Rocz. Nauk. Zoot., T. 41, z. 2 (2014) 119–127

ДИНАМИКА ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ СЕГОЛЕТОК РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ИНФЕКЦИОННОГО ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА*

Наталия Матвиенко[1], Людмила Драган[1], Елена Фриштак[2]

[1]Институт рыбного хозяйства Национальной академии аграрных наук, ул. Обуховская 135, Киев, 03164, Украина
[2]Львовская опытная станция Института рыбного хозяйства Национальной академии аграрных наук, ул. Львовская 11, Городоцкий район, Львовская обл., пгт. Любинь Великий, 81555, Украина

Представлены результаты изучения биохимических изменений в организме радужной форели под действием вирусной инфекции. Окислительная деградация, которая возникает впоследствии накопления избытка продуктов окисления и способна вызывать большое количество патологических состояний – является результатом общей неспецифической реакции клеток и организма в целом на внешние факторы, одним из которых является вирус инфекционного панкреатического некроза (IPN). С целью выяснения возможности развития оксидативного стресса исследовали динамику процессов перекисного окисления липидов в гомогенатах печени клинически здоровых сеголеток радужной форели и их аналогов, экспериментально инфицированных вирусом инфекционного панкреатического некроза. Полученные результаты свидетельствуют о том, что действие вируса инфекционного панкреатического некроза (IPN) 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, липиды

---

*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”, № госрегистрации 0111U006973.

С возникновением потенциальной угрозы распространения вирусных болезней рыб и случаев повышенной гибели среди лососевых рыб в хозяйствах Украины, возникла необходимость в изучении биологических особенностей вирусных патогенов рыб и их влиянии на организм. Анализ ихтиопатологической ситуации на предприятиях, которые занимаются искусственном воспроизводством лососевых рыб и природных водоемов показал, что повышенный интерес для Украины в этом отношении представляет вирус инфекционного панкреатического некроза (IPN). Возбудителем инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб является вирус рода *Aquabirnavirus* семьи *Birnaviridae*. IPN чаще всего поражает мальков и сеголеток лосося. Гибель при этом достигает до 70% (Головина и др., 2007). 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) (Winston, 1991). С целью выяснения возможности развития оксидативного стресса исследовали динамику процессов перекисного окисления липидов в гомогенатах печени клинически здоровых сеголеток радужной форели и их аналогов, экспериментально инфицированных вирусом инфекционного панкреатического некроза.

Материалы и методы

Вирусы

IPN1 изолят -VF-11(6,8 lg ТЦД50/см^3), выделен в природных водоемах западной части Украины, IPN2 изолят – “B09O m.f “, (8,5 lg ТЦД50/см^3) выделенный в специализированном хозяйстве России Вирусы поддерживали в лабораторной коллекции Института рыбного хозяйства (ИРГ НААН).

Вирусологические методы

Отбор и обработку патологического материала, выделение вируса из патологического материала, накопление вируса в культурах клеток, экспериментальное воспроизведение заболевания, титрование вируса в культурах клеток проводили согласно международных нормативных до-кументов (Мейхи, 1988; OIE, 2003).

Очистка вируса

Изоляты вирусов были очищены и концентрированы в полиэтиленгликоле (ПЭГ) в соответствии с методом Mahi и Kangro (1996).

Экспериментальная инфекция

В эксперименте использовали радужную форель, выращенную на экспериментальной базе ИРГ НААН. Рыба тестирована на наличие инфекционных заболеваний. Опыты по искусственному заражению рыб проводились в лабораторных условиях в ваннах объемом 40 дм^3 при температуре воды 12ºС.

