

**СОСТОЯНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ
СЕГОЛЕТОК РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (ONCORHYNCHUS MYKISS)
ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВИРУСОМ ИНФЕКЦИОННОГО
ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА**

Институт рыбного хозяйства НААН (г. Киев)

Работа выполнена в рамках программы Национальной академии аграрных наук Украины – 28.00.02.02Ф «Изучить биологические и эколого-географические особенности распространения возбудителей болезней промысловых видов рыб и внедрить молекулярные методы исследования выделенных патогенов», № гос. регистрации 0111U006973.

Вступление. С возникновением потенциальной угрозы распространения вирусных болезней рыб и случаев повышенной гибели среди лососевых в хозяйствах Украины, возникла необходимость в изучении биологических особенностей вирусных патогенов рыб и их влияния на организм. Анализ ихтиопатологической ситуации на предприятиях, которые занимаются искусственным воспроизводством лососевых рыб, а также природных водоемов, показал, что повышенный интерес для Украины в этом отношении представляет вирус инфекционного панкреатического некроза (IPNV). Возбудителем инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб является вирус рода *Aquabirnavirus* семейства *Birnaviridae*. IPNV чаще всего поражает мальков и сеголеток лосося. Гибель при этом достигает до 70% [2]. В настоящее время биохимические аспекты патогенеза данного заболевания практически не изучены. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что у рыб, как и у теплокровных животных, развитие многих заболеваний сопровождается усилением перекисного окисления липидов (ПОЛ) [11].

Цель исследования заключалась в выяснении возможности развития оксидативного стресса при исследовании процессов перекисного окисления липидов в гомогенатах печени клинически здоровых сеголеток радужной форели и их аналогов, экспериментально инфицированных вирусом инфекционного панкреатического некроза.

Объект и методы исследования. Вирус IPNV изолят -VF-11(6,8 Ig ТЦД50/см³), выделен в природных водоемах западной части Украины.

В эксперименте использовали радужную форель, выращенную на экспериментальной базе Института рыбного хозяйства НААН. Рыба тестируется на наличие инфекционных

заболеваний. Опыты по искусственному заражению рыб проводились в лабораторных условиях в ваннах объемом 40 дм³ при температуре воды 12 °С. Для биопробы сформировали две группы сеголеток радужной форели (*O. mykiss*) – опытную и контрольную – в количестве 10 экз. в каждой массой до 15 г. После первичной адаптации рыбы проводили ее заражение IPNV методом внутривентральной инъекции. В опытах использовали 10% гомогенаты тканей печени. Отбор материала проводили на 3-ий (I этап), 12-тый (II этап) и 22 день (III этап) после инфицирования вирусом. Диеновые конъюгаты (ДК) определяли по методу [6], а малоновый диальдегид (МДА) по методу [3]. Активность супероксиддисмутазы в клетках определяли методом Чевари и соавт. [7], а каталазы [4]. Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью компьютерных программ «Statistica».

Результаты исследований и их обсуждение
Проведенные экспериментальные исследования показали, что вирус инфекционного панкреатического некроза IPNV вызывает активацию окислительных процессов, о чем свидетельствует повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов, а именно: начальных – диеновых конъюгатов, и конечных ТБК-активных продуктов – малонового диальдегида в печени радужной форели, которые инфицированы вирусом IPNV. Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице.

Таблица

Содержание продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в печени радужной форели (P ≤ 0,05-0,001; M ± m, n = 10)

Показатель	Контроль	I этап	II этап	III-этап
ДК, нмоль/мг белка	10,58 ± 0,7	10,89 ± 0,83	11,21 ± 0,75	11,53 ± 0,67
МДА, нмоль/мг белка	2,85 ± 0,29	5,45 ± 0,12	6,28 ± 0,65	6,55 ± 0,15
СОД, у. е. /мг белка	0,65 ± 0,14	0,43 ± 0,08	0,34 ± 0,9	0,30 ± 0,88
Каталаза, H ₂ O ₂ /мин. /мг белка	42,9 ± 0,12	35,62 ± 0,16	38,18 ± 1,44	40,75 ± 0,75

Так, увеличение в печени диеновых конъюгатов в инфицированных группах по сравнению с показателями здоровых рыб повышалось в начальный период на 3%. В середине инфекционного периода зафиксировано увеличение на 6%, а к концу показатели повышались на 9% относительно контрольных значений. Повышение уровня МДА проходило синхронно с диеновыми конъюгатами, достигая увеличения по сравнению с показателями здоровых рыб более чем в 2 раза соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о нарушениях в функционировании про-антиоксидантной системы в гепатоцитах рыб при действии вируса. Такое индуцированное увеличение содержания продуктов ПОЛ может происходить за счет уменьшения микровязкости мембран [1].

Регуляция свободнорадикального окисления обеспечивается в клетке системой антиоксидантной защиты, которая включает несколько элементов, ингибирующих процессы образования свободных радикалов или инактивирующих продукты перекисного окисления. Исходя из вышеизложенного мы изучали активность СОД в печени радужной форели, пораженной IPNV. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1 согласно которым, происходит снижение супероксиддисмутазной активности в гепатоцитах форели. Так, в начальный период инфекционного периода рыб активность фермента составляла 66% от значения контроля. В середине и на конечной стадии инфекционного процесса наблюдается дальнейшее снижение супероксиддисмутазной активности практически в 2 раза и составило 55% относительно контрольных данных.

