РАЗДЕЛ II. БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 578:597.552.512

Л.П. Драган

Институт рыбного хозяйства Национальной академии аграрных наук,
Киев, 03164
e-mail: dragan_l@ukr.net

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ СЕГОЛЕТОК РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*ONCORHYNCHUS MYKISS*), ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ IPN

Вирусные инфекции гидробионтов, возникающие в процессе интенсивного развития аквакультуры, наносят значительный ущерб в этой области. Наибольший урон производству рыбы причиняют вирусы панкреатического некроза. Вирус способствует некротическому поражению поджелудочной железы, а также провоцирует оксидативный стресс, усиливая тем самым процессы перекисного окисления липидов.

В результате проведенных исследований установлено, что инвазия вируса инфекционного панкреатического некроза нарушает равновесие в прооксидантно-антиоксидантной системе в сыворотке крови радужной форели и проявляется интенсификацией процессов перекисного окисления липидов, снижением эффективности антиоксидантной защиты, позволяет рассматривать полученные результаты как существенное звено в патогенезе инфекционного заболевания.

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

L.P. Dragan (Institute for Fisheries of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kiev, 03164) **Assessment of the antioxidant system in the blood serum of fingerling rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) infected with IPN virus**

Viral infections of hydrobionts arising in the process of aquaculture intensive development cause considerable damage in this field. The biggest losses of fish production cause viruses of pancreatic necrosis. Virus promotes necrotic damage of pancreas and also provokes stress increasing the processes of lipids oxidation. Astheresult of carried out research it is established that virus invasion of infectious pancreatic necrosis disturbs the balance in provident-antioxidant system in the blood serum of fingerling rainbow trout and is displayed by intensification of lipids oxidation, degradation of antioxidant protection, allows to consider the obtained results as a significant chain in pathogenesis of infectious disease.

Key words: rainbow trout, virus of infectious pancreatic necrosis, antioxidant protection system.

DOI: 10.17217/2079-0333-2015-31-56-60

Значительную угрозу для успешного развития аквакультуры в условиях ее искусственного воспроизводства представляют заболевания объектов культивирования, при этом наибольший вред наносят вирусные инфекции рыб. Инфекционный панкреатический некроз (IPN) является одним из самых распространенных заболеваний, приносящих большой ущерб рыбоводству. Возбудитель этого заболевания – вирус инфекционного панкреатического некроза (IPNV), который принадлежит к роду *Aquabirnavirus* семьи *Birnaviridae* [1, 2]. Естественным хозяином вируса IPN являются лососевые рыбы. Вирус распространен по всему миру, он может вызывать эпизоотии, результатом которых являются огромные расходы в инкубаторах мальков лососевых рыб. Вирус способствует некротическому поражению поджелудочной железы, а также провоцирует оксидативный стресс, усиливая тем самым процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Известно, что баланс образования и расходов перекисей и других продуктов окисления может нарушаться при развитии патологического процесса, а метаболиты перекисей накапливаются в тканях и биологических жидкостях. Это приводит к существенным изменениям, в первую очередь, в биологических мембранах. Следствием активизации ПОЛ может быть изменение физико-химических свойств мембранных белков и липидов, изменение активности мембранно-связанных ферментов, нарушение проницаемости мембран, уменьшение электрической стабильности липидного слоя.

Изучение закономерностей развития реакций перекисного окисления липидов и изменений в системе антиоксидантной защиты, призванной ограничивать интенсивность процессов ПОЛ, имеет важное диагностическое и прогностическое значение [3, 4].

Данные научной литературы о состоянии антиоксидантной системы и интенсивности ПОЛ в организме лососевых рыб при вирусных инфекциях практически отсутствуют, отдельные работы не дают полного представления о влиянии вируса инфекционного некроза поджелудочной железы на особенности перекисного окисления липидов и активность антирадикальной защиты в органах и тканях рыб. Поскольку кровь является чувствительным и информативным индикатором состояния организма, быстро реагирующим на изменения экзогенных и эндогенных факторов, целью данной работы было исследование биохимических изменений в организме сеголетки радужной форели в динамике развития инфекционного панкреатического некроза. Полученные результаты являются актуальными и необходимыми для оценки состояния здоровья рыб.