Для экспериментальной инфекции 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 IPN методом внутрибрюшинной инъекции. Доза введения – 0,1 мл. Контрольным рыбам вводили такое же количество культуральной жидкости, не зараженной вирусом культуры клеток. После заражения проводили ежедневное наблюдение за рыбой. Ежедневно регистрировали отклонения в поведении рыбы, при развитии заболевания – клинические, патологоанатомические изменения и суточную смертность рыб. Для биохимических анализов использовали 10% гомогенаты тканей печени. Отбор материала проводили в 3 этапа: I- на 3-тий, II- 12-тый и III – 22-ой день после инфицирования вирусом. Изучали концентрацию диеновых коньюгатов (ДК) по методу, который базируется на реакции оптической плотности гептанизопропанольного экстракта липидов. (Стальная, 1997). Определение концентрации малонового диальдегида (МДА) проводили спектрофотометрически по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (Коробейников, 1989). Активность супероксиддисмутазы (СОД) – по методу, описанному Е. Е. Дубининой с соавт. (1983). Активность каталазы – по изменению концентрации H_2O_2 – согласно с методом, описанным М.А. Королюк (1988). Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью компьютерных программ «Statistica” для Windows.

Результаты

Проведенные экспериментальные исследования показали, что вирус инфекционного панкреатического некроза IPN вызывает активацию окислительных процессов, о чем свидетельствует повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов, а именно: начальных – диеновых конъюгатов, и конечных продуктов – малонового диальдегида в печени радужной форели, которые инфицированы вирусом IPN1 и IPN2. Результаты полученных экспериментов представлены на рис. 1–3. Так, увеличение в печени диеновых конъюгатов в инфицированных группах по сравнению с показателями здоровых рыб повышалось в начальный период на 3 и 7%, соответственно IPN1 и IPN2. В середине инфекционного периода в обеих инфицированных группах зафиксировано увеличение на 6%, а к концу показатели повышались на 9 и 5% относительно контрольных значений. Повышение уровня МДА проходило синхронно с диеновыми конъюгатами, достигая на начальном периоде инфицирования увеличения по сравнению с показателями здоровых рыб в 2,6 и 2,3 раза соответственно с исследуемыми вирусами IPN1 и IPN2. Полученные результаты свидетельствуют о нарушениях в функционировании про- антиоксидантной системы в гепатоцитах рыб под воздействием вирусов IPN1 и IPN2. Такое индуцированное увеличение содержания МДА продуктов может происходить за счет уменьшения микровязкости мембран (Владимиров, 1987).

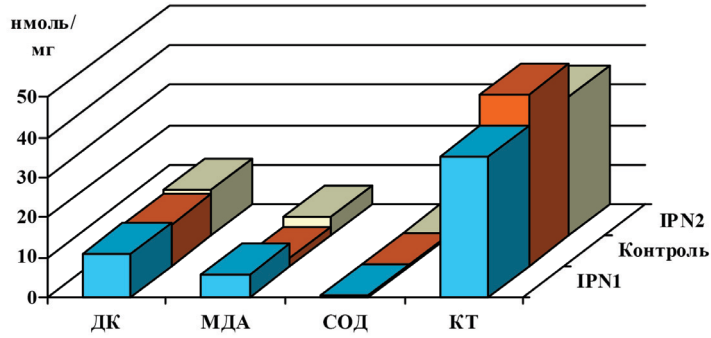

Рис. 1 Содержание продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в печени радужной форели на начальном этапе инфицированного процесса (3-тий день после экспериментального инфицирования) (P≤0,05–0,001; M±m,n=10)

Figure 1. The content of lipid peroxygenation products and antioxidant enzymes activity in liver of rainbow trout in the primary stage of infectious process (3rd day after experimental infection) (P≤0.05–0.001; M±m, n=10)

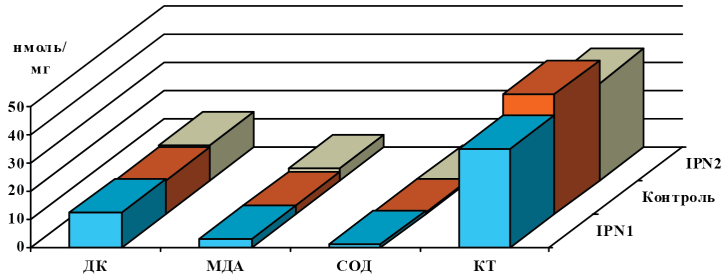

Рис. 2 Содержание продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в печени радужной форели в период активного проявления клинический признаков заболевания (12 день, после инфицирования) (P≤0,05–0,001; M±m,n=10)