Из полученных результатов следует, что при действии вируса инфекционного панкреатического некроза IPNV наблюдаются нарушения в функционировании фермента супероксиддисмутазы – важного звена антиоксидантной защиты (АОЗ) организма, который обеспечивает регуляцию свободнорадикальных процессов клеточного метаболизма. Снижение активности СОД в печени форели можно рассматривать как проявление определенного истощения антиоксидантной системы защиты организма вследствие постепенного повреждения ее компонентов свободными радикалами и продуктами ПОЛ.

Ведущая роль в защите клеток от окислительной нагрузки принадлежит каталазе, которая утилизирует пероксид водорода, а ее активность указывает на существенный вклад этого соединения в развитие

перекисных процессов. Полученные результаты по исследованию активности каталазы в печени форели показали, что влияние вируса IPNV приводит к значительным изменениям активности фермента (таблица 1). Так, установлено уменьшение ферментативной активности каталазы в гепатоцитах форели на протяжении всех периодов изучения: в начальный период на 17%, в середине инфицированного периода на 11%, а в конце, активность фермента была ниже контроля на 5% по сравнению с контрольными значениями. Установленное изменение уровня активности каталазы может быть вызвано различными причинами. Во-первых, инактивация фермента которая, возможно, вызвана избытком активных форм кислорода, повышенное генерирование которых при развитии окислительного стресса доказано [10]. В то же время известно, что супероксидный радикал является сильным ингибитором каталазы [9]. Во-вторых, снижение уровня каталазы может быть связано также мутацией и окислительной деструкцией ДНК при окислительном стрессе. И, наконец, уровень активности ферментов в клетках, как известно, регулируется скоростями их синтеза и распада. Также каталаза принимает участие и в других параллельных реакциях, связанных с ионными процессами метаболизма H_2O_2 . В частности, это могут быть превращения в пероксисомах, где этот фермент составляет 40% содержимого органеллы [5].

Таким образом, совокупность полученных результатов, полученные при исследовании показателей ДК, МДА, СОД, каталазы свидетельствуют о нарушении механизмов реагирования ферментативного звена антиоксидантной защиты при действии вируса инфекционного панкреатического некроза, что, вероятно, может быть результатом определенного истощения антиоксидантной системы защиты вследствие накопления активных кислородных метаболитов.

Выводы. Действие вируса инфекционного панкреатического некроза нарушает равновесие в про-оксидантно-антиоксидантной системе гепатоцитов радужной форели, и проявляется интенсификацией процессов перекисного окисления липидов, снижением мощности антиоксидантной защиты, что позволяет рассматривать полученные результаты, как одно из звеньев в патогенезе заболевания.

Перспективы дальнейших исследований. Направление дальнейших исследований по данной проблематике связаны с изучением динамики процессов перекисного окисления липидов в процессе развития вирусной инфекции.

Литература

1. Владимиров Ю. А. Свободнорадикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран / Ю. А. Владимиров // Биофизика. – 1987. – Т. 32, Вып. 5. – С. 830-841.
2. Головина Н. А. Ихтиопатология / Н. А. Головина, О. Н. Бауер. – Москва: Мир, 2007. – 448 с.
3. Корабейникова С. Н. Модификация выделения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с ТБК / С. Н. Корабейникова // Лабораторное дело. – 1989. – № 7. – С. 8-9.
4. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк Л. И., Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.

5. Левадная О. В. Соотношение между величинами активности ферментов антиоксидантной системы в различных тканях интактных крыс / О. В. Левадная, Г. В. Донченко, В. М. Валуцина [и др.] // Укр. биохим. журн. - 1998. - Т. 70, № 6. - С. 53-58.
6. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили : Под ред. В. Н. Ореховича. - М. Медицина. - 1977. - 391 с.
7. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лабораторное дело. - 1985. - Вып. 11. - С. 678-681.
8. Escobar J. A. SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals / J. A. Escobar, M. A. Rubio, E. A. Lissi // Free Radical Biol. Med. - 1996. - Vol. 20, № 3. - P. 285-290.
9. Fridovich I. Superoxide radical and Superoxide dismutase / I. Fridovich // Ann. Rev. Biochem. - 1995. - Vol. 64. - P. 97-112.
10. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence / B. Halliwell // Lancet. - 1994. - P. 721-724.
11. Winston G. W. Oxidant and antioxidant in aquatic animals / G. W. Winston // Comp. Biochem. Physiol. - 1991. - Vol. 100, № 1-2. - P. 173-176.

УДК 578:597. 2/5

СТАН ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ У ПЕЧІНЦІ ЦЬОГОЛІТОК РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ (ONCORHYNCHUS MYKISS) ПРИ ІНФІКУВАННЯ ВІРУСОМ ІНФЕКЦІЙНОГО ПАНКРЕАТИЧНОГО НЕКРОЗУ

Матвієнко Н. М., Драган Л. П., Фріштак О. М.

