

ОСОБЛИВОСТІ ПРОЦЕСІВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ПЕЧІНЦІ РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ В ДИНАМІЦІ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Л. П. Драган

Інститут рибного господарства НААН

Представлені дослідження процесів пероксидного окиснення ліпідів у печінці цьоголіток райдужної форелі, ураженої вірусом інфекційного панкреатичного некрозу. Отримані результати та їх аналіз свідчать про характерні порушення системи антиоксидантного захисту внаслідок накопичення активних кисневих метаболітів під дією вірусу.

Упродовж останнього часу в Україні активно розвивається форелівництво. Одночасно з інтенсифікацією процесів вирощування риби з'являються нові вірусні захворювання одним із яких є інфекційний некроз підшлункової залози (IPNV) райдужної форелі. Збудником цього захворювання є вірус, який належить до роду *Aquabirnavirus* родини *Birnaviridae* [1, 2]. Цінну інформацію щодо деяких функціональних характеристик вірусів риб можна одержати шляхом комплексного вивчення їх впливу на організм.

У риб, як і у наземних хребетних, ферментна ланка антиоксидантного захисту відіграє важливу роль у знешкодженні продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) [3, 4]. Вміст продуктів ПОЛ у печінці риб є біомаркером, який характеризує її фізіологічний стан при дії токсичних речовин і патогенів [3, 5]. Наявні в літературі дані свідчать про те, що у риб, як і у теплокровних тварин, розвиток багатьох захворювань супроводжується посиленням пероксидного окиснення ліпідів [4]. Відомо, що при напруженій діяльності організму (міграція, нерест) та інших неспецифічних для риб впливах, одним з яких є вірусна інфекція, спостерігається посилення окисних процесів, в результаті чого накопичуються продукти пероксидного окиснення ліпідів, що виступають в ролі первинного медіатора стресу [6, 7]. Негативні чинники призводять до зміни стану та функціональної активності мембран клітини, тісно пов'язаних з балансом про- і антиоксидантної системи клітини [8]. Порушення структури і складу ліпідного бішару мембран, викликані активізацією вільнорадикального окиснення, впливають на зміну функціонування мембрани клітин, і, отже, систем, органів, тканин і організму риб в цілому. Стійкість мембран до вільнорадикального окиснення ліпідів залежить від стану антиоксидантної системи. Дані наукової літератури, щодо антиоксидантної системи та інтенсивності ПОЛ в організмі лососевих риб при вірусних інфекціях практично відсутні, окремі праці не дають повного уявлення щодо впливу вірусу інфекційного некрозу підшлункової залози на особливості пероксидного окиснення ліпідів та активність антирадикального захисту в органах і тканинах риб. Оскільки питання про особливості процесів ПОЛ в печінці цьоголіток райдужної форелі уражених IPNV залишається не з'ясованим, метою даної роботи було дослідження біохімічних змін в організмі цьоголітки райдужної форелі в динаміці розвитку інфекційного панкреатичного некрозу. Така інформація актуальна і необхідна для оцінки стану здоров'я риб.

Матеріали і методи Для досліджень використовували цьоголіток райдужної форелі. Досліди з штучного інфікування риб проводились в лабораторних умовах у ємностях об'ємом 40 дм³ при температурі води 12 °С. Для біопроби були сформовані дві групи цьоголіток райдужної форелі (*O. mykiss*) — дослідна і контрольна — у кількості 10 екз. у кожній масою до 15г. Зараження IPNV проводили методом внутрішньочеревної ін'єкції. Для біохімічних аналізів використовували 10%-ний гомогенат печінки. Відбір матеріалу проводився в три

етапи: 3-тій, 12-тій і 22-ий день після інфікування вірусом. В гомогенатах печінки визначали стан ПОЛ за рівнем дієнових кон'югатів (ДК) [9] і малонового діальдегіду (МДА) [10]. Про систему антиоксидантного захисту (АО) визначали за активністю АО ферментів — супероксиддисмутази (СОД) [11] і каталази [12]. Отримані результати статистично обробляли за допомогою комп'ютерних програм «Statistica» для Windows.