Figure 2. The content of lipid peroxygenation products and antioxidant enzymes activity in liver of rainbow trout in the period of active demonstration of clinical signs of disease (12th day after experimental infection) (P≤0.05–0.001; M±m,n=10)

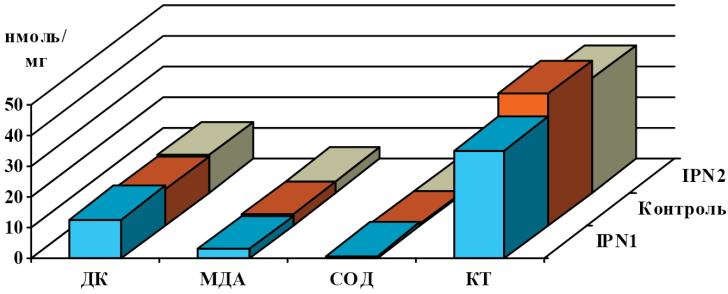

Рис. 3 Содержание продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в печени радужной форели на заключительном этапе инфекционного процесса (22 день, после инфицирования) (P≤0,05–0,001; M±m,n=10)

Figure 3. The content of lipid peroxygenation products and antioxidant enzymes activity in liver of rainbow trout in the final stage of infectious process (22nd day after experimental infection) (P≤0.05–0.001; M±m,n=10)

Поскольку одним из самых активных антиоксидантных ферментов, участвующих в регуляции интенсивности процессов свободнорадикального окисления, является супероксиддисмутаза (СОД), в следующей серии исследований мы изучали активность данного фермента в печени радужной форели, пораженной вирусом IPN. Результаты проведенных исследований представлены на рис. 1–3, согласно которым, происходит снижение супероксиддисмутазной активности в гепатоцитах форели. Так, в начальный период инфекционного периода рыб активность фермента составляла 66 и 94% соответственно от значения контроля. В середине и на конечной стадии инфекционного процесса наблюдается дальнейшее снижение супероксиддисмутазной активности практически в 2 раза и составило для IPN1-55% и IPN2-56% относительно контрольных данных.

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 (H_2O_2), а ее активность указывает на существенный вклад этого соединения в развитие перекисных процессов в печени рыб. Полученные результаты по исследованию активности каталазы в печени форели показали, что влияние вируса IPN приводит к значительным изменениям активности фермента (рис. 1–3). Так, установлено уменьшение ферментативной активности каталазы в гепатоцитах форели на протяжении всех периодов ее изучения. В начальный период для IPN1 на 17%, для IPN2 на 19% относительно контрольных значений. В середине инфицированного периода для IPN1 на 11%, для IPN2 на 10%, а в конце активность фермента была ниже контроля на 5% (IPN1) и на 7% (IPN2), соответственно, по сравнению с контрольными значениями.

Установленное нами понижение активности каталазы, по сравнению с контрольными данными, приводит к накоплению H_2O_2. Пероксид водорода, вследствие своей незаряженной ковалентной структуры, воспринимается клеткой как молекула воды. Благодаря этому H_2O_2 может легко проникать в клетки и ткани и при достаточно высоком уровне вызывает цитотоксическое действие, приводя к гибели не только фибробластов, но и других типов клеток, включая гепатоциты и эндотелиальные клетки (Halliwell, 1994).

Обсуждение результатов

Печень как центральный орган метаболизма рыб характеризуется высокой интенсивностью процессов обмена, в том числе липидного. Для печени характерно повышенное содержание общих липидов, нуклеиновых кислот, гликогена, белка, а также структурных и резервных липидов всех классов. При этом максимальный уровень липидов сопряжен с состоянием нереста у рыб (Shulman и Lova, 1999). Наряду с активными реакциями биосинтеза и катаболизма,

необходимо также отметить и постоянно протекающие в печени активные процессы обезвреживания и биоаккумуляции широкого ряда ксенобиотиков (Livingstone, 2001), а также регенерации поврежденных гепатоцитов, что связано с активацией свободно-радикальных реакций в лизосомах (Morre M.N.,1992). Для печени характерен высокий уровень эндогенной НАДФН-зависимой продукции ряда активных форм кислорода (Livingstone, 2001). Все указанные особенности химического состава и функций печени, очевидно, способствуют более активному протеканию процессов ПОЛ в гепатоцитах, чем в клетках других органов рыб.

