

## **ВПЛИВ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ НА ОКСИДАТИВНУ– АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМУ РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ**

*Л. П. Драган*

Інститут рибного господарства НААН

*Вірусні інфекції гідробіонтів, які виникають у процесі інтенсивного розвитку аквакультури, наносять великих збитків у цій галузі. Найбільшого збитку виробництву риби наносить вірус панкреатичного некрозу. Вірус викликає некротичні ураження підшлункової залози, а також провокує оксидативний стрес, посилюючи тим самим процеси пероксидного окиснення ліпідів. Стан пероксидного окиснення ліпідів і антиоксидантної системи оцінювали за концентрацією дієнових кон'югатів, малонового діальдегіду, супероксиддисмутази і каталази, оскільки їх наявність буде свідчити про накопичення в тканині організму перекисів, гідроперекисів, сполук, які надають шкідливу дію на клітину. У результаті проведених досліджень встановлено, що дія вірусу інфекційного панкреатичного некрозу порушує рівновагу в прооксидантно-антиоксидантній системі в сироватці крові райдужної форелі, і проявляється інтенсифікацією процесів пероксидного окиснення ліпідів, зниженням потужності антиоксидантного захисту, що дозволяє розглядати отримані результати, як суттєву ланку в патогенезі інфекційного захворювання.*

Значною загрозою на шляху успішного розвитку аквакультури в умовах штучного відтворення є захворювання об'єктів культивування, при цьому найбільшої шкоди завдають вірусні інфекції риб. Інфекційний панкреатичний некроз (IPN) належить до одного з найпоширеніших захворювань, яке завдає великого збитку рибництву. Збудник цього захворювання — вірус інфекційного панкреатичного некрозу, який належить до роду *Aquabirnavirus* родини *Birnaviridae* [1, 2]. Природним господарем вірусу IPN є лососеві риби. Вірус поширений по всьому світу, він може викликати епізоотії, результатом яких є величезні витрати в інкубаторах мальків лососевих риб. IPN викликає некротичні ураження підшлункової залози, а також провокує оксидативний стрес, посилюючи тим самим процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ).

Відомо, що баланс утворення і витрати перекисів та інших продуктів окиснення може порушуватись при розвитку патологічного процесу, а метаболіти перекисів накопичуються в тканинах і біологічних рідинах. Це призводить до серйозних змін, в першу чергу, в біологічних мембранах. Наслідком активізації пероксидного окиснення може бути зміна фізико-хімічних властивостей мембранних білків і ліпідів, зміна активності мембранно-пов'язаних ферментів, порушення проникності мембран, зменшення електричної стабільності ліпідного шару.

У зв'язку з важливою роллю пероксидного окиснення в патогенезі різних захворювань, одним із яких є вірусна інфекція, визначення продуктів цього процесу (головним чином, кон'югованих дієнів, малонового діальдегіду) має більш зростаюче діагностичне та прогностичне значення [3]. Стійкість мембран до вільнорадикального окиснення залежить від стану антиоксидантної системи. Дані наукової літератури щодо стану антиоксидантної системи та інтенсивності ПОЛ в організмі лососевих риб при вірусних інфекціях практично відсутні, окремі праці не дають повного уявлення про вплив вірусу інфекційного некрозу підшлункової залози на особливості ПОЛ та активність антирадикального захисту в органах і тканинах риб. Оскільки питання про особливості процесів ПОЛ у сироватці крові цьоголіток райдужної форелі, уражених IPN залишається

відкритим, метою даної роботи було дослідження біохімічних змін в організмі цьоголітки райдужної форелі в динаміці розвитку IPN. Така інформація актуальна і необхідна для оцінки стану здоров'я риб.

**Матеріали і методи.** Для досліджень використовували цьоголіток райдужної форелі. Досліди із штучного інфікування риб проводили в лабораторних умовах у ємностях, об'ємом 40 дм<sup>3</sup> 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 15 г. Зараження вірусом IPN проводили методом внутрішньочеревної ін'єкції. Для біохімічних аналізів використовували сироватку крові риб. Відбір крові проводили з хвостової вени риби на 5-ий, 12-ий і 20 день після інфікування вірусом. У сироватці крові визначали стан ПОЛ за рівнем дієнових кон'югатів (ДК) [4] і малонового діальдегіду (МДА) [5]. Стан антиоксидантного захисту (АО) визначали за активністю АО ферментів — супероксиддисмутази (СОД) [6] і каталази [7]. Отримані результати статистично обробляли за допомогою комп'ютерних програм «Statistica» для Windows.

