, Ewa Górska

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

Bioakumulacja pierwiastków i markery stresu oksydacyjnego w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej (*Salmo trutta* L.) z dorzecza Słupi

Wstęp

Słupia jest jedną z najlepiej znanych wędkarzom rzek Pomorza Środkowego. Co roku na różnych jej odcinkach odbywają się zawody wędkarskie. Słupia należy do rzek przymorskich. Całe jej dorzecze leży w granicach województwa pomorskiego. Długość Słupi wynosi 138,6 km, a powierzchnia jej zlewni – 1310 km^2 (dane wg „Podziału hydrograficznego Polski" 1983 r. – http://www.kzgw.gov.pl/pl/rastrowa-mapa-podzialu-hydrograficznego-polski.html oraz http://dolinaslupi.pl/przyroda-2/wody/rzeki/).

Do dopływów Słupi należą między innymi:

- Rzeka Glaźna – dopływ prawobrzeżny o długości 15 km i powierzchni zlewni 86 km^2. Źródła znajdują się w okolicy miejscowości Wielogłowy. Przepływa przez wieś Krępa Słupska i do Słupi uchodzi przy zachodniej granicy tej wsi, powyżej Słupska (Dębowski i in. 2000).
- Rzeka Skotawa – dopływ prawobrzeżny, a zarazem najdłuższy dopływ Słupi o długości 45 km i powierzchni zlewni 263 km^2. Skotawa ma swoje źródła w jeziorze Lipieniec Duży, w pobliżu osady Soczyca, a do Słupi uchodzi na jej 75 kilometrze (Dębowski i in. 2000).
- Rzeka Kamienna – dopływ lewobrzeżny o długości 9 km i powierzchni zlewni 26 km^2. Źródła znajdują się w okolicy wsi Podwilczyn, na północ od jeziora Rybiec. Do Słupi uchodzi naprzeciwko ujścia Skotawy (Dębowski i in. 2000).
- Rzeka Kwacza – dopływ lewobrzeżny o długości 21 km i powierzchni zlewni 85 km^2. Źródła Kwaczy znajdują się w okolicy miejscowości Sycewice, przepływa przez wieś Kwakowo, a do Słupi uchodzi na jej 83 kilometrze (Dębowski i in. 2000).

Do najcenniejszych ryb występujących w Słupi należą łosoś atlantycki *Salmo salar* oraz troć wędrowna, *Salmo trutta* morpha *trutta* L., zaliczane do rodziny łososiowatych Salmonidae (fot. 1 i 2). Są to typowe ryby dwuśrodowiskowe anadromiczne, wędrujące na tarło z mórz do rzek (Nyk 1997).

Fot. 1. Troć wędrowna.

Fot 2. Młodociany osobnik troci wędrownej.

W trakcie rozwoju troci wędrownej występuje młodociane (narybkowe) stadium smolta. W stadium smolta trocie spływają z rzek pomorskich do Bałtyku. Podczas smoltyfikacji, poprzedzającej wędrówkę do morza, następują zmiany w ubarwieniu ciała młodych troci oraz zmiany w ich układzie osmoregulacyjnym, przystosowujące organizmy tych ryb do życia w słonej wodzie morskiej (Grodziński 1961, Opuszyński 1983, Brylińska 2000, Miller 2006, Utracka-Minko i in. 2006, Putman i in. 2013).

Na występowanie ryb wędrownych w wodach otwartych decydujący wpływ ma stan ekologiczny tych akwenów (Lucas i Baras 2001, Bartel 2002, Wiśniewolski i Engel 2006). Do czynników wpływających na obecność troci wędrownej w danej rzece zalicza się: charakter rzeki, zarybianie, obecność lub brak barier hydrotechnicznych, stan czystości wód, stopień przekształceń antropogenicznych doliny, ochronę przed kłusownictwem oraz eksploatację rybacką i wędkarską.

Zanieczyszczenie wód, regulacja nadbrzeży i dna rzek, wylesianie dolin rzecznych oraz zabudowa hydrotechniczna doprowadziły do znacznego zmniejszenia się terenów tarliskowych oraz miejsc nadających się do wzrostu narybku ryb anadromicznych w większości rzek i cieków na terenie Polski. Problem ten dotyczy szczególnie gatunków zagrożonych, które objęto programem restytucji, takich jak m.in. troć wędrowna (Sych 1998). Kluczowe znaczenie w nowocześnie pojmowanej gospodarce trocią wędrowną oraz dla jej ochrony gatunkowej ma prowadzony na bieżąco monitoring zmian zachodzących w środowisku, wywołanych silną antropopresją (Lejk i Martyniak 2011).

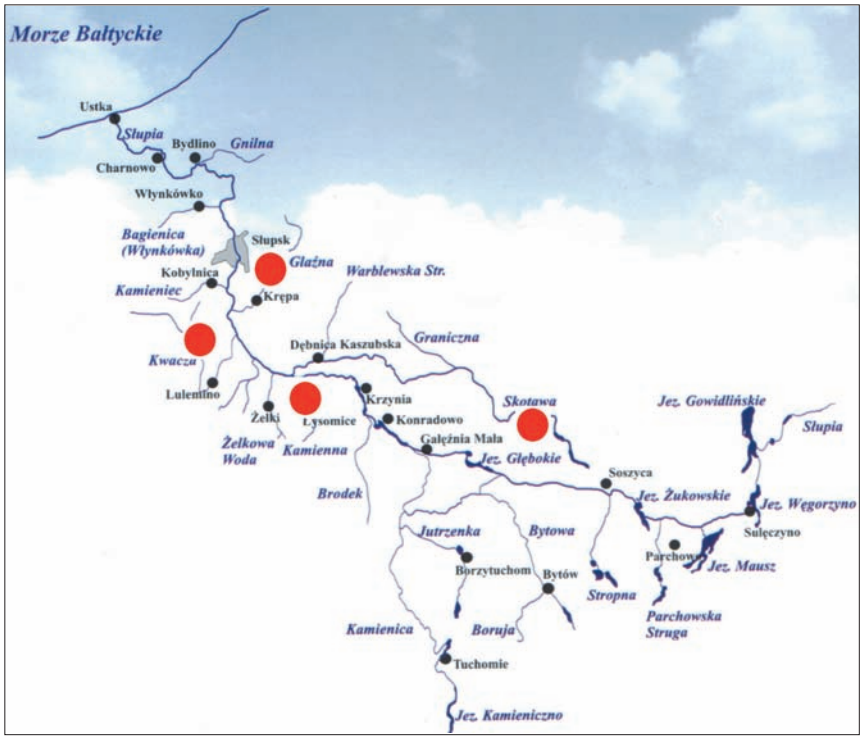
Organizmy żyjące w środowisku wodnym podlegają wpływom różnorodnych czynników stresogennych, które w zależności od siły i czasu oddziaływania mogą modyfikować procesy fizjologiczne, a w skrajnych przypadkach zmniejszać szanse przeżycia. Do czynników stresogennych zalicza się czynniki naturalne (zbyt wysoka lub zbyt niska temperatura, dostępność pokarmu, interakcje z innymi organizmami) oraz substancje chemiczne wprowadzane do środowiska przez człowieka. Wymienione elementy składają się na pojęcie „stresu środowiskowego", rozumianego jako zespół oddziaływań o charakterze stresotwórczym lub jako odpowiedź organizmu na tego typu czynniki. Stresory oddziałują bezpośrednio na poziomie komórki, chociaż przesunięte w czasie pośrednie skutki ich oddziaływań mogą się manifestować na wyższych poziomach organizacji biologicznej (Wilczek 2008).

