

СОСТОЯНИЕ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ КАРПА ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВИРУСОМ ВЕСЕННЕЙ ВИРЕМИИ

Н. Матвиенко¹, Л. Драган², Е. Фриштак³

¹ кандидат биологических наук, заведующий отделом ихтиопатологии, ² кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии в рыбоводстве, ³ кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник отдела ихтиопатологии

Институт рыбного хозяйства Национальной академии аграрных наук (Киев), Украина

Аннотация. Представлены исследования процессов перекисного окисления липидов в печени сеголеток чешуйчатого карпа, инфицированного вирусом весенней виремии. Полученные результаты и их анализ свидетельствуют о характерных нарушениях системы антиоксидантной защиты вследствие накопления активных форм кислорода под действием вируса.

Ключевые слова: карп, вирус весенней виремии, печень, перекисное окисление липидов.

Вступление. Весенняя виремия карпа – вирусная болезнь карповых рыб возбудителем которой является РНК-содержащий вирус, отнесенный к семейству Rhabdoviridae, роду Vesiculovirus и назван Rhabdovirus carpio (SVCV) [8]. Вирус SVCV включен в список декларируемых болезней ОИЕ поскольку приносит существенный ущерб специализированным рыбным хозяйствам не только на территории Украины, но и Европы. Одним из патогенных последствий вирусного поражения организма является оксидативный стресс, который развивается в ответ на нарушение сбалансированного функционирования прооксидантной и антиоксидантной систем. При действии вирусной инфекции резко возрастает генерация активных форм кислорода (АФК) в результате действия индуцированных вирусом радикалов [2]. Цитотоксическое действие АФК проявляется в интенсификации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах, повреждении мембраносвязующих белков, инактивации ферментов, повреждении ДНК и в других процессах [3].

Важную роль в защите организма от повреждений вследствие ПОЛ играет, наряду с другими, специализированная многоуровневая система ферментативных антиоксидантов, которые защищают клетку от АФК и инактивируют отдельные продукты свободнорадикального окисления. Одним из этих ферментов является супероксиддисмутаза (СОД). Фермент дисмутирует супероксидные анион – радикалы с образованием перекиси водорода (H₂O₂), которую с большой скоростью разрушает каталаза.

Известно, что печень является важнейшим органом метаболизма рыб с высокой интенсивностью процессов обмена, в том числе липидного. Для печени характерно повышенное содержание нуклеиновых кислот, гликогена, белка, а также общих, структурных и резервных липидов всех классов. Наряду с интенсивными процессами анаболизма и катаболизма, необходимо также отметить и постоянно протекающие в печени активные реакции обезвреживания и биоаккумуляции широкого ряда ксенобиотиков, в том числе и вирусов [12], а также регенерации поврежденных гепатоцитов, что также связано с активацией свободно-радикальных реакций [13]. Для печени характерен также высокий уровень эндогенной НАДФН-зависимой продукции ряда АФК [12]. Все указанные особенности химического состава и функций печени, очевидно, способствуют более активному протеканию процессов ПОЛ в гепатоцитах, чем в клетках других органов рыб.

Учитывая вышеизложенное целесообразно было исследовать состояние процессов перекисного окисления липидов в гомогенатах печени сеголеток чешуйчатого карпа, экспериментально инфицированных вирусом весенней виремии.

Материалы и методы Вирусы: SVCV1 – вирус весенней виремии карпа украинский изолят VCH-1(6,8 lg ТЦД₅₀ ml⁻¹)

Вирусологические методы. Экспериментальное воспроизведение заболевания, титрование вируса в культурах клеток проводили согласно международным нормативным документам [14].

Экспериментальная модель инфекции. В эксперименте использовали сеголетку чешуйчатого карпа, выращенную на экспериментальной базе Института рыбного хозяйства. Рыба была протестирована на наличие инфекционных заболеваний. Рыба содержалась в емкостях объемом 40 дм³ при температуре воды 15⁰С. Были сформированы две группы - опытная и контрольная - в количестве 10 экз. в каждой, средней массой 30 г. После первичной адаптации рыбы проводили ее заражение вирусом методом внутривентральной инъекции.

