

Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) inkubowanej *in vitro* z wyciągami z liści macierzanek *Thymus* L. (Lamiaceae Martinov)

Streszczenie: Celem niniejszego badania była ocena *in vitro* wpływu ekstraktów uzyskanych z liści wybranych gatunków macierzanek *Thymus* L. (Lamiaceae Martinov) na aktywność enzymów antyoksydacyjnych [aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy oraz całkowita zdolność antyoksydacyjna (total antioxidant capacity, TAC)] w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Wyższy poziom aktywności SOD, w porównaniu z próbą kontrolną, odnotowano w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego po inkubacji z wyciągami z liści wszystkich badanych macierzanek (o 20,3% dla *Th. alpestris*; o 34,2% dla *Th. pulegioides*; o 23,31% dla *Th. serpyllum*; o 13,75% dla *Th. pannonicus* oraz o 23,7% dla *Th. × porcii*). Statystycznie istotny wzrost aktywności SOD w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego odnotowano dla gatunku *Th. pulegioides* (o 34,2%; $p < 0,05$). Analiza aktywności katalazy w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego po inkubacji *in vitro* z wyciągami z liści wybranych gatunków macierzanek pokazała, że prawie wszystkie z nich (oprócz *Th. serpyllum*) mają wartości nieznacznie wyższe niż wartość próby kontrolnej. Wszystkie zaobserwowane przez nas zmiany dotyczące aktywności katalazy są zmianami statystycznie nieistotnymi. Ocena poziomu TAC w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego po dodaniu ekstraktów z liści badanych roślin wykazała wartości wzrostowe dla wszystkich wyciągów. Dla wszystkich badanych ekstraktów wzrost ten był statystycznie istotny ($p < 0,05$) i nastąpił kolejno o 59,6% (dla *Th. alpestris*); 48% (dla *Th. × porcii*); 45,9% (dla *Th. pannonicus*); 43,9% (dla *Th. serpyllum*) oraz 38,8% (dla *Th. pulegioides*). Wyniki naszego badania dostarczają wiedzy na temat nowej perspektywy stosowania różnych gatunków macierzanek jako roślin leczniczych w celu poprawy odpowiedzi antyoksydacyjnej pstrąga tęczowego. W toku naszej pracy wykonywane są badania obejmujące wykorzystanie innych gatunków roślin leczniczych jako dodatków do żywności w akwakulturze oraz ocena ich działania antyoksydacyjnego.

Wstęp

Wiele roślin leczniczych lub pojedynczych związków biologicznych w nich występujących uznaje się za potencjalnie aktywne w zmniejszeniu skutków stresu oksydacyjnego. Uwaga badaczy skupiona jest między innymi na wybranych gatunkach roślin z rodzaju *Thymus* L. (Lamiaceae Martinov). Rodzaj

Thymus obejmuje około 215 rozpoznanych gatunków [Morales 2002]. Te wieloletnie zielne rośliny, półkrzewy są rozmieszczone w Europie, Północno-Zachodniej Afryce, Etiopii, Azji oraz Grenlandii [Morales 2002, Bartolucci i in. 2013]. Jest to jeden z najpowszechniejszych rodzajów stosowanych w medycynie ludowej, gdzie stał się popularny ze względu na stymulujący wpływ na wszystkie funkcje organizmu [Viuda-Martos i in. 2011]. Wiele gatunków tego rodzaju jest stosowanych w medycynie tradycyjnej jako toniki, środki ułatwiające wydalanie gazów, środki przeciwkaszlowe, aromatyczne, wykrztuśne, żołądkowe, przeciwskurczowe, spazmolytyczne, moczopędne, uspokajające, napotne i antyseptyczne, ale także jako środki przeciwzapalne, przeciwpasożytnicze, hepatoprotekcyjne oraz przeciwnowotworowe [Khan i Abourashed 2010, Nabavi i in. 2015]. Wewnętrznie tymianek stosuje się w leczeniu ostrego zapalenia oskrzeli, zapalenia krtani, krztuśca, przewlekłego zapalenia błony śluzowej żołądka, biegunki i braku apetytu. Zewnętrznie stosowany jest do kąpieli w celu łagodzenia problemów reumatycznych i skórnych (siniaki, skręcenia, infekcje grzybicze), a także w przypadku artretyzmu, chorób dżięseł czy zapalenia migdałków [Khan i Abourashed 2010]. Te wszechstronne efekty farmakologiczne można przypisać drugorzędowym metabolitom roślinnym, zwłaszcza olejkom eterycznym i polifenolom. Rośliny z rodzaju *Thymus* są bogate w różne substancje czynne, takie jak tymol, karwakrol, p-cymen i terpinen [Nabavi i in. 2015].

Pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) jest dobrym organizmem modelowym do badań toksykologicznych i odpowiedzi na działanie różnych ksenobiotyków oraz zanieczyszczeń środowiska [Escher i in. 2011, Li i in. 2011, Williams 2012]. Co więcej, jest to doskonały model do badań dotyczących stresu oksydacyjnego, immunologii porównawczej i fizjologii [Thorgaard i in. 2002]. Ponieważ naturalnie reprodukuje populacje pstrąga tęczowego występują na kilku kontynentach, gatunek ten służy jako model ekotoksykogenomiczny, wypełniając lukę pomiędzy środowiskiem laboratoryjnym a naturalnym środowiskiem wodnym [Carvan i in. 2008]. Dlatego też celem niniejszego badania była ocena antyoksydantów enzymatycznych oraz całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego po inkubacji *in vitro* z wyciągami z liści wybranych gatunków macierzanek.

Materiały i metody badań

Zbiór materiału roślinnego. Próbkę roślin zebrano w miesiącach czerwiec-sierpień 2016 roku. Liście *Thymus serpyllum* L. zbierano wśród traw z piaszczystej gleby na skraju lasu sosnowego (wieś Bajmaky, powiat Biłohirja, obwód Chmielnicki, Ukraina; N 50°03'58,9"; E 26°13'37,5"; 257 m n.p.m.). Liście *Th. pannonicus* All. zebrano wśród traw na poboczach pomiędzy dwoma polami

uprawnymi (wieś Syvky, powiat Biłohirja, obwód Chmielnicki, Ukraina; N 50°02'09,6"; E 26°13'19,2"; 283 m n.p.m.). Liście *Th. pulegioides* L. zebrano wśród traw w pobliżu działek użytkowych (wieś Syvky, powiat Biłohirja, obwód Chmielnicki, Ukraina; N 50°02'02,8"; E 26°14'13,9"; 306 m n.p.m.). Liście *Th. × porcii* Borbás (hybryda *Th. pannonicus* i *Th. pulegioides*) zostały zebrane z trawnika znajdującego się niedaleko toru wyścigowego (ulica Medovoi Pechery, Lwów, Ukraina; N 49°49'15,1"; E 24°05'12,5"; 348 m n.p.m.). Liście *Th. alpestris* Tausch ex A. Kern. zostały zebrane na poboczu drogi poniżej potoku, w górskiej dolinie Shumneska (wieś Kwasy, rejon Rachowski, region Zakarpacki, Ukraina; N 48°09'32,3"; E 24°21'26,4"; 1259 m n.p.m.).

Przygotowanie ekstraktów roślinnych. Świeżo zebrane liście umyto, zważono i rozdrobniono w homogenizatorze w 0,1 M buforze fosforanowym (pH 7,4; w proporcji 1:19) w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie ekstrakty zostały przefiltrowane i zbadane pod kątem ich zdolności antyoksydacyjnej. Do momentu użycia wszystkie wyciągi przechowywano w temperaturze -20°C.