W badaniach ekotoksykologicznych rozwijane są koncepcje, w których oceniając efekty działania różnorodnych składowych stresu środowiskowego, korzysta się z biomarkerów, definiowanych jako „molekularne, biochemiczne, histologiczne lub fizjologiczne parametry, które na poziomie poniżej organizmu zmieniają się proporcjonalnie do stopnia ekspozycji zwierząt na działanie czynników zanieczyszczających ich środowisko" (Depledge i Fossi 1994), bądź też rozumianych jako „zmiana na poziomie molekularnym, która może służyć za wskaźnik poziomu stresu spowodowanego przez dowolny czynnik środowiskowy" (Laskowski i Migula 2004).

Aby w pełni poznać kondycję fizjologiczną danej grupy organizmów, wskazane jest użycie szerokiego spektrum parametrów, które pozwoliłyby ocenić procesy metaboliczne zachodzące w komórkach, a tym samym rozstrzygać o stopniu „uciążliwości" czynników stresogennych dla organizmu. Z tego względu, że troć wędrowna uznawana jest za jeden z najcenniejszych pod względem przyrodniczym, gospodarczym oraz wędkarskim gatunków ichtiofauny rzeki Słupi, wyznaczyliśmy sobie za cel zbadanie markerów stresu oksydacyjnego i zawartości wybranych pierwiastków w tkance mięśniowej smoltów tej ryby, występujących w dorzeczu Słupi.

Materiał i metody badań

Materiał do badań pobrano od 175 młodocianych osobników troci wędrownej wielkości od 10 do 20 cm zasiedlających cztery dopływy Słupi – Glaźnę, Skotawę, Kamienną i Kwaczą. Odłowy smoltów przeprowadzono na czterech stanowiskach (rys. 1 i fot. 3-6):



Rys. 1. Stanowiska badawcze na czterech dopływach rzeki Słupi – Glaźnie, Skotawie, Kamiennej i Kwaczy.

Fot. 3. Stanowisko badawcze na rzece Glaźnie.

Fot. 4. Stanowisko badawcze na rzece Skotawie.

Fot. 5. Stanowisko badawcze na rzece Kamiennej.

Fot. 6. Stanowisko badawcze na rzece Kwaczy.

Stanowisko 1 – rzeka Glaźna;
Stanowisko 2 – rzeka Skotawa;
Stanowisko 3 – rzeka Kamienna;
Stanowisko 4 – rzeka Kwacza.

Odłowy smoltów przeprowadzono metodą elektropołowów, za pomocą agregatu prądotwórczego z przystawką na prąd stały, w ścisłej współpracy z Parkiem Krajobrazowym „Dolina Słupi" oraz z Zarządem Okręgu Polskiego Związku Wędkarskiego w Słupsku.

W celu wykonania oznaczeń chemicznych i biochemicznych (tzn. zbadania poziomu biopierwiastków i wykonania próby tkanki mięśniowej), z każdej ryby pobierano tkankę mięśniową na wysokości płetwy grzbietowej, powyżej linii bocznej. W celu określenia stężenia magnezu (Mg), wapnia (Ca), cynku (Zn), manganu (Mn), miedzi (Cu) i żelaza (Fe) pobraną tkankę poddawano mineralizacji w mieszaninie kwasu azotowego (HNO_3) i nadtlenku wodoru (H_2O_2). Oznaczenia zawartości mikro- i makroelementów wykonano 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 wapń i magnez, w celu wyeliminowania oddziaływania fosforu, do wszystkich próbek dodawano roztwór chlorku lantanu ($LaCl_3$) w ilości zapewniającej półprocentowe (0,5%) stężenie jonów lantanu (La^{3+}) w badanych roztworach. Zawartość Mn, Cu, Zn i Fe wyrażono w miligramach na kilogram świeżej masy, natomiast zawartość Ca i Mg wyrażono w mg na 100 gramów świeżej masy.

W celu wykonania analiz biochemicznych, tkankę mięśniową poddawano procesowi homogenizacji w schłodzonym buforze 0,1 M Tris-HCl (pH 7,2) w stosunku 1:10. Otrzymany w ten sposób homogenat stanowił właściwy materiał badawczy, poddawany dalszym analizom. Poziom białka oznaczono metodą Bradford (1976). Intensywność procesów peroksydacji lipidów, które są biomarkerami oksydacyjnych zmian lipidowych błon komórkowych (Kamyshnikov 2004), wyznaczono przez pomiar poziomu produktów reagujących z kwasem 2-tiobarbiturowym (TBARS). 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 nanomolach na mg białka.

Aktywność enzymu dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oznaczono w reakcji z kwercetyną (Kostiuk i in. 1990), aktywność katalazy – w reakcji z solami molibdenianu

(Koroliuk i in. 1988), aktywność peroksydazy glutationowej – w reakcji z odczynnikiem Elmana (Moin 1986), natomiast aktywność reduktazy glutationowej – w reakcji utlenionego glutationu z wykorzystaniem jako ekwiwalentu $NADPH_2$ (Glatzle i in. 1974).

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 w celu sprawdzenia normalności rozkładu danych. Wszystkie uzyskane dane znajdowały się poza rozkładem normalnym. Do określenia istotności różnic pomiędzy stężeniem pierwiastków *i* biomarkerami stresu oksydacyjnego w grupach ryb z różnych rzek wykorzystano rangowy test statystyczny Kruskala-Wallisa ($p<0,05$) (Zar 1999).

TABELA 1

Zawartość mikro- i makroelementów w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej (*Salmo trutta* m. *trutta* L.) bytujących w czterech dopływach Słupi (rzeki Glaźna, Skotawa, Kwacza, Kamienna), M±m

Rzeki	Mn	Cu	Zn	Fe	Ca	Mg
	mg/kg świeżej masy				mg/100 g świeżej masy	
Glaźna	0,024±0,002^{ac}	0,65±0,05	5,09±0,46^{b}	6,51±0,67^{b}	11,06±1,14	27,62±1,94
Skotawa	0,032±0,002^{ad}	0,63±0,05	5,47±0,58^{d}	5,0±0,87	10,83±0,87	29,35±2,17
Kamienna	0,044±0,004^{ce}	0,70±0,05	6,88±0,46^{e}	7,53±1,01^{e}	9,10±0,54	26,63±1,91
Kwacza	0,024±0,002^{de}	0,67±0,05	1,63±0,22^{bde}	4,45±0,56^{be}	11,38±0,86	30,73±2,50

a – zmiany statystycznie istotne ($p<0,05$) pomiędzy wartościami w grupach smoltów bytujących w rzekach Glaźna i Skotawa, b – zmiany statystycznie istotne ($p<0,05$) pomiędzy wartościami w grupach smoltów bytujących w rzekach Glaźna i Kwacza, c – zmiany statystycznie istotne ($p<0,05$) pomiędzy wartościami w grupach smoltów bytujących w rzekach Glaźna i Kamienna, d – zmiany statystycznie istotne ($p<0,05$) pomiędzy wartościami w grupach smoltów bytujących w rzekach Skotawa i Kwacza; e – zmiany statystycznie istotne ($p<0,05$) pomiędzy wartościami w grupach smoltów bytujących w rzekach Kamienna i Kwacza.