Резюме. Представлені результати вивчення біохімічних змін в організмі райдужної форелі під дією вірусної інфекції. Отримані результати свідчать про те, що дія вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) порушує рівновагу в прооксидантно – антиоксидантній системі гепатоцитів райдужної форелі, і проявляється інтенсифікацією процесів пероксидного окислення ліпідів, зниженням потужності антиоксидантного захисту, що дозволяє розглядати отримані результати, як одну з ланок в патогенезі захворювання.

Ключові слова: райдужна форель, вірус інфекційного панкреатичного некрозу, система антиоксидантного захисту.

УДК 578:597. 2/5

СОСТОЯНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ СЕГОЛЕТОК РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (ONCORHYNCHUS MYKISS) ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВИРУСОМ ИНФЕКЦИОННОГО ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА

Матвиенко Н. Н., Драган Л. П., Фриштак Е. М.

Резюме. Представлены результаты изучения биохимических изменений в организме радужной форели под действием вирусной инфекции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что действие вируса инфекционного панкреатического некроза (IPNV) нарушает равновесие в прооксидантно-антиоксидантной системе гепатоцитов радужной форели, и проявляется интенсификацией процессов пероксидного окисления липидов, снижением мощности антиоксидантной защиты, что позволяет рассматривать полученные результаты, как одно из звеньев в патогенезе заболевания.

Ключевые слова: радужная форель, вирус инфекционного панкреатического некроза, система антиоксидантной защиты.

UDC 578:597. 2/5

The State of Lipid Peroxidation in Liver of Young-of-the-Year Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Infected with Pancreatic Necrosis Virus

Matvienko N. N., Dragan L. P., Frishtak Ye. M.

Abstract. The paper contains results of studies on biochemical changes in rainbow trout organism under the effect of viral infection. Oxidative degradation, which occurs due to the accumulation of excess oxidation products and can cause a large number of pathological conditions, is a result of general non-specific reaction of cells and organism as a whole on external factors, one of which is the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). According to the international taxonomy of viruses, this virus belongs to the genus *Aquabirnavirus* of the family *Birnaviridae*. For identification of possibility of oxidative stress development, we studied the state of lipid peroxidation in liver homogenates of clinically healthy young-of-the-year rainbow trout and their analogues experimentally infected with pancreatic necrosis virus.

Young-of-the-year rainbow trout were reared in a specialized farm in Rivne region and were adapted for 14 days under aquarium conditions of the Ichthyopathology department of the IF NAAS. The fish were examined for bacterial and viral infections.

The Ukrainian isolate IPNV VF-11 (6.8 LG TTsD50/cm³) was used for infection contamination. The virus was maintained in the laboratory collection of the IF NAAS.

The experiments used 10 % liver homogenates of fish for biochemical analyzes. Sampling was carried out on the 3th, 12th and 22th day after the viral contamination. The level of diene conjugates (DC) and malondialdehyde (MDA)

was used for determination of the status of lipid peroxidation (LPO) in liver homogenates. The state of antioxidant (AO) defense activity was determined by the AO enzymes – superoxide dismutase (SOD) and catalase.

The experimental results showed that the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) promoted the activation of oxidative processes, and this indicates an increase of lipid peroxidation products such as: primary metabolites – diene conjugates (DC), and final – of malondialdehyde (MDA) in the rainbow trout liver homogenates infected with virus IPN, in the disease dynamics. Determination of SOD activity in the liver homogenates of rainbow trout in middle and final periods of infection showed a decrease in SOD activity by 66 and 55%, respectively, compared to control values.

A decrease of enzymatic activity of catalase in the liver homogenates of rainbow trout during the infection period was observed. During the initial period, we observed a decrease of this value by 17% relative to control values, in the mid-infected period by 11%, and finally the enzyme was lower than the control by 5%, indicating on an intensification of the process of hydrogen peroxide formation in liver homogenates, excessive activation of free radical reactions associated with the accumulation of lipoperoxide products. The observed changes in the catalase activity level may be due to various reasons. First, the enzyme inactivation that may be caused by an excess of reactive oxygen species, an increased production of which during the oxidative stress has been proved. At the same time, it is known that the superoxide radical is a potent catalase inhibitor. Secondly, a decrease of catalase level can also be caused by mutation and oxidative DNA degradation under oxidative stress. Finally, the level of enzyme activity in cells, as is known, is regulated by the rates of their synthesis and decomposition. The catalase participates in other parallel reactions associated with ionic processes of H_2O_2 metabolism. In particular, this may be conversions in peroxisomes, where this enzyme composes 40% of organelle content.

The obtained results show that IPNV action impairs the balance in the peroxidative-antioxidative system in hepatocytes of rainbow trout and is manifested as an intensification of lipid peroxidation processes, reduction of antioxidative protection capacity that allows considering the obtained results as one of the components of the disease pathogenesis.

Keywords: rainbow trout, infectious pancreatic necrosis virus, antioxidative protection system, lipids.

Рецензент – проф. Дубінін С. І.

Стаття надійшла 12. 06. 2014 р.