Eksperymentalne ryby. W eksperymentach wykorzystano klinicznie zdrowe pstrągi tęczowe o masie ciała 80-120 g z Zakładu Hodowli Ryb Łososiowatych w Rutkach (Instytut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza, Olsztyn, Polska). Tkanka mięśniowa ryb pobrana *in situ* została zhomogenizowana w lodowatym buforze (100 mM Tris-HCl, pH 7,2) w celu uzyskania 10% homogenatu. Homogenaty odwirowano przy 3000 obr./min przez 15 minut w temperaturze 4°C. Uzyskany supernatant został wykorzystany do inkubacji z wyciągami z liści wybranych gatunków macierzanek (w stosunku objętościowym 9:1) przez 120 minut w temperaturze pokojowej. Grupę kontrolną (tkanka mięśniowa pstrąga) inkubowano z 0,1 M buforem Tris-HCl (pH 7,4; w proporcji 19:1). Czas inkubacji wynosił 120 minut. Poziom białka oznaczono metodą Bradford (1976).

Pomiar aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, E.C. 1.15.1.1) została oceniona na podstawie zdolności do dysmutacji ponadtlenku wytworzonego podczas autoutleniania kwercetyny w środowisku alkalicznym (pH 10,0) na podstawie metody Kostiuka i współautorów (1990).

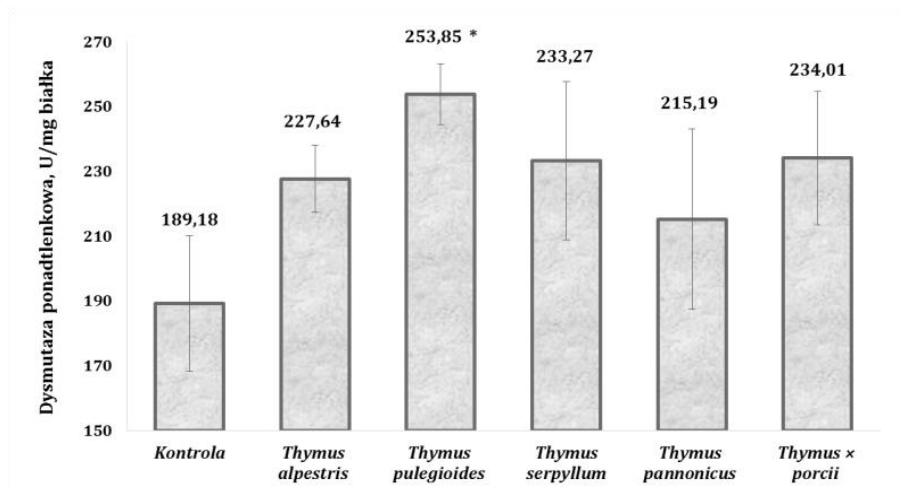
Pomiar aktywności katalazy (CAT). Aktywność katalazy (CAT, E.C. 1.11.1.6) określono poprzez pomiar zmniejszenia stężenia H₂O₂ w mieszaninie reakcyjnej metodą Koroliuka i współautorów (1988).

Analiza statystyczna. Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono przy użyciu oprogramowania STATISTICA 8.0 (StatSoft, Kraków, Polska). Wyniki wyrażono jako średnią ± S.E.M. Wszystkie zmienne testowano pod względem rozkładu normalnego za pomocą testu Kołmogorowa-Smirnowa i Lillieforsa (p>0,05). Istotność różnic (p<0,05) pomiędzy wartościami w próbach

badanych a próbach kontrolnych oznaczono przy pomocy testu Kruskala-Wallisa [Zar 1999].

Wyniki badań i dyskusja

Poziom aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego inkubowanej *in vitro* z wyciągami z liści wybranych gatunków macierzanek przedstawiono na ryc. 1.