Wyniki i dyskusja

Pierwiastki występujące w wodach w bardzo małych stężeniach i pobierane przez organizmy w śladowych ilościach, nazywamy mikroelementami lub pierwiastkami śladowymi (mikropierwiastkami). Wysokie stężenie mikropierwiastków notuje się zwykle w środowiskach zanieczyszczonych (Starmach i in. 1978). Bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na zanieczyszczenia wód powierzchniowych są metale ciężkie. Metale wnikają do organizmu ryb poprzez układ oddechowy, przez pokrycie ciała oraz przez układ pokarmowy (z pobranego pokarmu, wody i z połkniętych przez ryby osadów dennych). Metale ciężkie wpływają negatywnie na parametry morfologiczne krwi, na aktywność enzymów i transport białek oraz na funkcjonowanie tkanek i narządów. Metale te charakteryzują się różnym stopniem toksyczności w stosunku do ryb. Gdy poziom ekspozycji nie przekracza dawki śmiertelnej, zatrucia przejawiają się w postaci uszkodzenia strukturalnego (histologicznego lub morfologicznego), biochemicznego (hematologicznego i enzymatycznego), funkcjonowania (wzrost, rozwój) oraz reprodukcji (Damek-Poprawa i Sawicka-Kapusta 2004).

Sole metali powodują u ryb widoczne uszkodzenia skóry i skrzeli. Komórki naskórka i nabłonka skrzelowego ulegają pęcznieniu oraz zmianom martwiczym. W grubej warstwie gęstego śluzu pokrywającego skórę i skrzela widoczne są pozostałości złuszczonych komórek (Prost 1980, Łysak i in. 1990).

Pierwsze symptomy zatrucia ryb pierwiastkami śladowymi polegają na niespokojnym zachowaniu, przyśpieszeniu rytmu oddechowego oraz zwiększeniu wydzielania śluzu. Natomiast dłuższe przebywanie ryb w środowisku skażonym może prowadzić do nieodwracalnych zmian w gospodarce witaminami oraz do zaburzenia szlaków enzymatycznych. Wyrazem ogólnego osłabienia i niedotlenienia jest ,,dzióbkowanie" ryb, brak reakcji na bodźce zewnętrzne i zaburzenia równowagi widoczne w sposobie poruszania się (Prost 1980, Łysak i in. 1990).

W letalnych stężeniach roztworów soli metali ciężkich dochodzi do coraz powolniejszych ruchów, zwolnionego, nieregularnego rytmu oddychania oraz do śmierci ryb. Wartości średnich arytmetycznych i błąd standardowy średniej dla stężeń metali oraz zmiany istotne statystycznie w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej, bytujących czterech dopływach Słupi przedstawiono w tabeli 1.

Najwyższy poziom manganu (0,044 mg/kg) stwierdzono w próbach pochodzących od smoltów zasiedlających rzekę Kamienną. Poziom tego pierwiastka był identyczny w grupach ryb pochodzących z Glaźny oraz Kwaczy (tab. 1). Różnice istotne statystycznie pomiędzy stężeniem manganu odnotowano w grupach ryb pochodzących z Glaźny i Skotawy, Glaźny i Kamiennej oraz Skotawy i Kwaczy. Stwierdzono wyższe stężenie tego pierwiastka u smoltów ze Skotawy w porównaniu ze smoltami z Glaźny (o 33%, $p<0,05$) oraz z Kamiennej (o 83%, $p<0,05$). W grupie smoltów pochodzących z Kwaczy stężenie manganu było niższe niż u ryb pochodzących ze Skotawy (o 33%, $p<0,05$). Według Łuczyńskiej i in. (2011) stężenie manganu w tkance mięśniowej pstrąga kształtowało się na poziomie 0,072 mg/kg i na poziomie 0,081 mg/kg u łososia.

Mangan ze względu na swą różną wartościowość przedostaje się do wód w stopniu zależnym od warunków utleniająco-redukcyjnych. Brak manganu w wodzie wywołuje u zwierząt zaburzenia wzrostu i rozmnażania. Pierwiastek ten aktywuje enzymy związane z rozpadem węglowodanów i wraz z żelazem bierze udział w redukcji azotanów. Jest on antagonistą wapnia (Starmach i in. 1978).

Przeprowadzone badania wykazały, że poziom miedzi w badanych grupach ryb pochodzących z czterech różnych

rzek kształtował się na zbliżonym poziomie (tab. 1). Nie wykazano żadnych statystycznie istotnych różnic w stężeniu miedzi w tkance mięśniowej młodocianych osobników troci wędrownej, pochodzących z czterech dopływów Słupi (tab. 1). Według Řehulka (2002), zawartość miedzi w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego wynosiła 0,360 mg/kg. Podobne wyniki uzyskała Drąg-Kozak i in. (2011) w badaniach miedzi w mięśniach pstrąga tęczowego (0,54 mg/kg).

Miedź jest elementem składowym wielu metaloenzymów. Około 60% miedzi zawartej w osoczu występuje w kompleksie z białkiem zwanym ceruloplazminą, która jest potrzebna do utleniania jonów żelaza Fe(II) do Fe(III) i wbudowywania żelaza w hemoglobinę. Metal ten w najwyższych stężeniach jest pierwiastkiem bardzo toksycznym dla komórek, generuje bowiem rodnik hydroksylowy powodując peroksydację lipidów (Skrajnowska i in. 2010).

Głównym źródłem zanieczyszczenia wód związkami miedzi są ścieki przemysłowe, środki chemiczne stosowane w rolnictwie i w hodowli ryb oraz środki przeciwgrzybiczne. Toksyczność związków miedzi dla ryb zależy od stopnia twardości wody. Najbardziej toksyczne są roztwory soli miedziowych w wodach miękkich. Natomiast w wodach twardych tworzą się nierozpuszczalne węglany i wodorotlenki miedzi o znacznie mniejszej szkodliwości dla ryb. Toksyczność zanieczyszczeń zawierających miedź zwiększa się znacznie w obecności związków innych metali, np. kadmu i cynku. Wodorotlenek miedzi $Cu(OH)_2$ tworzy nierozpuszczalny osad, który może pokrywać skrzela i powodować śnięcie ryb (Starmach i in. 1978).

Najwięcej cynku w tkance mięśniowej odnotowano u smoltów z rzeki Kamiennej (6,88mg/kg), a najmniej u smoltów zasiedlających Kwaczę (1,63 mg/kg). Poziom tego pierwiastka utrzymywał się na zbliżonym poziomie w grupach ryb pochodzących z Glaźny i Skotawy (tab. 1). Statystycznie istotne różnice wykazano u smoltów pochodzących z Glaźny i Kwaczy oraz Skotawy i Kamiennej. Stężenie cynku w mięśniach smoltów pochodzących z Kwaczy było niższe niż u smoltów z Glaźny (o 212%, $p<0,05$), Skotawy (o 236%, $p<0,05$) i z Kamiennej (o 322%, $p<0,05$). Podobne wyniki uzyskali Čelechovska i in. (2007) w tkance mięśniowej karpi (5,3 mg/kg) oraz Łuczyńska i in. (2000a, b, 2011) w przypadku pstrąga (3,34 – 4,99 mg/kg) i łososia (2,80 – 4,02 mg/kg).

