

УДК 639.09:615.2

Г.М. Ткаченко¹, Й. Грудневская²¹Институт биологии и охраны окружающей среды, Поморская Академия в Слупске, ул. Арцишевского 22b, 76-200, Слупск, Польша²Институт пресноводного рыбного хозяйства им. Станислава Саковича, Рутки, 83-330, Жуково, Польша**ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА В СЕРДЦЕ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*ONCORHYNCHUS MYKISS WALBAUM*) ПОСЛЕ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ МЕРОПРИЯТИЙ С ФОРМАЛИНОМ**

Цель работы заключалась в изучении активности антиоксидантной системы (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, общая антиоксидантная активность) в сердечной ткани радужной форели (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) после профилактических дезинфицирующих мероприятий с формалином (конечная концентрация 200 мл/м³ воды, по 20 мин аппликации трижды в течение 3 дней). Дезинфекция рыб в наших исследованиях вызвала увеличение активности каталазы и снижение активности супероксиддисмутазы. Корреляционный анализ подтвердил зависимость между активностью каталазы и высоким уровнем общей антиоксидантной активности в сердечной ткани радужной форели после профилактических дезинфицирующих мероприятий с формалином. Применение формалина как дезинфицирующего агента у радужной форели способствует сохранению функционального потенциала стресс-лимитирующей системы антиоксидантной защиты, что предотвратит накопление в организме токсических продуктов перекисного окисления липидов и окислительно модифицированных белков.

Ключевые слова: радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*), сердце, формалин, дезинфекция, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, общая антиоксидантная активность.

H.M. Tkachenko¹, J. Grudniewska²**ENZYMATIC ANTIOXIDANT DEFENSES IN THE HEART OF THE RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS WALBAUM*) AFTER PREVENTIVE DISINFECTING MEASURES WITH FORMALIN**

The aim of the study was to assess the activity of the antioxidant defenses (superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, total antioxidant capacity) in the cardiac tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) after preventive disinfecting measures with formalin (final concentration 200 ml/m³ in water, 20 minutes application, three times repeated in 3 days). Disinfection of fish caused an increase in catalase activity and a decrease in the superoxide dismutase activity. Correlation analysis confirmed the relationship between catalase activity and a high level of total antioxidant capacity in the cardiac tissue of rainbow trout after preventive disinfecting measures with formalin. The use of formalin as a disinfectant in rainbow trout contributes to the preservation of the functional potential of the stress-limiting antioxidant defense system, which will prevent the accumulation of toxic products of lipid peroxidation and oxidatively modified proteins.

Key words: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), heart, formalin, disinfection, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, total antioxidant capacity.

Введение

В условиях интенсивного развития аквакультуры важнейшей задачей является использование высококачественных препаратов, применяемых для очистки гидротехнических сооружений и среды обитания выращиваемых в рыбоводстве гидробионтов от нежелательных организмов, профилактики и терапии эктопаразитарных заболеваний у культиви-

руемых объектов, а также разработка рекомендаций по использованию данных средств в указанной сфере деятельности [15]. От этого зависит не только увеличение объемов продукции аквакультуры, но и улучшение её качества [1]. Одним из препаратов, чрезвычайно эффективных для уничтожения простейших паразитов (кроме *Chilodonella*), является формалин [15].

Формальдегид губительно действует на микроорганизмы, грибы, вирусы, паразитов, их личинки, цисты и яйца. В основе этого действия лежит его способность вступать в реакцию с белком и денатурировать его. Формальдегид в меньшей степени, чем другие дезинфектанты, связывается с органическими веществами субстрата и глубоко проникает в обеззараживаемый объект. Наилучшая его эффективность проявляется при температуре выше 15 °С. При температурах ниже 10 °С бактерицидное действие формальдегида значительно снижается. Возбудители паразитарных болезней (ихтиофтириусы, триходины, дактилогирусы, гидродактилюсы), а также возбудители инфекционных заболеваний, например *Aeromonas hydrophyla*, погибают в 2%-м растворе формальдегида через 10–15 мин. Ванна с сильной концентрацией формалина действует смертельно также на моногенетических сосальщиков, ракообразных и пиявок [15].