Ryc. 1. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego inkubowanej *in vitro* z wyciągami z liści wybranych gatunków macierzanek ($M \pm m$, $n=8$)

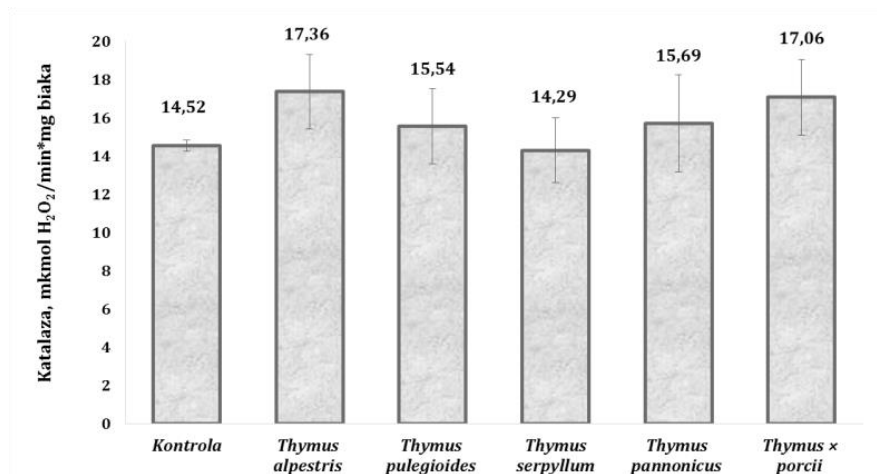
* zmiany statystycznie istotne ($p < 0,05$) w porównaniu z wartościami próby kontrolnej

Źródło: opracowanie własne.

Analiza wyników naszych badań wykazała wyższy poziom aktywności SOD w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego po inkubacji z wyciągami z liści wszystkich badanych macierzanek (*Th. alpestris*, *Th. pulegioides*, *Th. serpyllum*, *Th. pannonicus*, *Th. x porcii*) w porównaniu z próbą kontrolną, której wartość wyniosła ($189,18 \pm 20,87$) U/mg białka (ryc. 2). Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej była wyższa kolejno o 20,33% dla *Th. alpestris*; o 34,2% dla *Th. pulegioides*; o 23,31% dla *Th. serpyllum*; o 13,75% dla *Th. pannonicus* oraz o 23,7% dla *Th. x porcii*. Zmiany statystycznie istotne dla aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego w porównaniu z próbą kontrolną odnotowano dla gatunku *Th. pulegioides*. Wzrost wartości SOD nastąpił tu o 34,2% ($p < 0,05$).

Analiza wyników dotyczących aktywności katalazy w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego po inkubacji *in vitro* z wyciągami z liści wybranych gatunków

macierzanek pokazała, że prawie wszystkie z nich mają wartości nieznacznie wyższe niż wartość próby kontrolnej, która wyniosła ($14,52 \pm 0,29$) mkmol H_2O_2 /min·mg białka (ryc. 3). Niższy poziom aktywności katalazy w tkance mięśniowej badanych ryb, w porównaniu z próbą kontrolną odnotowano po inkubacji z wyciągiem z liści *Th. serpyllum* ($14,29 \pm 1,70$) mkmol H_2O_2 /min·mg białka. Wartości wzrostowe dotyczące aktywności katalazy w tkance mięśniowej po inkubacji z wyciągami z liści omawianych roślin zanotowano dla czterech pozostałych gatunków macierzanek, spośród których najwyższym poziomem charakteryzowały się ekstrakty z liści *Th. alpestris*, *Th. × porcii*, *Th. pannonicus* oraz *Th. pulegioides*. Wzrost aktywności badanego parametru nastąpił tu odpowiednio o 19,6%; 17,5%; 8,1% i 7% ($p > 0,05$). Wszystkie zmiany dotyczące aktywności katalazy w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego, które zaszły po inkubacji *in vitro* z wyciągami z liści wybranych gatunków *Thymus* są zmianami statystycznie nieistotnymi (ryc. 2).



Ryc. 2. Aktywność katalazy w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego inkubowanej *in vitro* z wyciągami z liści wybranych gatunków macierzanek ($M \pm m$, $n=8$)

Źródło: opracowanie własne.

