

АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНОВОЇ СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В ТКАНИНАХ КОРОПА ЗА УМОВ БРАНХІОНЕКРОЗУ

С. Г. Андрісчко, О. І. Віщул

Інститут біології тварин НААН

У статті представлені результати досліджень глутатіонової системи антиоксидантного захисту у тканинах клінічно здорового і хворого на бранхіонекроз коропа. Показано, що захворювання риби на бранхіонекроз спричиняє зниження ферментативної активності глутатіонпероксидази та зменшення вмісту відновленого глутатіону у зябрах, печінці, селезінці та нирках лускатого коропа. Ці зміни у досліджуваних тканинах були виражені більшою мірою з п'ятого по дев'ятий день після експериментального зараження риби, де різниці порівняно до контролю були вірогідні.

Ключові слова: КОРОП, БРАНХІОНЕКРОЗ, ЗЯБРА, ПЕЧІНКА, СЕЛЕЗІНКА, НИРКА, ТКАНИНИ, АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА, ГЛУТАТІОНПЕРОКСИДАЗА, ВІДНОВЛЕНИЙ ГЛУТАТІОН

Бранхіонекроз (некроз зябер) — це небезпечне, поширене у різних країнах захворювання коропових риб, яке уражає зябра та внутрішні органи, викликає масову загибель риби. Етіологія цього захворювання остаточно не з'ясована [1, 2]. Некроз зябер незаразної природи виникає за дії факторів екзогенного та ендогенного походження, порушення гідрохімічного режиму у ставах, недостатньої і неповноцінної годівлі; ускладнення сапролегніозом, умовно патогенною мікрофлорою [3, 4]. Наявні в літературі дані свідчать, що у риб, як і в теплокровних тварин, розвиток багатьох захворювань супроводжується посиленням пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), порушенням функціональної активності системи антиоксидантного захисту організму [5], зміни обміну білків і ліпідів [6, 7].

Антиоксидантна система забезпечує адаптаційну стійкість організму в цілому та регулює реакції ПОЛ завдяки функціонуванню системи ферментативних і неферментативних механізмів контролю за вмістом активних форм кисню, вільних радикалів та продуктів пероксидації ліпідів. Її порушення призводить до розвитку в риб різноманітних патологій, обумовлених окисненням у ліпідах клітин поліненасичених жирних кислот активними формами кисню [4, 5]. Глутатіонпероксидаза один із найважливіших ферментів антиоксидантної системи організму, який в клітинах знаходиться в цитозолі та мітохондріях, каталізує розщеплення H_2O_2 і гідроперексидів жирних кислот [6]. У цьому процесі приймає участь відновлений глутатіон, до якого фермент проявляє високу спорідненість. Він відновлює за допомогою глутатіону один з продуктів ПОЛ — гідроперекиси ліпідів, що в свою чергу призводить до зниження їх деструктивного впливу на біополімери та клітинні мембрани організму та попереджує ініціацію вторинних реакцій окиснення ліпідів активними формами кисню [7]. У зв'язку з наведеними даними, дослідження глутатіонової системи антиоксидантного захисту в організмі коропа за умов бранхіонекрозу є актуальним для з'ясування біохімічних механізмів патогенезу цього захворювання. Тому, метою нашої роботи було дослідження глутатіонпероксидазної активності та вмісту відновленого глутатіону у тканинах коропа, хворого на бранхіонекроз.

Матеріали і методи

Дослідження провели на двохрічках коропа лускатого (*Squalius laietanus*), вирощеного в Любінському господарстві до маси 400–500 г. Посадка риби проводилася з розрахунку одна особина на 40 л води з підтримкою постійного гідрохімічного режиму (величина рН складала 7,8, вміст кисню — 5,6 мл/л, температура води +10–+16 °С). Дослід ґрунтувався на відтворенні бактеріальної форми бранхіонекрозу коропа в експериментальних умовах в акваріумах об'ємом 200 л. Зараження коропа дослідної групи проводили штамом бактерій, виділених з хворої на бранхіонекроз риби (штам був люб'язно наданий нам Інститутом рибного господарства НААН). Контролем слугувала клінічно здорова риба.

У дослідженнях використовували зразки тканин паренхіматозних органів та зябер, одержані від клінічно здорової, і хворої на бранхіонекроз риби. Досліджувані тканини (зябра, печінка, селезінка, нирки) у риб брали на 3, 5, 7 та 9-ту добу після зараження.