Биохимические исследования. В опытах использовали 10% гомогенаты тканей печени. Отбор материала проводили на 12-тые сутки после инфицирования вирусом, в период ярко выраженных клинических симптомов. Диеновые конъюгаты (ДК) [6] и малоновый диальдегид (МДА) определяли по методу [4]. Активность супероксиддисмутазы в клетках определяли методом Чевари и соавт. [7], а каталазы [5].

Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью компьютерных программ «Statistica» для Windows.

Результаты и обсуждение. Основным параметром оценки наличия окислительного стресса является накопление первичных и вторичных продуктов свободно-радикального окисления. Продукты перекисного

окисления полиненасыщенных жирных кислот, включая диеновые конъюгаты (ДК) и основной продукт реакции с тиобарбитуровой кислотой – малоновый диальдегид (МДА) являются наиболее информативными показателями наличия окислительного стресса в печени чешуйчатого карпа, которые были инфицированы вирусом (таблица).

Таблица 1

**Содержание продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в печени чешуйчатого карпа
($P \leq 0,05-0,001$; $M \pm m$, $n=10$)**

Показатель	Контроль	SVCV1
ДК, нмоль/мг белка	0,225±0,131	0,879±0,133
МДА, нмоль/мг белка	0,934±0,450	1,374±0,096
СОД, у.е./мг белка	1,989±0,114	1,161±0,034
Каталаза, H ₂ O ₂ /мин./ мг белка	11,774±1,122	9,554±0,936

Согласно проведенным экспериментальным исследованиям в клетках печени инфицированных рыб содержание ДК повышалось в 3,9 раза по сравнению с контрольными значениями. Повышение уровня МДА происходило синхронно с увеличением содержания ДК, достигая величины 1,374±0,096 нмоль/мг белка, что в 1,5 раза выше значений контрольной группы. Накопление содержания продуктов ПОЛ – ДК и МДА при вирусной инфекции указывает на то, что у рыб происходит интенсивный процесс перекисного окисления липидов, который может приводить к развитию окислительного стресса. Учитывая, что ПОЛ характеризует одну из важнейших сторон липидного обмена, является активным метаболическим и регуляторным фактором [1], и отражает накопление промежуточных и конечных метаболитов и физиологически активных интермедиаторов, свидетельствует о соответствующей защитной реакции организма на физиологическом - биохимическом уровне на действие различных стрессорных факторов одним из которых является вирусная инфекция.

Таким образом, при инфицировании вирусом весенней виiremии карпа, происходит рост содержания ПОЛ, продукты которого имеют отношения к повреждению клеток и тканей [9, 11].

Известно, что супероксиддисмутаза играет особую роль в поддержании антиоксидантного статуса клеток как важное звено антиоксидантной защиты (АОЗ) организма, которая обеспечивает регуляцию свободнорадикальных процессов клеточного метаболизма. Фермент катализирует реакцию дисмутации радикала супероксид – аниона (O²⁻) с образованием перекиси водорода и молекулярного кислорода. Каталитическая активность направлена на детоксикацию O²⁻ и, таким образом, фермент предотвращает развитие радикалзависимых реакций на начальной стадии [10]. Исходя, из этого мы изучали активность СОД в печени чешуйчатого карпа, пораженного вирусом. Согласно полученным результатам проведенных исследований, представленных в таблице происходит снижение супероксиддисмутазной активности в гепатоцитах чешуйчатого карпа до 58% от значения контроля. Снижение ферментативной активности СОД может быть следствием окислительной модификации молекулы фермента [11].