Traktowanie tkanki mięśniowej pstrąga tęczowego ekstraktami uzyskanymi z liści wybranych gatunków macierzanek spowodowało wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i całkowitej aktywności antyoksydacyjnej. W związku z tym rozsądnie byłoby zasugerować, że taka aktywacja działania antyoksydacyjnego zależy od wtórnych metabolitów roślinnych zawartych w niniejszych ekstraktach. Nasze badania wykazały znaczące zwiększenie poziomu aktywności SOD w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego po inkubacji z wyciągami z liści wszystkich badanych macierzanek, a statystycznie istotny wzrost ak-

tywności SOD odnotowano dla gatunku *Th. pulegioides* (ryc. 1). Podobne tendencje odnotowano także przy ocenie poziomu TAC w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego. Wzrost tego wskaźnika nastąpił po inkubacji z ekstraktami z liści wszystkich badanych roślin. Co więcej, dla wszystkich badanych wyciągów wzrost ten był statystycznie istotny. Analiza aktywności katalazy w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego po inkubacji *in vitro* z wyciągami z liści wybranych gatunków macierzanek pokazała, że prawie wszystkie z nich (oprócz *Th. serpyllum*) charakteryzują się wyższymi wartościami w porównaniu do próby kontrolnej.

Zgodnie z uzyskanymi wynikami, stwierdzono, że metabolity wtórne w ekstraktach z liści wybranych gatunków macierzanek mogą być głównym czynnikiem zwiększenia zdolności antyoksydacyjnej tkanki mięśniowej pstrąga tęczowego po inkubacji *in vitro*. W celu potwierdzenia tej tezy, niezbędne są dalsze badania obejmujące skład fitochemiczny oraz charakterystykę metabolitów wtórnych badanych przez nas ekstraktów roślinnych. Szczególną uwagę należy zwrócić na ocenę wpływu ekstraktów/produktów roślinnych na wzrost ryb, ich profile hematologiczne, odpowiedzi immunologiczne, a także odporność na choroby zakaźne. Stosowanie wyciągów roślinnych jako przeciwutleniaczy i immunostymulatorów w systemach akwakultury może mieć wartość środowiskową ze względu na ich podatność na biodegradację. Istnieje możliwość wykorzystania ekstraktów z liści różnych gatunków macierzanek w intensywnych hodowlach akwakultury. Wysoka aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz wzrost całkowitej aktywności antyoksydacyjnej w tkance mięśniowej pstrąga tęczowego daje powody, aby sądzić, że stosowanie tych ekstraktów roślinnych jest racjonalną strategią w zapobieganiu i leczeniu różnych chorób ryb związanych ze stresem oksydacyjnym poprzez zwiększanie ich zdolności adaptacyjnych. Podsumowując, wyniki tego badania dostarczają nowej perspektywy stosowania różnych gatunków macierzanek jako roślin leczniczych w celu poprawy odpowiedzi antyoksydacyjnej u ryb łososiowatych.

Literatura

- Bartolucci F., Peruzzi L., Passalacqua N. 2013: *Typification of names and taxonomic notes within the genus Thymus L. (Lamiaceae)*. Taxon, 62(6): 1308-1314.
- Bradford M.M. 1976: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem., 72: 248-254.
- Carvan M.J. 3rd, Gallagher E.P., Goksøyr A., Hahn M.E., Larsson D.G. 2007: *Fish models in toxicology*. Zebrafish, 4(1): 9-20.
- Escher B.I., Cowan-Ellsberry C.E., Dyer S., Embry M.R., Erhardt S., Halder M., Kwon J.H., Johanning K., Oosterwijk M.T., Rutishauser S., Segner H., Nichols J. 2011: *Protein and lipid binding parameters in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) blood and liver fractions to extrapolate from an in vitro metabolic degradation assay to in*