У досліджуваних зразках тканин визначали активність глутатіонпероксидази за швидкістю окиснення відновленого глутатіону в присутності гідроперексиду третинного бутилу (В. М. Моин,

1986). Вміст відновленого глутатіону визначали за методом (Э. Батлер, О. Дюбон, Б. Келли 1963) за реакцією з реактивом Елмана.

Одержані цифрові дані опрацювали статистично з використанням програмного пакету Microsoft Excel для персональних комп'ютерів, за допомогою загальноприйнятих методів варіаційної статистики з оцінкою середньої (М) його похибки (m), вірогідність змін встановлювали за t-критерієм Стьюдента.

Результати й обговорення

З наведених у таблиці результатів досліджень видно, що захворювання коропа на бронхіонекроз спричиняє значний вплив на активність глутатіонової системи антиоксидантного захисту у досліджуваних тканинах риби. Зокрема, глутатіопероксидазна активність у зябрах, печінці, нирках і селезінці коропа на всіх стадіях після зараження була нижчою ($p < 0,05-0,001$), ніж у клінічно здорової риби. Причому вказані зміни в активності ключового ферменту системи антиоксидантного захисту у досліджуваних тканинах були виражені більшою мірою з п'ятого по дев'ятий день після зараження коропів дослідної групи, де різниці порівняно до клінічно здорової риби були вірогідні. Разом з тим слід зауважити, що у печінці, хворої на бронхіонекроз риби, вже на третю добу після зараження глутатіопероксидазна активність була вірогідно нижчою, ніж у контролі, що вказує на більший вплив чинників цього захворювання на печінку, порівняно з іншими досліджуваними органами.

Результати проведених досліджень показали, що глутатіопероксидазна активність у досліджуваних тканинах коропів дослідної групи у процесі розвитку цього захворювання поступово знижувалась. Зокрема, на 9-ту добу після зараження у зябрах, печінці, нирках і селезінці коропів дослідної групи активність цього ензиму була відповідно в 2, 1,7, 1,9, 2,2, рази нижчою ($p < 0,001$), ніж у контролі, що свідчить про інгібуючий вплив чинників цього захворювання на глутатіопероксидазну активність у досліджуваних органах і тканинах. Ці дані вказують на зниження в організмі глутатіонової ланки ферментної системи антиоксидантного захисту.

Подібну динаміку змін встановлено при дослідженні вмісту відновленого глутатіону у досліджуваних тканинах коропа. Зокрема, вміст ВГ у зябрах, печінці, нирках і селезінці коропів дослідної групи на всіх стадіях після зараження був менший, ніж у клінічно здорової риби. Проте різниці виявилися вірогідними лише у зябрах, печінці та нирках коропів на 7-му і 9-ту добу після зараження. При цьому, на 9-ту добу після зараження у зябрах, печінці, нирках і селезінці коропів дослідної групи вміст ВГ був відповідно в 4,2, 4, 2,7, 3,5 рази менший ($p < 0,01-0,001$), ніж у контролі.

Загалом отримані результати досліджень показали, що захворювання коропа на бронхіонекроз спричиняє інгібуючий вплив на активність глутатіонової системи антиоксидантного захисту. Вказані зміни призводять до зниження глутатіонпероксидазної активності і зменшує вміст відновленого глутатіону у досліджуваних тканинах, що свідчить про порушення антиоксидантної рівноваги в їхньому організмі не тільки на рівні тканин, але і клітин.

Таблиця

Динаміка активності антиоксидантних ферментів в паренхіматозних тканинах досліджуваних риб при захворюванні бронхіонекрозом ($M \pm m$; $n=3$)

Показники	Дні	Досліджувані тканини			
		Зябра	Селезінка	Нирки	Печінка
ГП, нМоль/мг	К	17,65±0,45	12,62±0,35	13,13±0,26	13,15±0,47
	3-й	16,57±0,87	11,41±0,79	11,41±0,70	11,46±0,38*
	5-й	13,89±0,44**	9,32±0,47**	9,85±0,38**	9,84±0,36*
	7-й	11,08±0,28***	8,67±0,55**	7,90±0,13***	8,23±0,35***
	9-й	8,70±0,24***	5,70±0,70***	6,57±0,52***	7,66±0,40***
ВГ, нМоль/мг	К	5,47±0,74	5,47±0,41	5,43±0,54	7,90±0,79
	3-й	4,90±0,55	5,29±6,78*	4,83±0,70	7,60±0,62
	5-й	4,10±0,72	3,30±0,42*	4,10±0,56	7,60±0,54
	7-й	2,67±0,32***	3,03±0,36*	3,13±0,52*	3,20±0,39**
	9-й	1,30±0,20***	1,55±0,33***	1,96±0,25**	1,93±0,35**