Материалы и методы

Для исследований использовали сеголеток радужной форели. Опыты по искусственному инфицированию рыб исследовали в лабораторных условиях, в емкостях объемом 40 дм^3 при температуре воды 12°С. Для биопробы были сформированы две группы сеголеток радужной форели (Oncorhynchus mykiss) – опытная и контрольная – в количестве 10 экз. в каждой массой до 15 г. Заражение вирусом IPN проводили методом внутрибрюшинной инъекции. Для биохимических исследований использовали сыворотку крови рыб. Кровь брали с хвостовой вены рыбы на 3-й, 12-й и 22-й день после инфицирования вирусом. В сыворотке крови определяли состояние перекисного окисления липидов (ПОЛ) по уровню диеновых конъюгатов (ДК) [5] и малонового диальдегида (МДА) [6]. Состояние антиоксидантной защиты (АО) определяли по активности АО ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) [7] и каталазы [8]. Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью компьютерных программ «Statistica» для Windows.

Результаты и обсуждение

Оценку состояния перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы (АОС) в сыворотке крови рыб оценивали по концентрации диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА). Поскольку ДК (как промежуточные продукты ПОЛ) и МДА (как один из конечных продуктов ПОЛ) появляются на стадии образования свободных радикалов, то их наличие в избыточном количестве свидетельствует о накоплении в тканях организма перекисей, гидроперекисей, соединений, которые оказывают повреждающее действие на клетку [3]. Проведенные экспериментальные исследования свидетельствуют, что по содержанию диеновых конъюгатов в сыворотке крови исследуемого вида рыб обнаружены существенные изменения (см. табл.).

Основные биохимические показатели перекисного окисления липидов в сыворотке крови сеголеток радужной форели, инфицированных вирусом IPN ($P \leq 0{,}05$; $M \pm m$, $n = 10$)

Название показателя	Контроль	Развитие инфекционного процесса		
		3-й день (начало)	12-й день (середина)	22-й день (конец)
Диеновые конъюгаты нмоль/мг белка	0,57 ± 0,05	0,76 ± 0,08	0,50 ± 0,05	0,85 ± 0,09
МДА нмоль/мг белка	1,01 ± 0,09	0,79 ± 0,02	1,78 ± 0, 15	2,46 ± 0,18
СОД у. е./мг белка за мин	5,40 ± 0,31	5,73 ± 0,35	4,83 ± 0,39	4,53 ± 0,36
Каталаза ммоль/мг белка за мин	20,51 ± 1,7	30,98 ± 1,9	25,60 ± 2,1	29,09 ± 2,7

Так, в начальный период заболевания установлено увеличение ДК на 33% относительно контроля. В середине инфекционного периода выявлено снижение ДК на 12% а в конце – повышение на 49% относительно контрольных значений. Следует отметить, что в начальный период вирусного поражения в сыворотке крови рыб установлено снижение МДА на 22% относительно контрольного показателя, и в отличие от показателей диеновых конъюгатов, в дальнейшем повышение содержания малонового диальдегида происходило более интенсивно. В частности, в середине инфекционного периода на 76%, а в конце на 2,4 раза соответственно относительно контрольных показателей. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, показавших изменение (повышение и понижение) отдельных ферментов у рыб, обитающих в условиях антропогенной нагрузки и в опытах [4, 9]. Накопление избытка одного из конечных молекулярных продуктов перекисного образования (МДА) указывает на то, что длительное воздействие вируса IPN приводит к сдвигу окислительно-восстановительного баланса, нарушению регуляции процессов перекисного окисления липидов и окислительному стрессу, свидетельствуя об ответной защитной реакции организма на физиолого-биохимическом уровне на действие стрессорного неспецифического для организма фактора.

К антиоксидантной системе, которая контролирует и блокирует все этапы свободнорадикальных реакций, относят ферменты антиоксидантной защиты: СОД, каталазу, глутатионредуктазу, глутатионпероксидазу и глутатионтрансферазу. Аналогичный эффект оказывают также низко- и высокомолекулярные соединения, которые содержат тиольные- и селеногруппы (цистеин, цистин, глутатион, витамины Е, С и др.) [10, 11].

СОД является важным регулятором окислительного гомеостаза клетки, одним из компонентов физиологической антиоксидантной системы защиты организма, роль которой становится значимой при различных свободнорадикальных патологических состояниях [12, 13]. Фермент катализирует реакцию обезвреживания супероксидных радикалов ($O_2^{\bullet}$) путем их дисмутации с образованием менее реакционноспособных молекул перекиси водорода и синглетного кислорода [12, 14]. СОД – единственный среди наиболее активных антиоксидантных ферментов, непосредственно обеспечивающий блокировку цепей оксигензависимых свободнорадикальных реакций в клетках.

С учетом современных представлений о ведущей роли СОД в метаболизме активных форм кислорода и существенного вклада супероксидных радикалов в индукцию и развитие оксидативного стресса нами проводились исследования активности цитоплазматической СОД в сыворотке крови, инфицированной вирусом IPN сеголеток радужной форели.