В цепи факторов, которые инактивируют продукты свободнорадикального окисления липидов является каталаза – фермент, который катализирует реакцию детоксикации продукта супероксиддисмутазной реакции - перекиси водорода (H₂O₂) и с большой скоростью разрушает ее на молекулу воды и кислород [3]. Полученные результаты по исследованию активности каталазы в печени чешуйчатого карпа показали, что инфицирование вирусом SVCV1 приводит к существенным изменениям активности фермента. Так, установлено уменьшение активности каталазы в гепатоцитах карпа на 19% по сравнению с контрольными значениями, что свидетельствует об интенсификации процессов образования в печени карпа перекиси водорода, чрезмерную активацию свободнорадикальных реакций, связанных с нагромождением липопероксидных продуктов. Уменьшение активности каталазы в печени карпа может быть следствием непосредственного воздействия на фермент продуктов радиолитической воды, так и результатом низкого содержания субстрата, за который с каталазой на ранних этапах после инфицирования рыб конкурирует более специфичная к H₂O₂ глутатионпероксидаза [1].

Таким образом, совокупность результатов, полученных при исследовании показателей ДК, МДА, СОД и каталазы свидетельствует о нарушении механизмов реагирования ферментативного звена антиоксидантной защиты при действии вируса весенней виiremии чешуйчатого карпа что, вероятно, может быть результатом определенного истощения антиоксидантной системы защиты вследствие накопления активных кислородных метаболитов. Этот факт позволяет рассматривать полученные результаты, как одно из звеньев в патогенезе вирусной инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барабой, В.А. Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы. – Киев : Фитоцентр, 2006. – 424с.
2. Дубинина, Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // *Вопр. мед. Химии.* – 2001. – Т. 47. – № 6. – С. 561-581.
3. Зенков, Н.К., Панкин, В.З., Меньшикова, Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. – М. : МАИК. Наука / Интерпериодика, 2001. – 343 с.
4. Корабейникова, С.Н. Модификация выделения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с ТБК//*Лабораторное дело.* – 1989. – № 7. – С. 8-9.

5. Королюк, М.А., Иванова, Л.И., Майорова, И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. Дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
6. Стальная, И.Д., Гаришвили, Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии под ред. Ореховича В.Н. – М. : Медицина, 1977. – 391 с.
7. Чевари, С., Чаба, И., Секей, Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лабораторное дело. – 1985. – Вып. 11. – С. 678-681.
8. Ahne, W., Bjorklund, H.V., Essbauer, S., Fijan, N., Kurath, G. Spring viremia of carp (SVC)// Diseases of Aquatic Organisms. – 2002. – Vol. 52. – N.3. – P. 261-272.
9. Catoni, C., Peters, A., Schaefer, H.M. Life history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants// ANIMAL BEHAVIOUR, 2008. – Vol. 76. – P. 1107-1119.
10. Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases // Annu. Rev. Biochem, 1995. – Vol. 64. – P. 97-112.
11. Halliwell, B., Gutteridge, M.C. Oxygen is a toxic gas - an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species // Epilepsia. – 2004. – Vol. 45. – N. 12. – P. 1549-1559.
12. Livingstone, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms // Mar. Pollut. Bull. – 2001. – 42. – № 8. – P. 656-666.
13. Moore, M.N. Molecular and cellular pathology: summary // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1992. – 91. – P. 117-119.
14. OIE. 2009. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. – 3 th Edition. – Paris, Word Organization for Animal Health (Chapter 2.3.8.)

Материал поступил в редакцию 20.02.14.

PROCESS STATES OF LIPIDS PEROXYGENATION IN CELLS OF CARP LIVER AT VIRUS INFECTION OF SPRING VIREMIA

N. Matviyenko¹, L. Dragan², E. Frishtak³

¹ Candidate of Biology, Head of Department of Ichthyopathology,

² Candidate of Biology, Senior Researcher of Laboratory of Biotechnology in Fishery,

³ Candidate of Agricultural Sciences, Senior Researcher of Department of Ichthyopathology
Institute for Fisheries of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences (Kiev), Ukraine

Abstract. *Researches of processes of lipids peroxygenation in a liver of fingerlings of scaly carp infected of spring viremia are presented. The received results and their analysis indicate the characteristic abnormalities of system of antioxidant protection owing to accumulation of active forms of oxygen under the influence of a virus.*

Keywords: *carp, spring viremia, liver, lipids peroxygenation.*