Cynk jest kofaktorem wielu enzymów proteolitycznych zwanych metaloproteinazami oraz innych enzymów, np. dysmutazy ponadtlenkowej. Pierwiastek ten zmagazynowany jest w komórkach w postaci metaloproteiny zwanej metalotioneiną, która wiąże miedź i inne metale ciężkie. Metalotioneina jest obecna w wielu tkankach, a jej synteza jest indukowana przez cynk (Zn), miedź (Cu) i kadm (Cd), a także przez bizmut (Bi) oraz arsen (As). Białko to chroni komórkę przed toksycznym oddziaływaniem jonów wymienionych metali. Cynk wchodzi w skład dysmutazy ponadtlenkowej (Zn-SOD) oraz uczestniczy w eliminacji wolnych rodników ponadtlenkowych. Zanieczyszczenia naturalnych wód cynkiem pochodzą przede wszystkim ze ścieków fabrycznych. W zbiornikach wodnych najczęściej występują chlorek cynku ($ZnCl_2$) oraz siarczan cynku ($ZnSO_4$). Ryby, a zwłaszcza narybek są bardzo wrażliwe na działanie soli tego metalu. W wodach miękkich i lekko kwaśnych rozpuszczalność, a zatem i toksyczność cynku znacznie wzrasta. Toksyczne oddziaływanie na ryby wykazuje również wodorotlenek cynku ($Zn(OH)_2$). Przy wysokim stężeniu może się on osadzać jako nierozpuszczalny osad na skrzelach, utrudniać lub uniemożliwiać oddychanie i powodować śnięcie ryb. Ryby wchłaniają związki cynku przez przewód pokarmowy, a następnie kumulują je w wątrobie (Liebmann 1960).

Zawartość żelaza mieściła się w granicach od 4,45 mg/kg u smoltów pochodzących z Kwaczy do 7,53 u smoltów z Kamiennej. Statystycznie istotne różnice stężenia żelaza wykazano dla grup smoltów pochodzących z Glaźny i Kwaczy. U ryb odłowionych w Kwaczy stężenie żelaza było niższe niż u smoltów z Glaźny (o 46%, $p<0,05$) i Kamiennej (o 69%, $p<0,05$) (tab. 1).

Markerem stresu oksydacyjnego z udziałem reaktywnych form tlenu (RFT) może być również podwyższone stężenie jonów żelaza. Żelazo, zwłaszcza na II stopniu utlenienia jest katalizatorem reakcji Fentona, w przebiegu której powstaje rodnik wodorotlenowy, najbardziej toksyczny z RFT. Powyższy rodnik może reagować z DNA oraz lipidami, a w konsekwencji może być przyczyną wielu chorób. Dla ryb toksyczne są zarówno jony trójdodatnie (Fe^{3+}), jak i dwudodatnie (Fe^{2+}) żelaza. Spośród związków żelaza trójwartościowego o toksycznym oddziaływaniu na ryby wymienić należy chlorek żelazowy ($FeCl_3$), siarczan żelazowy ($Fe_2(SO_4)_3$) oraz wodorotlenek żelazowy ($Fe(OH)_3$). Chlorek żelazowy, zwłaszcza w wodzie miękkiej, powoduje obniżenie jej pH, co jest bardzo szkodliwe dla ryb. Natomiast wodorotlenek żelazowy tworzy nierozpuszczalny, rdzawy osad na skrzelach, co może być przyczyną śnięcia ryb z powodu uduszenia. Wykazuje on także żrące działanie na tkanki skrzeli, co często powoduje ich stan zapalny (Prost 1980). Ponadto nadmiar żelaza zakłóca metabolizm innych metali śladowych, np. unieczynnia mangan (Kabata-Pendias 1999).

Najniższy poziom wapnia (9,10 mg/100 g) oraz magnezu (26,63 mg/100 g) odnotowano w tkance mięśniowej smoltów troci pochodzących z rzeki Kamiennej. Stężenie wapnia u smoltów z Glaźny (11,06 mg/100 g) i Kwaczy (11,38 mg/100 g) było porównywalne (tab. 1).

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w poziomie wapnia i magnezu u smoltów bytujących w czterech dopływach Słupi, w których prowadzono badania (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/100g, a u łososia 22,1-24,5 mg/100g. Natomiast w przypadku wapnia 7,6-10,3 mg/100g i 10,0-16,5 mg/100g odpowiednio.

Magnez wraz z wapniem wchodzą w skład wielu enzymów biorących udział w reakcjach biochemicznych, dostarczających energii i zwalczających stres oksydacyjny. Pierwiastki te zmniejszają przepuszczalność błon komórkowych oraz warunkują prawidłowe funkcjonowanie układu mięśniowego i nerwowego (Bańkowski 2006).

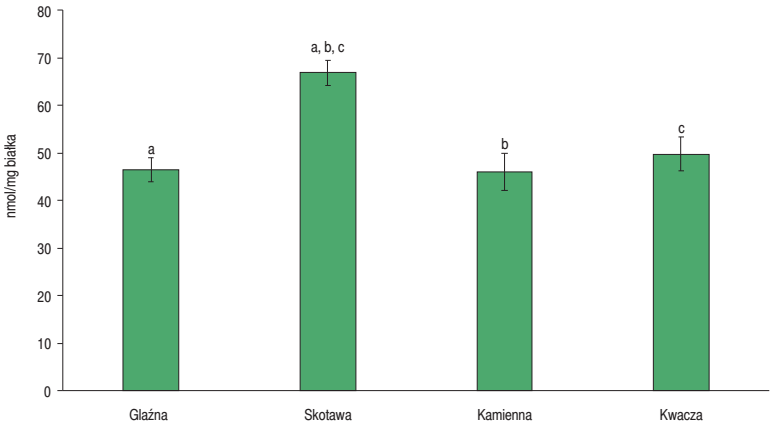
W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się zaburzeniom równowagi pomiędzy wytwarzaniem RFT a wydolnością układu antyoksydacyjnego w zaburzeniach homeostazy organizmu. Nadmiar RFT może powodować uszkodzenie różnych struktur biologicznych w wyniku utleniania wchodzących w ich skład związków chemicznych. Stan, w którym RFT zyskują przewagę nad układem antyoksydacyjnym określany jest stresem oksydacyjnym (Matyska-Piekarska i in. 2006).

Liczne badania naukowe dotyczące stresu oksydacyjnego wykazały podwyższone stężenie markerów tego stresu w warunkach zanieczyszczonego środowiska (Badwey i in. 1981, Lee i in. 1993, Weissmann i in. 1980). Do najczęściej oznaczanych markerów stresu oksydacyjnego u ryb należą: dialdehyd malonowy (MDA), grupy aldehydowe i karbonylowe oksydacyjnie zmienionych białek (Kamanli i in. 2004, Dalle-Donne i in. 2003).