В условиях нашего эксперимента в сыворотке крови исследуемого вида рыб, инфицированных вирусом IPN, был установлен рост супероксиддисмутазной активности в начале вирусного поражения рыб на 6% по сравнению с контрольным показателем, свидетельствующий об эффективности энзиматической системы защиты для поддержания окислительно-антиоксидантного гомеостаза в ответ на усиленную генерацию активных форм кислорода. Полученные результаты коррелируют с результатами соответствующих исследователей, установивших закономерности изменений в активности данного фермента в крови клинически здоровых двухлеток карпа и их аналогов, пораженных ассоциированной формой краснухи [13, 15, 16].

Установленное нами повышение активности СОД на начальном этапе инфицирования можно расценивать как реакцию антиоксидантной системы в ответ на увеличение в клетках концентрации супероксидного анион-радикала, поскольку известно, что изменение активности СОД тесно связано с содержанием $O_2^{\bullet}$.

Известно, что биосинтез внутриклеточных ферментов антиокислительной системы является генетически детерминированным, а обусловленный действием стрессового фактора рост концентрации активных форм кислорода приводит к прямому нарушению структурной организации молекулы ДНК и, как следствие, к активации транскрипции ряда генов, среди которых и гены отдельных компонентов антиоксидантной системы. Подобный принцип регуляции наиболее детально исследован на бактериальных клетках [14].

Определение активности СОД в сыворотке крови форели в середине и конце инфекционного периода показало снижение активности СОД на 11 и 17% соответственно относительно контрольных значений (см. табл.).

Подобная динамика активности СОД в условиях нашего эксперимента может быть объяснена регуляторными эффекторами проявления активности этого фермента. Регуляция активности

СОД осуществляется всей многокомпонентной редокс-системой клетки. Интермедиаты окислительно-восстановительного метаболизма (NADPH-зависимые редокс-цепи митохондрий, эндоплазматического ретикулума), которые являются генераторами $O_2^{\bullet}$, могут выполнять двойную роль: активировать синтез энзима в условиях роста концентрации доноров электронов или подавлять его активность в случае накопления акцепторов [12, 14].

Таким образом, полученные результаты указывают, что при действии вируса инфекционного панкреатического некроза IPN сеголеток радужной форели происходит нарушение в функционировании фермента супероксиддисмутазы – важного звена антиоксидантной защиты организма, которое обеспечивает регуляцию свободнорадикальных процессов клеточного метаболизма. Снижение активности СОД в сыворотке крови исследуемого вида рыб можно рассматривать как проявление определенного истощения антиоксидантной системы защиты организма вследствие постепенного повреждения ее компонентов свободными радикалами и продуктами ПОЛ [12].

Ведущая роль в защите клеток от окислительной нагрузки принадлежит каталазе, которая утилизирует перекись водорода (H_2O_2), а ее активность указывает на значимый вклад в развитие перекисных процессов в организме. Исследование активности каталазы в сыворотке крови сеголеток радужной форели в условиях инфицирования вирусом IPN показали существенные отличия от контрольных значений. Так, установлено повышение ферментативной активности каталазы в сыворотке крови форели – в начальный период на 4% от контрольных значений. В середине инфицированного периода на 5%, а в конце активность фермента была выше контрольного показателя на 24%, что свидетельствует об интенсификации процесса образования в сыворотке крови перекиси водорода, чрезмерную активацию свободнорадикальных реакций, связанную с накоплением перекисных продуктов.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что при развитии вирусной инфекции происходит накопление продуктов пероксидации в сыворотке крови радужной форели и, как следствие, увеличивается содержание свободнорадикальных соединений, что в свою очередь приводит к стрессу и развитию патологического процесса.

Литература

1. *Головина Н.А., Бауер О.Н.* Ихтиопатология. – М: Мир, 2007. – 448 с.

2. *Ahne W., Negele R.D.* Studies on the transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of salmonid fish // In: Ellis, A.E. (Ed.), Fish and Shellfish Pathology. – London: Academic Press, 1985. – P. 262–270.

3. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.

4. *Рецкий М.И., Бузлама В.С., Шахов А.Г.* Значение антиоксидантного статуса в адаптивной гетерогенности и иммунологической резистентности животных // Ветеринарная патология. – 2003. – № 2. – С. 63–65.

5. *Стальная И.Д.* Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирних кислот // Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 63–64.

6. *Корабейникова С Н.* Модификация выделения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с ТБК // Лабораторное дело. – 1989. – № 7. – С. 8–9.

7. *Дубинина Е.Е., Сальникова Л.Ф.* Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов // Лабораторное дело. – 1983. – № 10. – С. 30–33.

8. *Королюк М.А., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – № 1 – С. 16–18.