**Результати й обговорення.** Стан ПОЛ і антиоксидантної системи (АОС) в сироватці крові риб оцінювали за концентрацією ДК і МДА. Оскільки ДК (як проміжні продукти ПОЛ) і МДА (як один з кінцевих продуктів ПОЛ) з'являються на стадії утворення вільних радикалів, то їх наявність в надмірній кількості свідчатиме про накопичення в тканинах організму перекисів, гідроперекисів, з'єднань, які шкідливо впливають на клітину [3].

Проведені експериментальні дослідження показали, що за вмістом ДК в сироватці крові досліджуваного виду риб виявлені неоднозначні зміни (табл.).

Таблиця

**Основні біохімічні показники ПОЛ сироватки крові цьоголіток райдужної форелі, інфікованих вірусом IPN**

Показники	Контроль	Розвиток інфекційного процесу		
		5-й день (початок)	12-й день (середина)	20-й день (кінець)
ДК, нмоль/мг білка	0,57±0,005	0,76±0,189	0,50±0,136	0,85±0,116*
МДА, нмоль/мг білка	1,01±0,668	0,29±0,112	10,12±5,729	2,46±1,240
СОД, ум. од./мг білка за хв.	5,40±0,071	5,73±0,085*	4,83±0,111**	4,53±0,118***
Каталаза, ммоль/мг білка за хв.	20,51±7,644	30,98±1,440	25,60±9,510	29,09±8,335

Примітка: \* - p<0,05; \*\* - p<0,01; \*\*\* - p<0,001

Так, в початковий період захворювання встановлено збільшення ДК на 28% відносно контролю. У середині інфекційного періоду виявлено зниження ДК на 14%, а в кінці — підвищення на 46% відносно контрольних значень. Про те, слід відзначити, що на початковому періоді вірусного ураження в сироватці крові риб встановлено зниження МДА на 31% відносно контрольного показника, і на відміну від показників дієнових кон'югатів, в подальшому підвищення вмісту малонового діальдегіду відбувається більш інтенсивніше, зокрема, в середині інфекційного періоду майже в 4 рази, а в кінці на 2,4 рази відповідно відносно контрольних показників. Наші результати узгоджуються з даними інших дослідників, що показали зміну (підвищення і зниження) окремих ферментів у риб, що мешкають в умовах антропогенного навантаження і в дослідях [8]. Накопичення надлишку одного з кінцевих молекулярних продуктів пероксидного утворення — МДА показує, що тривалий вплив вірусу IPN призводить до зрушення окислювально-відновного балансу, порушення регуляції процесів пероксидного окиснення ліпідів і окислювальному стресі, засвідчивши про відповідну захисну реакцію організму на фізіолого-біохімічному рівні на дію стрессорного неспецифічного для організму фактора. Причинами посилення ПОЛ в досліді можуть бути різні форми активних метаболітів кисню (АМО), зниження

активності антиоксидантних ферментів, що руйнують перекиси або попереджають їх утворення [9].

До антиоксидантної системи захисту, яка контролює і блокує всі етапи вільнорадикальних реакцій, починаючи від їх ініціації і закінчуючи утворенням гідропероксидів та МДА, також відносять захисні ферменти: СОД, каталазу, глутатіонредуктазу, глутатіонпероксидазу і глутатіонтрансферазу, а також низько- та високомолекулярні сполуки, що містять тіольні- та селеногрупи, зокрема цистеїн, цистин, глутатіон, вітаміни Е, С та інші [10, 11].

СОД є важливим регулятором окиснювального гомеостазу клітини, одним з компонентів фізіологічної антиоксидантної системи захисту організму, роль якої стає значущою при різних вільнорадикальних патологічних станах [12, 13]. Фермент каталізує реакцію знешкодження супероксидних радикалів ( $O_2^{\bullet}$ ) шляхом їх дисмутації з утворенням менш реакційно здатних молекул пероксиду водню і синглетного кисню [12, 14]. СОД єдина серед найактивніших антиоксидантних ферментів безпосередньо забезпечує блокування ланцюгів кисень-залежних вільнорадикальних реакцій у клітинах.

Враховуючи сучасні уявлення щодо провідної ролі СОД у метаболізмі активних форм кисню та суттєвий внесок супероксидних радикалів в індукцію і розвиток оксидативного стресу, нами проводились дослідження активності цитоплазматичної  $Cu^{2+}$ - $Zn^{2+}$ -вмісної СОД у сироватці крові інфікованої вірусом IPN цьоголіток райдужної форелі.