Регуляция свободнорадикального окисления обеспечивается в клетке системой антиоксидантной защиты, которая включает несколько элементов, ингибирующих процессы образования свободных радикалов или инактивирующих продукты перекисного окисления. Прежде всего, этот фермент супероксиддисмутаза (СОД), которая катализирует реакцию диспропорционирования свободных радикалов кислорода по схеме:

$$O_2^{\bullet} + O_2^{\bullet} + 2H+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Накапливающаяся при этом перекись водорода, как продукт, токсичный для клетки, обезвреживается с помощью каталазы.

Согласно современным представлениям регуляция активности СОД происходит при участии всей многокомпонентной редокс-системы клетки. Активность фермента тесно связана с интенсивностью процессов ПОЛ и зависит от содержания в клетках продуктов ПОЛ. Избыточное накопление токсичных интермедиаторов вызывает торможение активности СОД и других ферментов антиоксидантной системы (Барабой, 2006). Литературные данные об участии активных форм кислорода в окислительной деструкции белков позволяют предположить, что снижение ферментативной активности СОД может быть следствием окислительной модификации молекулы фермента. Процесс инактивации СОД подробно исследован на всех уровнях организации белковой молекулы. Повреждающие белок активные кислородные метаболиты формируются непосредственно в активном центре фермента, что объясняет высокоселективную модификацию остатка гистидина-118 до 2-оксо-гистидина (Арчаков А.И. и др.,1998). Непосредственным инактивирующим фермент-агентом выступает гидроксильный радикал OH^{-}, образующейся в реакциях Фентона и Хабер Вайса из перекиси водорода при избытке супероксида (Зенков и др.,1993). Так, в экспериментах Salo D.C. показано, что инкубация супероксиддисмутазы в среде, содержащей, радикалы приводит к расщеплению молекулы фермента и сопровождается появлением дополнительных белковых фракций при электрофоретическом разделении, что объясняется авторами работы окислительной деградацией супероксиддисмутазы (Salo и др. 1988).

Полученные результаты указывают, что при действии вируса инфекционного панкреатического некроза IPN наблюдаются нарушения в функционировании фермента супероксиддисмутазы – важного звена антиоксидантной защиты

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. В норме функция каталазы заключается в предупреждении накопления пероксида водорода, который образуется в случае дисмутации супероксидного аниона и аэробного окисления восстановленных флавопротеинов. Этот фермент длительное время сохраняет повышенную активность, но в случае высоких концентраций пероксида водорода и в условиях стресса увеличение H_2O_2 происходит за счет неферментативной пероксидазной реакции. Во- вторых, снижение активности каталазы происходит за счет пероксида водорода, который образуется при действии СОД. Итак, проявление клеточно-специфического ответа может быть вызвано, прежде всего, активацией фермента, коррелирующего с уменьшением сродства к мембранным структурам и переходом в растворимое состояние под действием избыточных количеств субстрата, а в более отдаленные сроки – синтезом активных изоформ.

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 (Halliwell, 1994). В то же время известно, что супероксидный радикал является сильным ингибитором каталазы (Fridovich, 1995; Escobar и др., 1996). Во-вторых, снижение уровня каталазы может быть связано также мутацией и окислительной деструкцией ДНК при окислительном стрессе. В частности, в настоящее время идентифицировано 47 точечных мутаций гена СОД1 (Fridovich, 1997; Wallace, 1997). 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 (Левадная и др., 1998).

Таким образом, совокупность результатов, полученных 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.

Суммируя вышеизложенное можно сделать вывод, что действие вируса инфекционного панкреатического некроза 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.

Литература

Escobar J.A, Rubio M.A, Lissi E.A. (1996). SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxyl radicals. Free Radical Biol. Med., 20 (3): 285–290.