9. *Драган Л.П., Матвиенко Н.Н.* Состояние антиоксидантной системы карпа (*Cyprinus carpio*) при инфицировании вирусом весенней виремии // Международный научно-исследовательский журнал. – 2014. – № 6 (25). Ч. 1. – С. 26–27.

10. Антиоксидантна система захисту організму / І.Ф. Бєленічев, Е.Л. Левицький, Ю.Л. Губський, С.І. Коваленко, О.М. Марченко // Сучасні проблеми токсикології . – 2002. – № 3. – С. 25–30.

11. *Петрова Г.В., Капралов А.А., Донченко Г.В.* Витамин Е и апоптоз // Укр. біохім. журн. – 2003. – Т. 75. – № 6. – С. 25–34.

12. *Барабой В.А.* Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы. – К: Фитоцентр, 2006. – 424 с.

13. *Драган Л.П.* Влияние вируса инфекционного панкреатического некроза на процессы перекисного окисления липидов в печени рыб // Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей России: материалы Междунар. конф. – Ростов/н/Д., 2014. – С. 28–31.

14. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б.* Окислительный стресс. Биохимический и патологический аспекты. – М.: МАИК, 2001. – 343 с.

15. *Тушницька Н.Й.* Імунний статус коропа при захворюванні асоційованою формою краснухи // Біологія тварин. – 2006. – Т. 8, № 1–2. – С. 251–254.

16. *Тушницька Н.Й., Янович В.Г., Матвієнко Н.М.* Антиоксидантний статус коропа при захворюванні асоційованою формою краснухи // Наук.-техн. бюл. Інст. біол. твар. та ДНДКІ ветпреп. і корм. доб. – 2006. – Вип. 7, № 1, 2. – С. 182–186.

УДК 582.533(265.52)

А.В. Климова[1], Р.С. Клюкина[1], А.А. Бонк[1,2], Н.Г. Клочкова[1]

[1]Камчатский государственный технический университет,
Петропавловск-Камчатский, 683003;
[2]Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства
и океанографии (КамчатНИРО),
Петропавловск-Камчатский, 683000
e-mail: annaklimovae@mail.ru

УЧАСТИЕ МОРСКИХ ТРАВ В ФОРМИРОВАНИИ НЕРЕСТОВОГО СУБСТРАТА КОРФО-КАРАГИНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ТИХООКЕАНСКОЙ СЕЛЬДИ

Приводятся результаты изучения сезонного развития и распределения морской травы *Zostera marina* в заливе Корфа (в гаванях Сибирь и Скобелева). Впервые представлены данные по размерным характеристикам ее беринговоморской популяции в весеннее время. На основе использования спутниковых аэрофотоснимков даны экспертная оценка запасов *Zostera* и площадь ее зарослей в мелководной зоне залива. В северной его части общая площадь дна, занимаемого морскими травами, равна 11,19 км^2, суммарная сухая масса – более 5 тыс. тонн. Показано, что общая поверхность растительного субстрата, формируемого *Zostera*, полезная для нереста корфо-карагинской популяции тихоокеанской сельди, составляет не менее 28,86 км^2.

Ключевые слова: *Zostera marina*, *Zosteraceae*, морские травы, тихоокеанская сельдь, кладки икры, нерестовый субстрат, залив Корфа, восточная Камчатка.

A.V. Klimova[1], R.C. Klyukina[1], A.A. Bonk[1,2], N.G. Klochkova[1] ([1]Kamchatka State Technical University, Petropavlovsk-Kamchatsky, 683003; [2]Kamchatka Research Institute of Fishery and Oceanography (KamchatNIRO), Petropavlovsk-Kamchatsky, 683000) **The role of sea weeds in formation of spawning substrate of Pacific herring**

The observations of seasonal development and distribution of sea weed *Zostera marina* in the bay of Korf (in the bays Sibir' and Scobeleva) were presented. The information about dimensional characteristics of its Bering Sea population in spring time was submitted for the first time. The expert estimation of *Zostera* reserves and area of its growth in shallow zone of the bay using satellite aero-photographs were given. In its northern part the total bottom square covered with sea weeds is 11,19 km^2, the total dry solid matter is more than 5000 tons. It was detected that the total surface of vegetative substrate formed by *Zostera*, good for spawning of Korf-Karaginskiy population of Pacific herring is not less than 28,86 km^2.

Key words: Zostera marina, Zosteraceae, sea weeds, Pacific herring, eggs laying, spawning substrate, the bay of Korf, eastern Kamchatka.

DOI: 10.17217/2079-0333-2015-31-60-66

Виды рода *Zostera* являются морскими травами семейства взморниковых высших цветковых растений. Они относятся к гидрофитам, у которых вся жизнь, в том числе и период размножения, проходит под водой. Представители рода широко распространены в холодных и умеренных водах