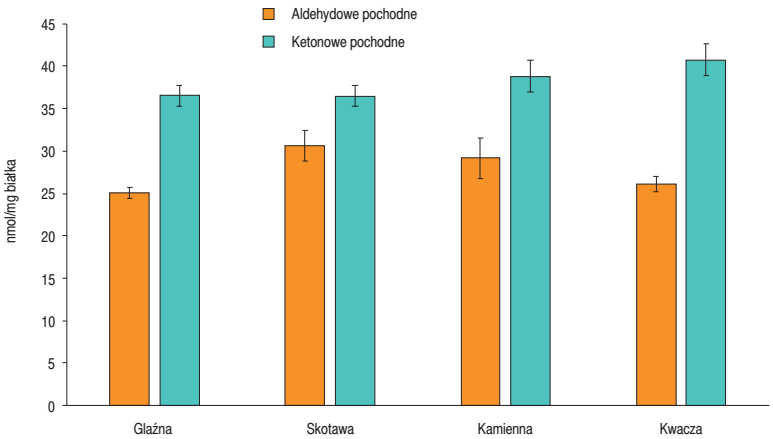
Wykazano, że w tkankach badanych smoltów troci wędrownej średni poziom TBARS wynosi dla rzeki Glaźny 46,4 nmol/mg białka, dla Skotawy 66,81 nmol/mg białka, dla Kamiennej 46,03 nmol/mg białka, a dla Kwaczy 49,77 nmol/mg białka (rys. 2). Różnice istotne statystycznie odnotowano dla grup smoltów zasiedlających Glaźnę i Skotawę, Skotawę i Kamienną oraz Skotawę i Kwaczę. U ryb odłowionych w Skotawie stwierdzono wyższy poziom TBARS w porównaniu z rybami z Glaźny (o 44%, $p<0,05$) oraz wyższy jego poziom w porównaniu z rybami odłowionymi w Kamiennej i Kwaczy (o 45% i 34% odpowiednio, $p<0,05$). Stosunkowo wysoki poziom TBARS u smoltów ze Skotawy może wskazywać na nasilenie stresu oksydacyjnego w ich tkance mięśniowej w porównaniu ze smoltami z trzech pozostałych dopływów Słupi, spowodowany prawdopodobnie wyższym stopniem zanieczyszczenia tej rzeki.

Peroksydacja lipidów błon komórkowych indukowana przez wolne rodniki należy do procesów dobrze poznanych (Shevchuk i in. 2002, Bartosz 2003, Kulbacka i in. 2009). Wolnorodnikowy proces utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych i innych lipidów, w którym powstają nadtlenki tych związków zaburza funkcje komórek (Halliwell i in. 1992, Maxwell 1995). Do najgroźniejszych toksycznych produktów peroksydacji lipidów należą aldehydy (dialdehyd malonowy), które blokują grupy SH białek, powodują inhibicję enzymów komórkowych oraz uszkodzenia DNA. W wyniku peroksydacji lipidów obserwuje się zmniejszenie płynności błon komórkowych oraz zwiększenie ich przepuszczalności dla wielu jonów i związków oraz uszkodzenie enzymów błonowych. Dialdehyd malonowy zmienia właściwości antygenowe białek, hamuje aktywność niektórych enzymów, hamuje replikację i transkrypcję DNA oraz powoduje pęknięcia nici DNA (Sakharov i in. 2005).

Obok lipidów bardzo podatne na działanie wolnych rodników są białka. Reakcje RFT z białkami prowadzą do różnego rodzaju uszkodzeń, takich jak fragmentacja, modyfikacja reszt aminokwasowych, agregacja. W wyniku tych



Rys. 2. Zmiany poziomu produktów reagujących z kwasem 2-tiobarbiturowym (TBARS) w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej bytujących w czterech dopływach Słupi (Glaźna, Skotawa, Kwacza, Kamienna), M±m. a – różnice istotne statystycznie ($p<0,05$) pomiędzy wartościami w grupach smoltów bytujących w rzekach Glaźna i Skotawa, b – zmiany statystycznie istotne ($p<0,05$) pomiędzy wartościami w grupach smoltów bytujących w rzekach Skotawa i Kamienna, c – zmiany statystycznie istotne ($p<0,05$) pomiędzy wartościami w grupach smoltów bytujących w rzekach Skotawa i Kwacza.



Rys. 3. Zmiany poziomu aldehydowych i ketonowych pochodnych oksydacyjnie zmodyfikowanych białek (OMB) w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej (*Salmo trutta* L.) bytujących w czterech dopływach Słupi (rzeki Glaźna, Skotawa, Kwacza, Kamienna).

procesów możliwa jest utrata biologicznej funkcji białka. Oksydacja białek charakteryzuje się wprowadzeniem grup karbonylowych do łańcucha bocznego białek. Oznaczenie ilości grup karbonylowych pozwala ocenić oksydacyjne uszkodzenia białek w organizmie (Dalle-Donne i in. 2003).

Rysunek 3 przedstawia wartości aldehydowych i ketonowych pochodnych dla określenia intensywności procesów oksydacyjnej modyfikacji białek w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej, bytujących w czterech dopływach Słupi. Średni poziom aldehydowych pochodnych w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej z rzeki Glaźny wynosił 25,08 nmol/mg białka, ze Skotawy – 30,62 nmol/mg białka, z Kamiennej – 29,17 nmol/mg białka, a z Kwaczy – 26,1 nmol/mg białka. Zarówno średnia wartość aldehydowych pochodnych OMB, jak i poziom peroksydacji lipidów w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej zasiedlających Skotawę mogą wskazywać na nasilenie stresu oksydacyjnego u ryb z tej rzeki, w porównaniu z rybami z trzech pozostałych dopływów Słupi.

Poziom ketonowych pochodnych w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej z rzeki Glaźny wynosił 36,55 nmol/mg białka, ze Skotawy – 36,50 nmol/mg białka, z Kamiennej – 38,81 nmol/mg białka), a z Kwaczy – 40,78) nmol/mg białka. Najwyższy poziom ketonowych pochodnych występował u smoltów zasiedlających Kwaczę, jednakże dla wartości tych pochodnych u ryb odłowionych we wszystkich czterech dopływach Słupi nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych.

Reaktywne formy tlenu (RFT) mogą powodować utlenienie tłuszczów, białek, DNA i w następstwie przyczynić się do uszkodzenia tkanek. Toksyczne produkty reakcji utleniania działają cytostatycznie na komórkę, uszkadzając błony komórkowe oraz prowadząc komórkę do śmierci na drodze apoptozy lub nekrozy. Stan równowagi komórek utrzymuje się dzięki enzymom antyoksydacyjnym, takim jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, transferaza S-glutationowa oraz dzięki innym substancjom, takim jak np. glutation czy witaminy E, C i A. Związki te umożliwiają usuwanie nadmiaru RFT z komórek (Halliwell i Gutteridge 1990). RFT są niezbędne w wielu procesach fizjologicznych w organizmie i pełnią wiele korzystnych funkcji, m.in są mediatorami i regulatorami metabolizmu, indukują apoptozę, stymulują transport glukozy do komórek, serotoniny do płytek krwi, wpływają na przekazywanie sygnałów do komórek i wewnątrz komórek, regulują ekspresję genów, aktywują białka kierujące podziałami komórkowymi oraz biorą udział w procesach obronnych organizmu (Matyska-Piekarska i in. 2006). Wyczerpanie przez organizm rezerw antyoksydacyjnych pod wpływem nadmiaru RFT prowadzi do uszkodzenia struktury białek, utleniania lipidów, uszkodzenia kwasów nukleinowych, depolimeryzacji kwasu hialuronowego. RFT inaktywują ponadto inhibitory proteinaz, co nasila ich działanie proteolityczne na tkanki (Ziemlański i Wartanowicz 1999).

