

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 597.554.3.577.17

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПОРТИРОВКИ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ТКАНЯХ И ОРГАНАХ СТЕРЛЯДИ *ACIPENSER RUTHENUS*

© 2009 г. Н.И. Силкина, Д.В. Микряков, В.Р. Микряков

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок 152742

Поступила в редакцию 20.06.2008 г.

Окончательный вариант получен 31.10.2008 г.

Обобщены результаты исследований влияния транспортировки на перекисное окисление липидов в сыворотке крови, печени, почках и селезенке стерляди *Acipenser ruthenus*. Рыбы на транспортный стресс реагировали активацией перекисного окисления липидов и снижением общей антиокислительной активности.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из причин, вызывающих снижение адаптивного потенциала, ослабление защитной функции иммунной системы от паразитов при воспроизводстве рыб в условиях domestikации, является транспортный стресс (Ляйман, 1963; Бауэр и др., 1983; Микряков и др., 2005, 2007, 2008; Schaperclaus, 1979). Транспортировка оказывает стрессирующее воздействие на рыб, вызывая повышение концентрации глюкокортикоидных гормонов (Barton et al., 1980), глюкозы (Wardle, 1972), приводя к сдвигу гематологических параметров (Fletcher, 1986), водно-солевому дисбалансу (Мартемьянов, 1983), снижению иммунитета к паразитам, вызывающим инфекционные и инвазионные болезни (Ведемейер и др., 1981; Бауэр и др., 1984; Pickering, 1993; Schaperclaus, 1979; Wendelaar Bonga, Sjoerd, 1997; Van Muiswinkel, Vervoom-Van Der Wal, 2006) и др. В ряде работ было показано негативное воздействие перевозки на физиолого-биохимическое состояние рыб, однако остается неясным вопрос об отдаленных последствиях перенесенного рыбой транспортного стресса, в частности, его влияния на особенности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и содержание структур антиоксидантной защиты. Известно, что ПОЛ зеркально отражает характер влияния неблагоприятных факторов на состояние здоровья и иммунный статус рыб (В. Микряков и др., 2001, 2006), является показателем нарушения баланса в системе «прооксидант-антиоксидант», снижения адаптивного потенциала и функций иммунитета рыб к паразитам. Кроме того, образующиеся при стрессе продукты ПОЛ – липоперекиси оказывают иммуотоксическое действие на иммунокомпетентные клетки, ткани и органы и являются причиной истощения лимфоидной ткани, приводящей к снижению функции иммунной системы, преждевременному старению и гибели рыб (Winston, 1991; Fiho, 1996).

Цель настоящей работы состояла в исследовании влияния транспортной нагрузки на показатели перекисного окисления липидов и антиокислительную активность (ОАА) в иммунокомпетентных тканях и органах стерляди *Acipenser ruthenus*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Влияние транспортировки изучали на 25 двухлетках стерляди *Acipenser ruthenus* в возрасте 2+ средней массой 250-300 г. Рыб перевозили в оцинкованных каннах в течение 7 ч. из тепловодного рыбоводного хозяйства ОАО РТФ «Диана» пос. Кадуй Вологодской области до аквариальной ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН. После транспортировки рыб содержали в принудительно аэрируемых бассейнах при температуре

воды 16-18 °С. Сбор материала проводили через 1, 3, 7, 14 и 21 сут. после транспортировки. Для анализа брали сыворотку крови, головную почку, печень и селезенку. Исследовали интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и общую (интегральную) антиокислительную активность (ОАА).