Примітка: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

Це можна пояснити тим, що на початковому етапі захворювання у зябрах утворюється набряк, пізніше часткові ураження у вигляді гіперплазії і гіпертрофії респіраторного епітелію, що призводить

до порушення киснево-транспортної функції, зростання інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів, тому кисень не поступає в належній кількості до тканин, що спричиняє виникнення гіпоксії, порушення процесів пероксидного окиснення ліпідів, інтоксикації та руйнування фосфоліпідів клітинних мембран.

Висновки

Констатовано, що експериментально викликаний бронхіонекроз у коропа спричиняє значний інгібуючий вплив на активність глутатіонової системи антиоксидантного захисту. Зокрема, встановлено значно нижчу глутатіонпероксидазну активність та менший вміст відновленого глутатіону у зябрах, печінці, нирках і селезінці лускатого коропа з п'ятого по дев'ятий день після експериментального зараження риби, де різниці порівняно до контролю були вірогідні.

Перспектива подальших досліджень. Подальші дослідження дозволять детальніше з'ясувати патогенез цього захворювання і розробити ефективні способи його профілактики.

S. G. Andriechko, O. I. Vishchur

GLUTATHIONE PEROXYDASE ACTIVITY AND RESTORATION OF GLUTATHIONE IN TISSUES OF THE CARP AT BRANHIONEKROZE

S u m m a r y

The experimentally cause branhioneckroze in the gills and the tissues of parenchymatous organs of fish compared with organs of clinically healthy fish found significant decrease in the activity of glutathione peroxidase and glutathione restoration that shows a significant decrease in antioxidant protection.

С. Г. Андриченко, О. И. Вищур

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА В ТКАНЯХ КАРПА ПРИ БРАНХИОНЕКРОЗЕ

А н н о т а ц и я

При експериментально вызванном бронхионекрозе в жабрах и тканях паренхиматозных органов рыб сравнительно с органами клинически здоровых рыб установлено достоверное снижение активности глутатионпероксидазы и содержания восстановленного глутатиона, что свидетельствует о значительном снижении защиты антиоксидантной системы.

1. *Давыдов О. Н.* Болезни пресноводных рыб / О. Н. Давыдов, Ю. Д. Темниханов. — К. : ТОВ «Ветинформ», 2004. — 542 с.
2. *Давыдов О. Н.* Ихтиопатологическая энциклопедия / О. Н. Давыдов, Н. М. Исаева, Л. Я. Куровская. — К. : НАН Украины, 2000. — 168 с.
3. *Гавринюк А. И.* Устойчивость к жаберной болезни карпов невыясненной этиологии различных видов прудовых рыб / А. И. Гавринюк. — К. : Урожай, 1976. — 80 с.
4. *Нейш Г.* Микозы рыб / Г. Нейш, Г. Хьюз. — Москва : Легкая и пищевая промышленность, 1984. — С. 13–45.
5. *Кожевников Ю. Н.* О перекисном окислении липидов в норме и патологии : обзор / Ю. Н. Кожевников // Вопросы медицинской химии. — 1985. — № 1. — С. 2–7.
6. *Зинчук В. В.* Роль кислородосвязывающих свойств крови в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма / В. В. Зинчук, М. В. Борисюк // Успехи физиологических наук. — 1999. — Т. 30, № 3. — С. 38–48.
7. *Тимочко М. Ф.* Вільнорадикальні реакції та їх метаболічна роль / Тимочко М. Ф., Кобилінська Л. І. // Медична хімія. — 1999. — Т. 1, № 1. — С. 19–25.
8. *Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник.* — Львів, 2004. — 399 с.
9. *Walster C.* Clinical observations of severe mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, with gill disease / C. Walster // Fish Veterinary Journal. — 1999. — V. 3. — P. 54–58.
10. *Way K.* Isolation of a herpesvirus during disease outbreaks in adult koi carp : Abstract EAAP conference Dublin, Sept 2001 / K. Way, R.-M. Le Deuff, L. Ecclestone et al. // *Cyprinus carpio*, in the UK, 2001.

Рецензент: завідувач сектору клінічної біохімії, кандидат ветеринарних наук Сімонов М. Р.