В умовах нашого експерименту в сироватці крові досліджуваного виду риб, інфікованих вірусом IPN, було встановлено зростання супероксиддисмутаційної активності на початку вірусного ураження риб на 5,4 %, порівняно з контрольним показником, що свідчить про залучення ензиматичної системи захисту для підтримання окисно-антиоксидантного гомеостазу у відповідь на посилену генерацію активних метаболітів кисню. Отримані дані корелюють із результатами відповідних дослідників, які встановили закономірності змін в активності даного ферменту в крові клінічно здорових дворічок коропа та їх аналогів, уражених асоційованою формою краснухи [13, 15, 16]. Встановлена резистентність молекул СОД до дії факторів зовнішнього середовища, в тому числі і до вірусу IPN, дозволяє припустити, що зрушення активності ферменту не пов'язано з деструктивними змінами у структурі молекули СОД внаслідок прямої дії вірусу IPN [14]. Можливо підвищення активності останньої є наслідком збільшення у клітинах концентрації супероксидного аніон-радикалу, оскільки відомо, що зміна активності СОД тісно пов'язана з вмістом  $O_2^{\bullet}$ .

Водночас підвищення ферментативної активності СОД може бути результатом індуктивного синтезу нових молекул ферменту у відповідь на надлишок у клітинах  $O_2^{\bullet}$ . Адже відомо, що біосинтез внутрішньоклітинних ферментативних антиоксидантів є генетично детермінованим, а зумовлене дією стресового фактору зростання концентрації активних метаболітів кисню призводить до прямого порушення структурної організації молекули ДНК і, як наслідок, до активації транскрипції ряду генів, серед яких і гени окремих компонентів антиоксидантної системи. Подібний принцип регуляції найбільш детально досліджено на бактеріальних клітинах [14].

Визначення активності СОД в сироватці крові форелі в середньому і кінцевому інфекційному періодах показало зниження активності СОД на 11 та 16 %, відповідно, відносно контрольних значень (табл.).

Подібна динаміка активності СОД в умовах нашого експерименту може бути пояснена регуляторними ефекторами проявлення активності цього ферменту. Регуляція активності СОД здійснюється всією багатоконпонентною редокс-системою клітини. Інтермедіати окисно-відновного метаболізму ( $NADPH$ -залежні редокс-ланцюги мітохондрій, ендоплазматичного ретикулуму), які є генераторами  $O_2^{\bullet}$ , можуть виконувати подвійну роль:

активувати синтез ензиму в умовах зростання концентрації донорів електронів або пригнічувати його активність у разі накопичення акцепторів.

Таким чином, отримані результати вказують, що за дії вірусу IPN цьоголіток райдужної форелі відбувається порушення у функціонуванні ферменту СОД — важливої ланки антиоксидантного захисту організму, який забезпечує регуляцію вільнорадикальних процесів клітинного метаболізму. Зниження активності СОД у сироватці крові досліджуваного виду риб можна розглядати як прояв певного виснаження антиоксидантної системи захисту організму внаслідок поступового пошкодження її компонентів вільними радикалами і продуктами ПОЛ [12].

Провідна роль у захисті клітин від окисного навантаження належить каталазі, яка утилізує пероксид водню ( $H_2O_2$ ), а її активність вказує на істотний внесок у розвиток пероксидних процесів в організмі. Дослідження активності каталази в сироватці крові цьоголіток райдужної форелі в умовах інфікування вірусом IPN показали деякі зміни ферменту (таблиця). Так, встановлено підвищення ферментативної активності каталази в сироватці крові форелі протягом всього періоду її дослідження — в початковий період на 4 % щодо контрольних значень, у середині інфікованого періоду — на 5 %, а наприкінці активність ферменту була вищою від контрольного показника на 24 %, що свідчить про інтенсифікацію процесу утворення в сироватці крові пероксиду водню, надмірну активацію вільнорадикальних реакцій, пов'язану з нагромадженням ліпопероксидних продуктів.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що при розвитку вірусної інфекції відбувається накопичення продуктів пероксидації в сироватці крові райдужної форелі і, як наслідок, високий вміст вільнорадикальних сполук, що, в свою чергу, сприяють розвитку патологічного процесу.

## ВИСНОВКИ

1. Дослідження в сироватці крові райдужної форелі експериментально інфікованої вірусом IPN, показали накопичення вмісту молекулярних продуктів ПОЛ — дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду.

2. Активність СОД в сироватці крові форелі в середньому і кінцевому періодах інфекційного процесу має тенденцію до зниження.

3. Встановлено статистично достовірне підвищення активності каталази в сироватці крові форелі протягом всього періоду розвитку інфекційного процесу.