Результати й обговорення. Одним із проявів, що розвиваються в печінці цьоголіток райдужної форелі, інфікованої вірусом IPNV, є стимуляція каскаду вільнорадикальних реакцій, що безпосередньо чи опосередковано призводить до ураження ліпідної компоненти мембран, співвідношення кількості ненасичених жирних кислот у молекулах ліпідів і порушень структурно-функціональних властивостей цитоплазматичних мембран, внутрішньоклітинних органел тощо [6, 7].

Проведені експериментальні дослідження показали, що вірус інфекційного панкреатичного некрозу сприяє активації окисних процесів ПОЛ, про що свідчить підвищення рівня продуктів пероксидного окиснення ліпідів, а саме: початкових метаболітів — дієнових кон'югатів, і кінцевих — малонового діальдегіду в печінці райдужної форелі, інфікованої вірусом IPNV, в динаміці захворювання (таблиця 1).

Таблиця 1

**Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів в печінці райдужної форелі
($P \leq 0,05-0,001$; $M \pm m$, $n=10$)**

Показники	Контроль	I етап	II етап	III етап
ДК, нмоль/мг білка	10,58±0,7	10,89±0,83	11,21±0,75	11,53±0,67
МДА, нмоль/мг білка	2,85±0,29	5,45±0,12	6,28±0,65	6,55±0,15

Так, збільшення в печінці вмісту дієнових кон'югатів в інфікованих групах риб порівняно з показниками здорових, незначно, статистично достовірно, підвищувалось в початковий період на 3%. В середині інфекційного періоду встановлено незначне збільшення на 6%, а на кінець дослідного періоду показник підвищувався на 9% відносно контрольних значень. Підвищення рівня МДА відбувалось синхронно з дієновими кон'югатами, досягаючи в порівнянні з показниками здорових риб більш ніж в 2 рази відповідно.

Отримані результати можуть свідчити про порушення у функціонуванні проантиоксидантної системи в печінці риб під впливом вірусу IPNV. Накопичення вмісту одного з кінцевих молекулярних продуктів ПОЛ - МДА вказує, що зі зміною імунологічного статусу у риб відбувається інтенсивний процес пероксидного окиснення ліпідів, що може призводити до розвитку окиснювального стресу. З огляду на те, що ПОЛ є найважливішим показником ліпідного обміну, являється активним метаболічним і регуляторним фактором [6] і відображає накопичення проміжних і кінцевих метаболітів та фізіологічно активних інтермедіаторів, свідчить про відповідну захисну реакцію організму на фізіолого-біохімічному рівні на дію різних стресорних факторів одним з яких є вірусна інфекція.

Таким чином, у разі інфікування райдужної форелі вірусом некрозу підшлункової залози, відбувається зростання ПОЛ, продукти якого і є тими чинниками, які відповідають за пошкодження клітин і тканин. При цьому встановлено [13, 14], що за наявності патологічних процесів клітини схильні до розвитку ПОЛ в набагато більші ступені, ніж здорові. Це відбувається ймовірно тому, що інактивація деяких біоантиоксидантів, вихід їх з пошкоджених клітин і виділення іонів металів (особливо заліза і міді) з місць їх накопичення в клітинах та з гідролізованих металопротеїнів, що звільнилися із зруйнованих ліпосом ферментами [13].