Komórki organizmu dysponują naturalnymi systemami obronnymi przed nadmiarem i szkodliwym działaniem RFT. W skład tego systemu wchodzą antyoksydanty enzymatyczne i nieenzymatyczne (niskocząsteczkowe). Antyoksydantami nazywamy wszystkie substancje, które w małych stężeniach, porównywalnych do stężenia, w którym występuje utleniany substrat, mogą znacząco opóźnić lub zapobiec utlenieniu tego substratu (Halliwell i Gutteridge 1990, Halliwel i in. 1992). W skład bariery antyoksydacyjnej wchodzą enzymy, białka sekwestrujące metale, związki drobnocząsteczkowe (np. glutation, kwas moczowy, cysteina i inne) oraz witaminy C, E i A. Enzymatyczną barierę antyoksydacyjną stanowią wyspecjalizowane enzymy o aktywności przeciwutleniającej (Cadenas 1997). Głównym enzymem o działaniu antyoksydacyjnym jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD). W reakcji dysmutacji eliminuje ona ze środowiska komórki anionorodniki ponadtlenkowe, z których powstaje nadtlenek wodoru. Jest on rozkładany do wody i tlenu z udziałem katalazy lub peroksydazy glutationowej (Boon i in. 1997).

TABELA 2

Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej (*Salmo trutta* m. *trutta* L.) bytujących w czterech dopływach Słupi (rzeki Glaźna, Skotawa, Kwacza, Kamienna), M±m

Enzymy / Rzeki	Glaźna	Skotawa	Kamienna	Kwacza
Dysmutaza ponadtlenkowa, U/mg białka	526,40±33,66	448,51±32,63	510,26±29,32	441,15±36,56
Katalaza, mkmol/min·mg białka	33,80±5,44^{a}	55,09±6,71^{ab}	39,46±3,31^{c}	24,90±2,86^{bc}
Reduktaza glutationowa, nmol/min·mg białka	131,20±8,78	148,71±4,39	153,46±15,79	132,68±18,59
Peroksydaza glutationowa, mkmol/min·mg białka	50,20±2,58^{a}	82,59±8,28a	60,62±3,92	62,47±3,61

a – zmiany statystycznie istotne (p<0,05) pomiędzy wartościami w grupach smoltów bytujących w rzekach Glaźna i Skotawa, b – zmiany statystycznie istotne (p<0,05) pomiędzy wartościami w grupach smoltów bytujących w rzekach Skotawa i Kwacza; c – zmiany statystycznie istotne (p<0,05) pomiędzy wartościami w grupach smoltów bytujących w rzekach Kamienna i Kwacza

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru i tlenu, co zapobiega powstawaniu rodnika hydroksylowego. Powstały nadtlenek wodoru usuwany jest przy udziale peroksydazy glutationowej (GPx). SOD występuje w dwóch formach komórkowych: cytoplazmatycznej zawierającej miedź i cynk (Cu, Zn-SOD) oraz mitochondrialnej zawierającej mangan (Mn-SOD) (Ray i Husain 2002).

W tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej z czterech dopływów Słupi uzyskano następujące średnie dla aktywności dysmutazy ponadtlenkowej: dla smoltów z Glaźny – 526,40 U/mg białka, ze Skotawy – 448,51 U/mg

białka, z Kamiennej – 510,26 U/mg białka, a z Kwaczy – 441,15 U/mg białka. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały wysoką aktywność SOD w tkankach smoltów z Glaźny, Skotawy oraz z Kamiennej. W badanych grupach ryb nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic dla aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (tab. 2).

Aktywność katalazy w tkance mięśniowej smoltów pochodzących z rzeki Glaźny wynosiła 33,80 mkmol/min·mg białka, ze Skotawy – 55,09 mkmol/min·mg białka, z Kamiennej – 39,46 mkmol/min·mg białka, a z Kwaczy – 24,90 mkmol/min·mg białka. Różnice istotne statystycznie odnotowano pomiędzy wartościami uzyskanymi dla smoltów z Glaźny i Skotawy, Skotawy i Kwaczy oraz Kamiennej i Kwaczy. Wykazano wyższą aktywność katalazy w tkance mięśniowej ryb odłowionych w Skotawie w porównaniu z rybami z Glaźny (o 63%, $p<0,05$) oraz znacznie niższą aktywność tego enzymu u ryb z Kwaczy w porównaniu z rybami ze Skotawy (o 121%, $p<0,05$) i z Kamiennej (o 58%, $p<0,05$) (tab. 2).

Kolejnym ważnym antyoksydantem jest glutation (GSH). Glutation z udziałem peroksydazy glutationowej (GPx) usuwa szkodliwy dla organizmu nadtlenek wodoru oraz, podobnie jak tioredoksyna, redukuje utlenione grupy tiolowe białek. W wyniku tych reakcji powstaje utleniona postać glutationu (GSSG), z której ponownie jest odtwarzany GSH z udziałem reduktazy glutationowej (GR) (Comhair i Erzurum 2005). W przeprowadzonych badaniach uzyskano następujące wartości dla aktywności peroksydazy glutationowej w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej: dla smoltów z Glaźny – 50,20 mkmol/min·mg białka, ze Skotawy – 82,59 mkmol/min·mg białka, z Kamiennej – 60,62 mkmol/min·mg białka i z Kwaczy – 62,47 mkmol/min·mg białka. Różnice istotne statystycznie odnotowano pomiędzy wartościami omawianego enzymu w grupach ryb pochodzących z rzek Glaźna i Skotawa. Smolty z Glaźny charakteryzowały się najniższą aktywnością peroksydazy glutationowej w porównaniu z rybami odłowionymi w trzech pozostałych rzekach. Ponadto w grupie smoltów ze Skotawy stwierdzono wyższą aktywność tego enzymu w porównaniu ze smoltami z Glaźny (o 65%, $p<0,05$) (tab. 2). Aktywność reduktazy glutationowej (GR) w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej z Glaźny wynosiła 131,20 nmol/min·mg białka, ze Skotawy – 148,71 nmol/min·mg białka, z Kamiennej – 153,46 nmol/min·mg białka, a z Kwaczy – 132, 68 nmol/min·mg białka (tab. 2).

Podsumowanie

Według raportów Wojewódzkiego Inspektoratu Ochrony Środowiska przyczyną silnego zanieczyszczenia rzek są ścieki przemysłowe, zanieczyszczenia rolnicze, spływy powierzchniowe z miast, a także ścieki pochodzące z naszych domów. Na jakość rzeki Słupi mają wpływ zanieczyszczenia dopływające z osiedli i obszarów użytkowanych rolniczo, zagospodarowanie turystyczne jezior oraz zanieczyszczenia z lewobrzeżnych dopływów rzeki. Dolny bieg rzeki przyjmuje zanieczyszczenia niesione przez Skotawę i Kwaczą oraz zanieczyszczenia rolnicze (Utracka-Minko i in. 2006, Miller 2006).