Процессы перекисного окисления липидов изучали в гомогенатах тканей печени, туловищных почек и селезенки. Липиды из тканей экстрагировали общепринятым методом по Фолчу (Folch et al., 1957). Об интенсивности ПОЛ в тканях судили по накоплению малонового диальдегида (МДА) – одного из конечных продуктов перекисного окисления. Концентрацию МДА определяли на основе учета количества продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой и дающих с ней окрашенный комплекс. Интенсивность окрашивания оценивали спектрофотометрически по изменению максимума поглощения при 532 нм (Андреева и др., 1988). Содержание МДА вычисляли с учетом коэффициента молярной экстинкции МДА ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и выражали в нмолях на 1 г ткани. Исходно в животных тканях содержание малонового диальдегида крайне незначительно, и 98% его образуется в процессе взаимодействия тиобарбитуровой кислоты при разрушении гидроперекисей липидов. Содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, вычисляли по формуле: $X = E \times 85,47$, где X – содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, выраженное в количестве малонового диальдегида (мкмоль/л); E – оптическая плотность при 535 нм.

Об общей (интегральной) антиокислительной активности судили по кинетике окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндифенола кислородом воздуха в присутствии тканевых экстрактов по общепринятой методике, описанной Семеновым и Ярошем (1985). Гомогенат получали путем растирания тканей иммунокомпетентных органов с физиологическим раствором в соотношении 1 : 1. Константу ингибирования окисления субстрата, являющуюся показателем антиокислительной активности органа, определяли относительно контроля по формуле: $K_i = K_{\text{кон}} - K_{\text{оп}}/C$, где: $K_{\text{кон}}$ и $K_{\text{оп}}$ – константы скоростей окисления субстрата соответственно в контроле и в опыте, C – концентрация биологического материала в кювете.

В качестве контроля использовали исследуемые показатели стерляди, полученные до начала транспортировки.

Результаты исследований подвергали статистической обработке при помощи стандартного пакета программ (Microsoft Office 98, приложение Statistica) с последующей оценкой различий с использованием t -теста, $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных результатов показал, что рыбы, подвергнутые транспортному воздействию, имели отклонения от контроля изученных показателей, зависящие от функциональных особенностей органа и времени, прошедшего после транспортировки (табл. 1, 2). У опытных рыб по сравнению с контрольными установлен достоверно высокий уровень содержания конечных продуктов перекисного окисления липидов во всех исследуемых тканях и органах в течение всего времени наблюдения, кроме 1 сут. в головной почке. Более высокие отклонения МДА от контроля были зафиксированы в сыворотке и печени по сравнению с другими тканями. Максимальные значения МДА у опытных рыб сравнению с контрольными были зафиксированы на 3 сут. в сыворотке крови (в 2,4 раза) и в

печени (в 2,8 раза), а головной почке (в 1,5 раза) и в селезенке (в 1,3 раза) – на 7 сут. До конца наблюдения содержание продуктов ПОЛ в исследуемых тканях и органах оставалось повышенным относительно показателей контрольных рыб.

Таблица 1. Содержание малонового диальдегида (МДА) в иммунокомпетентных тканях и органах стерляди после транспортировки, нмоль/г ткани.

Table 1. Concentrations of malonic dialdehyde (MDA) in sterlet immunocompetent tissue and organs after transportation, nm/g.

Дата отбора проб	Сыворотка крови	Головная почка	Печень	Селезенка
Контроль	5,93±0,05	5,52±0,09	3,13±0,12	6,43±0,18
Через 1 сут	7,91±0,18*	5,71±0,16	5,16±0,06*	6,90±0,05*
Через 3 сут	14,37±0,21*	8,15±0,17*	8,85±0,14*	8,23±0,11*
Через 7 сут	12,81±0,15*	8,59±0,17*	7,72±0,27*	8,76±0,12*
Через 14 сут	10,58±0,25*	8,32±0,14*	5,87±0,08*	8,56±0,15*
Через 21 сут	8,30±0,08*	8,04±0,04*	4,18±0,08*	8,71±0,16*

Примечание: здесь и в табл. 2 * – различия достоверны при $p \geq 0,05$.

Note: *difference is significant at $p \geq 0,05$.

Таблица 2. Показатели общей антиокислительной активности (ОАА) в иммунокомпетентных тканях и органах стерляди после транспортировки, л/мл×мин.