Регуляція вільнорадикального окиснення забезпечується в клітині системою антиоксидантного захисту (АОЗ), яка включає декілька елементів, що пригнічують процеси утворення вільних радикалів або інактивуючих продукти пероксидного окиснення. Виходячи,

з вищевикладеного ми вивчали активність СОД та каталази в печінці райдужної форелі, ураженої IPNV. Результати проведених досліджень, представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

**Активність антиоксидантних ферментів у печінці райдужної форелі
($P \leq 0,05-0,001$; $M \pm m$, $n=10$)**

Показники	Контроль	I етап	II етап	III етап
СОД, у.од./мг білка	0,65±0,14	0,43±0,08	0,34±0,9	0,30±0,88
Каталаза, H ₂ O ₂ /хв./ мг білка	42,9±0,12	35,62±0,16	38,18±1,44	40,75± 0,75

Встановлено зниження супероксиддисмутазної активності в гепатоцитах форелі порівняно з контролем. Так, в початковий період інфекційного періоду риб активність ферменту становила 66% від контрольного значення. В середині і на кінцевій стадії інфекційного процесу спостерігається подальше пригнічення супероксиддисмутазної активності майже в 2 рази і складало - 55% щодо контрольних даних.

З отриманих результатів випливає, що за дії вірусу інфекційного панкреатичного некрозу IPNV спостерігаються порушення у функціонуванні ферменту супероксиддисмутази - важливої ланки АОЗ організму, який забезпечує регуляцію вільнорадикальних процесів клітинного метаболізму. Зниження активності СОД в печінці форелі можна розглядати як прояв певного зниження ефективності АОЗ організму внаслідок поступового пошкодження її компонентів вільними радикалами і продуктами ПОЛ.

Провідна роль у захисті клітин від окисного навантаження належить каталазі, яка утилізує пероксид водню, а її активність вказує на суттєвий вклад цієї сполуки в розвиток пероксидних процесів. Отримані результати по дослідженню активності каталази в печінці форелі показали, що вплив вірусу IPNV призводить до значних змін активності ферменту (таблиця 2). Так, встановлено зниження активності каталази в гепатоцитах форелі протягом усіх періодів вивчення: в початковий період на 17%, в середині інфікованого періоду на 11%, а на кінцевому етапі активність ферменту була нижчою на 5% порівняно з контрольними значеннями. Встановлена зміна рівня активності каталази може бути викликана на нашу думку різними причинами. По-перше, інактивація ферменту яка, можливо, викликана надлишком активних кисневих метаболітів, підвищення генерування яких при розвитку окисного стресу доведено [15]. Разом з тим відомо, що супероксидний радикал є сильним інгібітором каталази [16]. По-друге, зниження рівня каталази може бути пов'язано також мутацією і окисною деструкцією ДНК при окиснювальному стресі [15]. І, нарешті, рівень активності ферментів в клітинах, як відомо, регулюється швидкістю їх синтезу і розпаду. Також каталаза бере участь і в інших паралельних реакціях, пов'язаних з іонними процесами метаболізму H₂O₂ [17].

Сукупність результатів, отриманих при дослідженні показників ДК, МДА, СОД, каталази свідчать про суттєву чутливість ферментативної ланки антиоксидантного захисту за дії вірусу інфекційного панкреатичного некрозу форелі, що, ймовірно, може бути результатом певного виснаження антиоксидантної системи захисту внаслідок накопичення активних кисневих метаболітів.

В И С Н О В К И

Дія вірусу інфекційного панкреатичного некрозу порушує рівновагу в прооксидантно - антиоксидантної системі гепатоцитів райдужної форелі, і проявляється інтенсифікацією процесів пероксидного окиснення ліпідів, зниженням потужності антиоксидантного захисту, що дозволяє розглядати отримані результати, як одну із ланок в патогенезі захворювання.

Перспективи подальших досліджень Необхідно деталізувати механізми дії вірусу інфекційного панкреатичного некрозу на основні біохімічні процеси, що призводять до загибелі клітин.

CHARACTERISTICS OF LIPID PEROXIDE OXIDATION PROCESS IN LIVER OF RAINBOW TROUT UNDERVIRAL IN INFECTION

L. P. Dragan

Institute of Fisheries of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

S U M M A R Y

The studing of lipid peroxide oxidation process in livery of rainbow trout fingerlings infected with Infectious pancreatic necrosis virus are presented. The results and analsis indicated the characteristic violations of the antioxidant defence system due to the accumulation of reactive oxygen species under virus influence.

ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ В ДИНАМИКЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Л. П. Драган

Институт рыбного хозяйства НААН Украины

А Н Н О Т А Ц И Я

Представлены исследования процессов перекисного окисления липидов в печени сеголеток радужной форели, зараженной вирусом инфекционного панкреатического некроза. Полученные результаты и их анализ свидетельствуют о характерных нарушениях системы антиоксидантной защиты вследствие накопления активных форм кислорода под действием вируса.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Головина Н. А. Ихтиопатология / Н. А. Головина, О. Н. Бауер. — М: Мир, . — 2007. — 448 с.
2. Ahne W. Studies on the transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of salmonid fish / W. Ahne, R.D. Negele //In: Ellis, A.E. (Ed.), Fish and Shellfish Pathology. London: Academic Press, — 1985. — P. 262-270.
3. Тушницька Н. Й. Імунний статус коропа при захворюванні асоційованою формою краснухи / Н. Й. Тушницька, Н. М. Матвієнко, В. Г. Янович // Біологія тварин. — 2006. — Т.8, № 1–2. — С. 251–254.
4. Тушницька Н. Й. Антиоксидантний статус коропа при захворюванні асоційованою формою краснухи/ Н. Й. Тушницька, В. Г. Янович, Н. М. Матвієнко // Наук.-техн. бюл. Інст. біол. твар. та ДНДКІ ветпреп. і корм. доб. — 2006. — Вип. 7. — № 1, 2. — С. 182–186.
5. Тушницька Н. Й. Показники природного імунітету в крові коропа при захворюванні асоційованою формою краснухи / Н. Й. Тушницька, В.Г Янович// Наук.-техн. бюл. Інст. біол. твар. та ДНДКІ ветпреп. і корм. доб. — 2006. — Вип. 7, — № 3, 4. — С. 143–145.
6. Барабой В. А. Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы / Барабой В. А. — К: Фитоцентр, — 2006. — 424 с.
7. Зенков Н. К. Окислительный стресс. Биохимический и патологический аспекты / Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньшикова. — М.: МАИК, — 2001. — 343 с.
8. Владимиров Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А. А. Арчаков. — М.: Наука, 1972. — 252 с.

9. *Стальная И. Д.* Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // *Современные методы в биохимии* / под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, — 1977. — С. 63–64.
10. *Корабейникова С. Н.* Модификация выделения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с ТБК/ С. Н. Корабейникова // *Лабораторное дело*. — 1989. — № 7. — С. 8-9.
11. *Дубинина Е. Е.* Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов / Е. Е. Дубинина, Л. Ф. Сальникова // *Лабораторное дело*. — 1983. — № 10. — С. 30-33.
12. *Королюк М. А.* Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // *Лабораторное дело*. — 1988. — № 1. — С. 16–18.
13. *Catoni C.* Life history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants / C. Catoni, A Peters, H.M. Schaefer // *ANIMAL BEHAVIOUR*, 2008. — Vol. 76. — P. 1107–1119.
14. *Halliwell B.* Oxygen is a toxic gas - an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species / В.Halliwell, М.С. Gutteridge. // *Epilepsia*. — 2004. — Vol. 45, N.12. — P. 1549–1559.
15. *Halliwell B.* Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence. — *Lancet*; — 1994. — P. 721–724.
16. *Fridovich I.* Superoxide radical and Superoxide dismutase // *Annu Rev Biochem*. — 1995. — Vol 64. — P. 97–112.
17. *Левадная О.В., Донченко Г.В., Валуцина В.М.* Соотношение между величинами активности ферментов антиоксидантной системы в различных тканях интактных крыс // *Укр. биохим. журн.* — 1998. — Т. 70. — № 6. — С. 53–58.