- vivo bioaccumulation potential of hydrophobic organic chemicals*. Chem. Res. Toxicol., 24(7): 1134-1143.
- Khan I.A., Abourashed E.A. 2010: *Leung's Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics* (3rd ed.), John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ, pp. 594-597.
- Koroliuk M.A., Ivanova L.I., Maïorova I.G., Tokarev V.E. 1988: *A method of determining catalase activity*. Laboratornoe 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 Meditsinskoï Khimii, 36: 88-91 (in Russian, Abstract in English).
- Li Z.H., Velisek J., Zlabek V., Grabic R., Machova J., Kolarova J., Li P., Randak T. 2011: *Chronic toxicity of verapamil on juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): effects on morphological indices, hematological parameters and antioxidant responses*. J. Hazard Mater., 185(2-3): 870-880.
- Morales R. 2002: *The history, botany and taxonomy of the genus Thymus*. In: Stahl-Biskup E., Sáez F. (Eds.) *Thyme. The genus Thymus*. Taylor & Francis, London, New York, pp. 1-43.
- Nabavi S.M., Marchese A., Izadi M., Curti V., Daglia M., Nabavi S.F. 2015: *Plants belonging to the genus Thymus as antibacterial agents: from farm to pharmacy*. Food Chem., 173: 339-347.
- Thorgaard G.H., Bailey G.S., Williams D., Buhler D.R., Kaattari S.L., Ristow S.S., Hansen J.D., Winton J.R., Bartholomew J.L., Nagler J.J., Walsh P.J., Vijayan M.M., Devlin R.H., Hardy R.W., Overturf K.E., Young W.P., Robison B.D., Rexroad C., Palti Y. 2002: *Status and opportunities for genomics research with rainbow trout*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol., 133(4): 609-646.
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J.A. 2011: *Spices as functional foods*. Critical Review in Food Science and Nutrition, 51(1): 13-28.
- Williams D.E. 2012: *The rainbow trout liver cancer model: response to environmental chemicals and studies on promotion and chemoprevention*. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol., 155(1): 121-127.
- Zar J.H. 1999: *Biostatistical Analysis*. 4th ed., Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

**The activity of antioxidant enzymes in the muscle tissue
of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss* Walbaum) treated by extracts
of thymus leaves (*Lamiaceae martinov*)**

Summary: The aim of this study was the *in vitro* evaluation of the buffer extracts influence obtained from the leaves of selected *Thymus* representatives (Lamiaceae Martinov) on the antioxidant enzymes' activity [superoxide dismutase (SOD), catalase, and total antioxidant capacity (TAC)] in the muscle tissue of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). A higher level of SOD activity compared to the control sample was recorded in muscle tissue of rainbow trout after incubation with leaf extracts of all tested *Thyme* representatives (by 20.33% for *Th. alpestris*, by 34.2% for *Th. pulegioides*; by 23.31% for *Th. serpyllum*, 13.75% for *Th. pannonicus*, and by 23.7% for *Th. × porcii*). A statistically significant increase in SOD activity in muscle

tissue of rainbow trout was noted for the *Th. pulegioides* (by 34.2%, $p < 0.05$). Analysis of the catalase activity in muscle tissue of rainbow trout after *in vitro* incubation with leaf extracts derived from selected *Thymus* representatives showed that almost all of them (except *Th. serpyllum*) have values slightly higher than the control value. All observed changes in catalase activity were statistically non-significant. The TAC level in muscle tissue of rainbow trout after adding leaf extracts of the tested plants showed the increased TAC values for all samples. For all tested extracts, the increase was statistically significant ($p < 0.05$) and following: by 59.6% for *Th. alpestris*, by 48% for *Th. × porcii*, by 45.9% for *Th. pannonicus*, by 43.9% for *Th. serpyllum*, and by 38.8% for *Th. pulegioides*. The results of this study provide a new perspective on the use of various *Thymus* species as a medicinal plant to improve the antioxidant response of rainbow trout (*O. mykiss*). Further studies including the use of other medicinal plants as food additives in aquaculture, the assessment of its antioxidant effects on various tissues are in progress.

Keywords: antioxidant enzymes, rainbow trout, extracts of *thymus* leaves