Fridovich I. (1997). Superoxide dismutase anion radical, superoxide dismutases, and related matters. J. Biol. Chem., 272: 18515–18517.

Fridovich I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutase. Annu Rev Biochem., 64: 97–112.

Golovina N.A., Bauer O.N. (2007). Ichthyopathology. Moscow: Mir.P pp. 448.

Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence. Lancet; 344: 721–724.

Livingstone D.R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. Pollut. Bull., 42, 8: 656–666.

Mahy B.W.J., Kangro H.O. (1996). Virology Methods Manual. London: Academic Press, pp. 493–497.

Morre M.N (1992). Molecular and cellular pathology: summary. Mar. Ecol. Prog. Ser., pp. 117–119.

OIE (2003). Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. Fourth Edition, Paris, World Organization for Animal Heatch (Chapter 2.1.8.).

Salo D.C., Lin S.W., Pacifici R.E., Davies K.J.A. (1988). Superoxide dismutase is preferentially degraded by a proteolytic system from red blood cells following oxidative modification by hydrogen peroxide. Free Rad. Biol. Med., 5, 5–6: 335–339.

Shulman G.E., Love R.M. (1999). The Biochemical Ecology of Marine Fishes. Advances in Marine Biology. San Diego, Acad. Press, pp. 36–351.

Wallace S.S. (1997). Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. In: Scandalios JG (ed.). CSHL Press, pp. 49–90.

Winston G.W. (1991). Oxidants and antioxidants in aquatic animals. Comp. Biochem. Physiol., 100, 1–2: 173–176.

Арчаков А.И., Згода В.Г., Карузина И.И. (1998). Окислительная модификация цитохрома Р-450 и других макромолекул в процессе их обновления. Вопр. мед. химии, 44, 1: с. 20–27.

Барабой В.А. (2006). Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы. Киев, 424 с.

Владимиров Ю.А. (1987). Свободнорадикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран. Биофизика., 32, Вып. 5: 830–841.

Дубинина Е.Е., Сальникова Л.Ф. (1983). Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов. Лабораторное дело, 10: 30–33.

Зенков Н.К., Менщикова Е.Б (1993). Активированные кислородные метаболиты в биологических системах. Успехи соврем. биологии, 113, 3: 286–296.

Корабейникова С.Н. (1989). Модификация выделения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с ТБК. Лабораторное дело, 7: 8–9.

Королюк М.А., Майорова И.Г., Токарев В.Е. (1988). Метод определения активности каталазы Лаборное. дело, 1: 16–18.

Левадная О.В., Донченко Г.В., Валуцина В.М., Корж Е.В., Хиль Ю.Н. (1998). Соотношение между величинами активности ферментов антиоксидантной системы в различных тканях интактных крыс . Укр. биохим. журн, 70, 6: 53–58.

Мейхи Б. (1988). Вирусология. Методы. Москва.: Мир, с. 182–184.

Стальная И.Д.(1977). Метод определения диеновой коньюгации ненасыщенных высших жирных кислот. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, с. 63.

Zatwierdzono do druku: 19 XII 2014

NATALIA MATVIENKO, LYUDMILA DRAGAN, YELENA FRISHTAK

Lipid peroxidation dynamics in liver of young-of-the-year rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) experimentally infected with pancreatic necrosis virus

SUMMARY

The paper contains results of studies on biochemical changes in rainbow trout organism under the influence of viral infection. Oxidative degradation, which occurs due to accumulation of oxidation product surpluses and can cause a large number of pathological states, is a result of general non-specific reaction of cells and organism to external factors, one of which is infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). To identify possibility of oxidative stress development, we studied lipid peroxidation dynamics in liver homogenates of clinically healthy young-of-the-year rainbow trout and their analogues experimentally infected with pancreatic necrosis virus.

The results obtained show that IPNV action disturbs balance in peroxidative-antioxidative system of rainbow trout hepatocytes and manifests as intensification of lipid peroxidation processes and reduction of antioxidative protection power, which allows considering the results as one of the components of the disease pathogenesis.

Key words: rainbow trout, infectious pancreatic necrosis virus, antioxidative protection system, lipids