Table 2. Concentrations of total antioxidant activity (TOA) in sterlet immunocompetent tissue and organs after transportation, $l \times mol^{-1} \times min^{-1}$.

Дата отбора проб	Сыворотка крови	Головная почка	Печень	Селезенка
Контроль	9,05±0,11	5,80±0,16	3,99±0,08	8,26±0,08
Через 1 сут	9,01±0,05	5,25±0,10*	4,43±0,24	8,10±0,13
Через 3 сут	7,11±0,26*	2,99±0,21*	2,97±0,22*	6,52±0,27*
Через 7 сут	7,14±0,21*	2,54±0,14*	3,97±0,14	5,77±0,16*
Через 14 сут	7,16±1,23*	3,29±0,18*	4,27±0,21	5,84±0,07*
Через 21 сут	6,84±0,04*	4,89±0,11*	4,15±0,21	4,81±0,17*

Установленные закономерности накопления МДА в исследуемых органах и обнаруженные различия в содержании в них продуктов ПОЛ свидетельствуют о разном уровне содержания структур, индуцирующих свободнорадикальные процессы и ПОЛ. Известно, что одними из важных источников интенсификации развития процессов ПОЛ при воздействии стероидных гормонов при стрессе являются активированные кислородные метаболиты (АКМ: O_2^- , $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH , NO и др.), генерируемые нейтрофилами, миелобластами, промиелоцитами, моноцитами (Зенков и др., 1999). Гранулоциты, состоящие из нейтрофилов, миелобластов и других типов клеток миелопоэза, превосходят все другие типы лейкоцитов по способности нарабатывать АКМ, что делает их опасными не только для бактерий, но и для тканей собственного организма (Зенков и др., 1999). В физиологических условиях деструктивное действие АКМ, образующихся в гранулоцитах, сдерживается многоуровневой системой антиоксидантов. В случае недостатка антиоксидантов в организме, развивается окислительный стресс, сопровождающийся нарушением баланса в системе АКМ-антиоксиданты. Одной из основных причин активации окислительного стресса, вызывающего нарушение баланса в системе АКМ-антиоксиданты, является супрессия образования и снижения активности ферментативных антиоксидантов: глутатионпероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы (Зенков и др., 1999).

Такое усиление перекисеобразовательных процессов в иммунокомпетентных тканях опытных рыб, отражающее нарушение окислительно-восстановительного баланса, сопровождалось изменением интегрального показателя ОАА. В сыворотке

крови, печени и селезенке достоверное снижение ОАА отмечено начиная с 3 сут., а в головной почке – на следующие сутки после транспортировки. Наиболее сильное снижение уровня ОАА зафиксировано на 3 сут. в сыворотке крови (на 21,5%) и в печени (на 25,6%), а в головной почке и селезенке – на 7 сут. (на 56,3% и 30,2% соответственно). У опытных рыб в сыворотке крови, почке и селезенке интегральный показатель оставался пониженным до конца эксперимента, а в печени, начиная с 7 сут. повысился до контрольных значений.