Na podstawie przeprowadzonych badań markerów stresu oksydacyjnego oraz gospodarki mikropierwiastkami w tkance mięśniowej smoltów troci wędrownej, pochodzących z czterech rzek z dorzecza Słupi uzyskano niżej przedstawione wyniki:

1. W tkance mięśniowej smoltów zasiedlających Glaźnę występowały wysoki poziom wapnia oraz wysoka aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w porównaniu z rybami z trzech pozostałych wytypowanych do badań dopływów Słupi.
2. Smolty bytujące w Skotawie charakteryzowały się wysoką aktywnością katalazy oraz wysokim poziomem zmian oksydacyjnej modyfikacji białek i lipidów. Uzyskane wyniki świadczą o nasileniu stresu oksydacyjnego na skutek zanieczyszczenia środowiska rzecznego Skotawy. Peroksydacja lipidów i białek powoduje zwiększenie aktywności katalazy w tkance mięśniowej smoltów, co może wskazywać na aktywację kompensacyjnych obronnych mechanizmów organizmu ryb.
3. Smolty zasiedlające Kamienną charakteryzowały się wysokim stężeniem biopierwiastków (Mn, Cu, Zn, Fe), a także wysoką aktywnością enzymów antyoksydacyjnych – katalazy i peroksydazy glutationowej.
4. Smolty troci wędrownej bytujące w Kwaczy wykazywały wysokie stężenie Ca i Mg oraz wysoki poziom ketonowych pochodnych oksydacyjnie zmodyfikowanych białek, co może świadczyć o pewnym stopniu zanieczyszczenia tej rzeki.

Poziom markerów stresu oksydacyjnego oraz stężenie mikropierwiastków stanowią bardzo ważne wskaźniki, przydatne do analizy adaptacyjnych możliwości i poziomu kondycji organizmów ryb, bytujących w rzekach poddanych antropopresji o różnym stopniu nasilenia. Za pomocą tych wskaźników można ocenić również stopień kondycji fizycznej ryb.

Podziękowanie

Składamy serdeczne podziękowania Panu prof. dr. hab. Andrzejowi Icha – dziekanowi Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Akademii Pomorskiej w Słupsku za przyznanie grantu wydziałowego dla młodych naukowców, dzięki któremu powyższe badania zostały zrealizowane. Dziękujemy za wyrażenie zgody na badania dyrekcji Parku Krajobrazowego ,,Dolina Słupi" i Zarządowi Polskiego Związku Wędkarskiego w Słupsku. Dziękujemy także za pomoc i zaangażowanie w przeprowadzeniu badań Panu Marcinowi Millerowi i jego współpracownikom.

Literatura

Badwey J.A., Curnutte J.T., Karnovsky M.L. 1981 – cis-Polyunsaturated fatty acids induce high levels of superoxide production by human neutrophils – J. Biol. Chem., 256(24): 12640-12643.

Bańkowski E. 2006 – Biochemia – MedPharm, Wrocław: 303-306.

Bartel R. 2002 – Ryby dwuśrodowiskowe, i ich znaczenie gospodarcze, program restytucji tych gatunków – Acta Hydrobiol. 3: 37-55.

Bartosz G. 2003 – Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie – PWN, Warszawa.

Boon E.M., Downs A., Marcey D. 1997 – Catalase: H_2O_2:H_2O_2 Oxidoreductase. Reviews on structure and function of catalases – In: Biomolecules at Kenyon.

Bradford M.M. 1976 – Rapid and sensitive method for the quantitation of protein using the principle of protein dye binding – Annal. Biochem., 72: 248-254.

Brylińska M. 2000 – Ryby słodkowodne Polski – PWN, Warszawa.

Cadenas E. 1997 – Basic mechanisms of antioxidant activity – Biofactors, 6: 391-397.

Čelechovska O., Svobodová Z., Ślábek V., Macharáčková B. 2007 – Distribution of metals in tissues of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) – Acta Vet. Brno 76: 93-100.

Comhair S.A., Erzurum S.C. 2005 – The regulation and role of extracellular glutathione peroxidase – Antioxid. Redox Signal., 7(1-2): 72-79.

Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. 2003 – Protein carbonyl groups as a biomarker of oxidative stress – Clin. Chim. Acta, 329(1-2): 23-38.

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.

Depledge M.H., Fossi M.C. 1994 – The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates – Ecotoxicology, 3(3):161-172.

Dębowski P., Grochowski A., Miller M., Radtke G. 2000 – Ichtiofauna dorzecza Słupi – Rocznik Naukowy PZW, Warszawa, 13: 109-136.

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 – Voprosy Meditsinskoi Khimii, 41: 24-26 (Article in Russian, Abstract in English).

Glatzle D., Vuilleumier J.P., Weber F., Decker K. 1974. – Glutathione reductase test with whole blood a convenient procedure fort he assessment of the riboflavin status in humans – Experientia, 30: 665-667.

Grodziński Z. 1961 – Anatomia i embriologia ryb – PWRiL, Warszawa.

Halliwell B., Gutteridge J.M. 1990 – The antioxidants of human extracellular fluids – Arch. Biochem. Biophys., 280(1): 1-8.

Halliwell B., Gutteridge J.M., Cross C.E. 1992 – Free radicals antioxidants and human disease: where are we now? – J. Lab. Clin. Med., 119(6): 598-620.

Kabata-Pendias A., Pendias H. 1999 – Biogeochemia pierwiastków śladowych – PWN, Warszawa.

Kamanli A., Naziroðlu M., Aydilek N., Hacievliyagil C. 2004 – Plasma lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with rheumatoid arthritis – Cell Biochem. Funct., 22(1): 53-57.

Kamyshnikov V.S. 2004 – Reference book on clinic and biochemical researches and laboratory diagnostics – MEDpress-inform, Moscow (in Russian).

Koroliuk M.A., Ivanova L.I., Maiorova I.G., Tokarev V.E. 1988 – A method of determining catalase activity – Laborotornoe Delo, 1: 16-19 (in Russian).

Kostiuk, V.A., Potapovich, A.I., Kovaleva, Zh.V., 1990 – A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation – Voprosy Meditsinskoi Khimii 36, 88-91 (Article in Russian, Abstract in English).

Kulbacka J., Saczko J., Chwiłkowska A. 2009 – Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek – Pol. Merk. Lek., XXVII, 157: 44-47.

Laskowski R., Migula P. 2004. Ekotoksykologia – od komórki do ekosystemu. PWRiL, Warszawa.

Lee A., Whyte M.K., Haslett C. 1993 – Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators – J. Leukoc. Biol. 54(4): 283-288.

Lejk A., Martyniak A. 2011 – Ocena możliwości naturalnego rozrodu troci wędrownej *Salmo trutta* L. w środkowym fragmencie dorzecza rzeki Łeby – Roczniki Naukowe PZW 24: 147-162.

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 in Enzymolology, 186: 464-478.

Liebmann H. 1960 – Handbuch der Fischwasser und Abwasser-Biologie – Gustav Fischer Verl., Jena. II, 1-7: 1-1149.

Lucas M.C., Baras E. 2001 – Migration of Freshwater Fishes – Blackwell Science, London, ss. 420.

Łuczyńska J., Jaworski J., Markiewicz K. 2000a – Wybrane metale w tkance mięśniowej ryb z jeziora Łańskiego – Komun. Ryb. 3: 22-25.

Łuczyńska J., Jaworski J., Markiewicz K. 2000b – Wybrane metale w tkance mięśniowej ryb z jezior mazurskich – Komun. Ryb. 4: 22-25.