4. В результаті проведених досліджень встановлено, що вірус IPN сприяє порушенню рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи в сироватці крові райдужної форелі, і проявляється інтенсифікацією процесів ПОЛ, зниженням потужності антиоксидантного захисту, що дозволяє розглядати отримані результати, як суттєву ланку в патогенезі інфекційного захворювання.

**Перспективи подальших досліджень.** Детальний аналіз захисних ферментів як складової частини системи антиоксидантного захисту організму риб, що запобігають надлишковому утворенню активних форм кисню та беруть участь у нерадикальному розкладі пероксидів ліпідів.

## INFLUENCE OF VIRUS INFECTION ON OXIDATIVE–ANTIOXIDANT SYSTEM OF RAINBOW TROUT

*L. P. Dragan*

Institute of Fisheries of NAAS

## S U M M A R Y

Viral infections of aquatic organisms that occur in the course of the intensive development of aquaculture, causing major damage in this area. Done biggest production of fish viruses cause pancreatic necrosis. The virus causes necrotic lesions of the pancreas, and provokes oxidative stress, thereby increasing the processes of lipid peroxidation. Status of lipid peroxidation and antioxidant system was evaluated by the concentration of diene conjugates, malone dialdehyde, superoxide dismutase and catalase, as their presence is indicative of accumulation in tissues of peroxides, hydro-peroxides, compounds that have harmful effects on the cell. As a result of studies found that the effect of the virus infectious pancreatic necrosis disturbs the equilibrium in the pro-oxidant-antioxidant system in the blood serum of rainbow trout, and is manifested by intensification of processes of lipid peroxidation, reduced antioxidant capacity, which allows us to consider the results as an important link in the pathogenesis of infectious disease.

### **ВЛИЯНИЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ОКСИДАТИВНО–АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ**

*Л. П. Драган*

Институт рыбного хозяйства НААН

### **А Н Н О Т А Ц И Я**

Вирусные инфекции гидробионтов, возникающие в процессе интенсивного развития аквакультуры, наносят большой ущерб в этой области. Наибольший урон производства рыбы наносят вирусы панкреатического некроза. Вирус вызывает некротические поражения поджелудочной железы, а также провоцирует оксидативный стресс, усиливая тем самым процессы перекисного окисления липидов. Состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы оценивали по концентрации диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, супероксиддисмутазы и каталазы, поскольку их наличие будет свидетельствовать о накоплении в ткани организма перекисей, гидроперекисей, соединений, оказывающих вредное воздействие на клетку. В результате проведенных исследований установлено, что действие вируса инфекционного панкреатического некроза нарушает равновесие в прооксидантно-антиоксидантной системе в сыворотке крови радужной форели, и проявляется интенсификацией процессов перекисного окисления липидов, снижением мощности антиоксидантной защиты, что позволяет рассматривать полученные результаты, как существенное звено в патогенезе инфекционного заболевания.

### **Л И 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. *Владимиров Ю. А.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. — М.: Наука, 1972. — 252 с.
4. *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.

5. *Корабейникова С. Н.* Модификация выделения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с ТБК/ С. Н. Корабейникова // Лабораторное дело. — 1989. — № 7. — С. 8–9.
6. *Дубинина Е. Е.* Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов / Е. Е. Дубинина, Л. Ф. Сальникова // Лабораторное дело. — 1983. — № 10 — С. 30–33.
7. *Королюк М. А.* Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаборное. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–18.
8. *Sole M., Porte C., Abaiges F.* // Sci. Total Envir., — 1995. — Vol. 159. — P. 147–153.
9. *Winston G. W.* // Compar. biochem. and Physiol. — 1991. — Vol. 100. — № 1–2, — P. 173–176.
10. *Беленічев І. Ф.* Антиоксидантна система захисту організму / І. Ф. Беленічев, Е. Л. Левицький, Ю. Л. Губський, С. І. Коваленко, О. М. Марченко // Сучасні проблеми токсикології — 2002. — № 3. — С. 25–30.
11. *Петрова Г. В.* Витамин Е и апоптоз / Г. В. Петрова, А. А. Капралов, Г. В. Донченко // Укр. біохім. журн. — 2003. — Т. 75, № 6. — С. 25–34.
12. *Барабой В. А.* Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы / Барабой В.А. — К: Фитоцентр, — 2006. — 424 с.
13. *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.
14. *Зенков Н. К.* Окислительный стресс. Биохимический и патологический аспекты / Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б Меньшикова. — М.: МАИК, 2001. — 343 с.
15. *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.
16. *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.