Таким образом, из материалов исследований следует, что транспортный стресс вызывает активацию окислительных процессов, последствиями которых являются смещение равновесия в системе «прооксидант-антиоксиданты» в сторону пероксидации липидов и инактивация структур антиоксидантной защиты. Выявленные различия в характере и интенсивности накопления конечных продуктов ПОЛ и изменения ОАА в тканях и органах отражают зависимость происходящих процессов от особенностей их структурно-функциональной организации и уровня содержания структур, генерирующих токсические кислородные радикалы, вызывающие пероксидацию липидов и снижение содержания внутриклеточных ферментных антиоксидантов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева Л.И., Кожмякин Н.А., Кляшкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. Дело. 1988. №11. С. 41-43.
- Бауэр О.Н., Мусселиус В.С., Стрелков Ю.С. Болезни прудовых рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 319 с.
- Ведемейер Г.А., Мейер Ф.П., Смит Л. Стресс и болезни рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. 127 с.
- Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Вольский Н.Н., Козлов В.А. Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз // Успехи соврем. биол. 1999. Т. 119. №5. С. 440-450.
- Ляйман Э.М. Болезни рыб. М.: Сельхозиздат, 1963. 295 с.
- Мартемьянов В.И. Динамика содержания электролитов у пресноводных рыб при стрессе: Автореф. диссерт. на соиск. уч. степени кандидата биол. наук. 1983. 18 с.
- Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. и др. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление воды. М.: Наука, 2001. 126 с.
- Микряков В.Р., Силкина Н.И., Микряков Д.В. Влияние дексаметазон-фосфата на морфо-функциональное состояние иммунокомпетентных органов карпа *Cyprinus carpio* L. // Вестник Южного научного центра Российской академии наук. 2006. Т. 2. Вып. 1. С. 72-77.
- Микряков Д.В., Силкина Н.И., Микряков В.Р. Использование показателей липидного обмена при диагностике последствий транспортного стресса на рыб. Сб. Эпизоотологический мониторинг в аквакультуре: Состояние и перспективы. Расширенные материалы Всерос. научно-практич. конф.-семинара (13-14 сентября 2005 г. М.). М., 2005. С. 106-110.
- Микряков Д.В., Силкина Н.И., Микряков В.Р. Изменение показателей перекисного окисления липидов в иммунокомпетентных тканях и органах стерляди *Acipenser ruthenus* L. после транспортировки. Сб. Рациональное использование пресноводных экосистем – перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК». Мат. Междунар. научно-практ. конф. М.: Изд-во Россельхозакадемии, 2007. С. 421-424.
- Микряков Д.В., Микряков В.Р., Силкина Н.И. Изменение морфологических показателей иммунокомпетентных органов карпа *Cyprinus carpio* L. после транспортировки // Вопросы рыболовства. 2008. Т. 9. №1(33). С. 193-199.
- Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Укр. биохим. ж. 1985. Т. 57. №3. С. 50-52.

Barton B.A., Peter R.E., Paulencu Ch.R. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport and stocking // Can. J. Fish. and Aquat. Sci. 1980. V. 37. №5. Pp. 805-811.

Fiho W.D. Fish antioxidant defences – A comparative approach // Braz. J. Med. and Biol. Res. 1996. V.29. №12. Pp. 1735-1742.

Fletcher T.C. Modulation of nonspecific host defenses in fish // Vet. Immunol. Immunopathol. 1986. V. 12. Pp. 59-67.

Folch J., Lees M., Stanley G.N. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. №3. Pp. 497-509.

Pickering A.D. Endocrine-induced pathology in stressed salmonid fish // Fish. Res. 1993. V. 17. Pp. 35-40.

Schaperclaus W. Fisch-krankheiten. Berlin: Academic-Verlag, 1979. 317 p.

Van Muiswinkel W., Vervoorn-Van Der Wal B. The immune system of fish // Fish Diseases and Disorders. 2006. V. 1. Pp. 678-701.

Wardle C.S. The changes in blood glucose in *Fleuronectes platessa* following capture from the wild: a stress reaction. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 1972. V. 52. №3. Pp. 635-661.

Wendelaar Bonga, Sjoerd E. The stress response in fish // Physiol. Rev. 1997. V. 77. №3. Pp. 591-625.

Winston G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Compar. biochem. and Physiol. 1991. V. 100. №1-2. Pp. 173-176.

INFLUENCE OF TRANSPORTATION ON LIPID PEROXIDATION IN IMMUNOCOMPETENT TISSUES AND ORGANS OF STERLET *ACIPENSER RUTHENUS*

© 2009 y. N.I. Silkina, D.V. Mikrjakov, V.R. Mikrjakov

Papanin's Institute for biology of inland waters of the Russian Academy of Science, Borok

Results of researches of influence of transportation on lipid peroxidation in a blood serum, a liver, a kidneys and a spleen of sterlet *Acipenser ruthenus* L. are generalized. Fishes reacted to transport stress by activation lipid peroxidation and decrease in the general antioxidizing activity.