Łuczyńska J., Tońska E., Borejszo Z. 2011 – Zawartość makro- i mikroelementów oraz kwasów tłuszczowych w mięśniach łososia (*Salmo Salar L.*), pstrąga tłuszczowego (*Oncorhynchus mykiss* Walb.) i karpia (*Cyprinus carpio* L.) – Żywność, Nauka, Technologia, Jakość 3(76): 162-172.

Łysak A., Strutyński J., Ligaszewski M., Polak S. 1990 – Zawartość ołowiu, cynku i miedzi w biotopie stawów rybnych zasilanych ściekami bytowo-przemysłowymi – Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu, XXXIV, 200: 77-92.

Matyska-Piekarska E., Łuszczewski A., Łącki J., Wawer I. 2006 – Rola stresu oksydacyjnego w etiopatogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów – Postępy Hig. Med. Dosw. 60: 617-623.

Maxwell S.R. 1995 – Prospects for use of antioxidants therapies – Drugs, 49(3): 345-361.

Miller M. 2006 – Pakiet edukacyjny Słupia prezentacja 7. Program edukacyjny ekologii „Słupia nasza rzeka" – Wojewódzki Fundusz Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej.

Moin V.M. 1986 – A simple and specific method for determining glutathione peroxidase activity in erythrocytes – Labaratornoe Delo, 12: 724-727 (Article in Russian, Abstract in English).

Nyk J. 1997 – Troć wędrowna – Multico Oficyna Wydawnicza, Warszawa.

Opuszyński K. 1983 – Podstawy biologii ryb – PWRiL, Warszawa.

Prost M. 1980 – Choroby ryb – PWRiL, Warszawa.

Putman N.F., Lohmann K.J., Putman E.M., Quinn T.P., Klimley A.P., Noakes D.L. 2013 – Evidence for geomagnetic imprinting as a homing mechanism in Pacific salmon – Current Biology 23: 312-316.

Ray G., Husain S.A. 2002 – Oxidants, antioxidants and carcinogenesis – Indian J. Exp. Biol., 40: 1213-1232.

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.

Shevchuk I.N., Chekulayev V.A., Chekulayeva L.V. 2002 – The role of lipid peroxidation and protein degradation in the photodestruction of Ehrlich ascites carcinoma cells sensitized by hematoporphyrin derivative – Exp. Oncol., 24: 216-224.

Skrajnowska D., Połeć A., Tokarz A. 2010 – Wpływ procesów termooksydacyjnych i nowotworowych na zawartość wybranych pierwiastków w tkankach szczurów Bromat – Chem. Toksykol. XLIII, 3: 336-342.

Starmach K., Wróbel S., Pasternak K. 1978 – Hydrobiologia – PWN, Warszawa.

Sych R. 1998 – Program restytucji ryb wędrownych w Polsce – od genezy do początków realizacji – Idee Ekologiczne, nr 13, Seria Szkice, Z. 7: 71-86.

Utracka-Minko B., Głuchowska B., Miller M. 2006 – Ścieżka przyrodnicza – szlakiem troci i łososia – Park Krajobrazowy Dolina Słupi, Słupsk.

Weissmann G., Smolen J.E., Korchak H.M. 1980 – Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils – N. Engl. J. Med., 303: 27-34.

Wilczek G. 2008 – Komórkowe strategie reakcji pająków na stres środowiskowy – Prace Naukowe Uniwersytetu Śląskiego, Katowice. nr 2638, 117 s.

Wiśniewolski W., Engel J. 2006 – Restoring migratory fish and connectivity of rivers in Poland – Wyd. IRS, Olsztyn, 82 s.

Zar J.H. 1999 – Biostatistical Analysis – 4th ed., Prentice Hall Inc., New Jersey.

Ziemlański Ś., Wartanowicz M. 1999 – Rola antyoksydantów żywieniowych w stanie zdrowia i choroby – Pediatria współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywienie Dziecka: 97-105.

http://www.kzgw.gov.pl/pl/rastrowa-mapa-podzialu-hydrograficznego-polski.html

http://dolinaslupi.pl/przyroda-2/wody/rzeki/

Przyjęto po recenzji 24.03.2015 r.

BIOACCUMULATION OF ELEMENTS AND OXIDATIVE STRESS MARKERS IN THE MUSCLE TISSUE OF SEA TROUT SMOLTS (*SALMO TRUTTA* L.) FROM SŁUPIA BASIN

Katarzyna Pałczyńska-Guguła, Halyna Tkachenko, Natalia Kurhaluk, Ewa Górska

ABSTRACT. Sea trout (*Salmo trutta* morpha *trutta* L.) is considered one of the most valuable species of fish fauna of the river Słupia in terms of natural, economic and angling values. Aquatic organisms in their living environment are influenced by a variety of stressful factors. They may modify physiological processes depending on the potency and duration of action and, in extreme cases, reduce the chances of survival. In ecotoxicological studies are developed concepts evaluating the effects of various components of environmental stress and use of biomarkers. They vary proportionally with the exposure degree of pollutants on animals in their natural environment. The main aim of our study was analysis of ecophysiological response in the muscle tissue of juvenile sea trout in river Słupia and its drainage basin areas (Glaźna, Skotawa, Kamienna, Kwacza). Physiological condition of organisms are based on the oxidative stress markers (lipid peroxidation and oxidative modification of proteins), the antioxidant defenses (activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, and catalase), elements content (the concentration of trace elements – manganese, copper, zinc, iron, and macronutrients – calcium, magnesium) in the muscle tissue of juvenile sea trout. Muscle tissues from each fish were collected for the chemical and biochemical assays. Juvenile specimens of sea trout from river Glaźna were characterized by high levels of calcium and high superoxide dismutase activity in muscle tissue compared to those in fish from other rivers. High catalase activity and high levels of derivatives of oxidative modification of proteins and lipids were reported among the fishes inhabiting the river Skotawa. The results suggest about oxidative stress intensity due to pollution of fish habitat. Lipid peroxidation and protein oxidation increase the catalase activity in the muscle tissue of smolts indicating about the activation of compensatory defenses mechanisms of the fish. Smolts from the river Kamienna were characterized by a high level of bio-elements (Mn, Cu, Zn, Fe) and the high activity of antioxidant defenses (catalase and glutathione peroxidase). A characteristic feature of juvenile sea trout inhabiting in the river Kwacza was a high level of Ca and Mg. These fish are also characterized by high levels of ketone derivatives of oxidative modified proteins, indicating a certain degree of pollution of the river. As shown in the reports of the Regional Inspectorate for Environmental Protection, the cause of contamination of rivers are industrial wastewater, agricultural pollution, runoff from urban and sewage from our homes. The quality of water in the river Słupia is result of pollution flowing from settlements and agricultural areas, tourist management of lakes and pollution from the left bank tributaries of the river. The lower flow of the river Słupia adopt pollution carried by the river Skotawa and Kwacza as well as agricultural pollution. Analysis of antioxidant enzymes activity and oxidative stress markers, as well as elements levels in the muscle tissue of juvenile sea trout will allow to assess of health condition depending on the habitats of fish. The study, in addition to factual knowledge, will provide the protective actions resulting in a further increase in the amount of this species of fish in Słupia including the degree of pollution of their environments.

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