Несмотря на полученные положительные результаты, влияние отдельных дезинфектантов на состояние рыб, а также специфичность вызываемых ими физиологических реакций остаются до конца не изученными, а зачастую и неизвестными [11]. Имеющиеся в доступной нам литературе данные в большинстве случаев характеризуют лишь обеззараживающие эффекты дезинфектантов и уровень вызываемой ими защиты [1]. Не менее важным, на наш взгляд, является изучение физиологического состояния, а также биохимические изменения в различных тканях рыб после профилактических дезинфицирующих мероприятий.

Антиоксидантная система (АОС) является показателем состояния адаптивно-компенсаторного потенциала организма, поэтому представляется целесообразным выяснить особенности антиоксидантных ферментных процессов в тканях рыб после дезинфицирующих мероприятий с формалином, определить их взаимосвязь с биохимическими показателями, характеризующими функциональное состояние внутренних органов [13]. С другой стороны, необходим поиск доступных, недорогих технологий, позволяющих повысить диагностическую и прогностическую информативность профилактических и лечебных мероприятий в аквакультуре.

Одним из основных направлений современного этапа развития методологии дезинфекции, помимо разработки новых показаний к её применению в аквакультуре, являются исследования, посвященные дальнейшему детальному изучению механизма действия дезинфектантов, в частности, на состояние процессов перекисного окисления липидов, системы антиоксидантной защиты, а также структурно-функциональное состояние биологических мембран [7–9, 12, 13]. Имеющиеся данные по этим вопросам носят весьма противоречивый характер, а исследований по изучению процессов перекисного окисления и состояния системы антиоксидантной защиты при применении дезинфектантов недостаточно. Исследования в этом плане весьма важны для разработки биохимических методов контроля эффективности дезинфекции и дальнейшего изучения ее с позиции безопасности для организма рыб [12]. На основании вышеизложенного цель работы заключалась в изучении активности АОС (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, общая антиоксидантная активность) в сердечной ткани радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) после профилактических дезинфицирующих мероприятий с формалином.

Объекты и методы исследований

Эксперимент проводили в Отделе исследований лососевых рыб Института пресноводного рыбного хозяйства (Жуково, Польша). Все биохимические анализы проводили на кафедре зоологии и физиологии животных Института биологии и охраны окружающей сре-

ды Поморского университета (Слупск, Польша). Радужная форель была разделена на две группы (контрольную и опытную). В опытной группе (n=11) рыба была подвержена профилактическому купанию в растворе формалина (конечная концентрация 200 мл/м³ воды, по 20 мин аппликации трижды в течение 3 дней). Контрольную группу (n=11) обработали подобным образом с использованием той же воды, в которой находилась рыба в бассейнах. Два дня после последнего купания рыбу отобрали из бассейнов для дальнейших исследований. Сердечная ткань была выделена из рыб после декапитации. Буфер изоляции содержал 100 мМ Трис-НСl (рН 7,2). Гомогенаты центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Белок в пробах определяли методом Брэдфорд (1976). Активность системы антиоксидантной защиты (АОЗ) определяли за активностью супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), глутатионредуктазы (ГР), глутатионпероксидазы (ГПО). Общую антиоксидантную активность (ОАА) оценивали в реакции с Твином-80. Полученные результаты анализировали с помощью пакета программы STATISTICA 8.0 (StatSoft, Poland) [14].

Результаты и их обсуждение

Целью наших исследований было определение активности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы, а также общей антиоксидантной активности как основных маркеров антиоксидантной системы в сердечной ткани радужной форели после профилактических дезинфицирующих мероприятий с формалином (рис. 1 и 2).

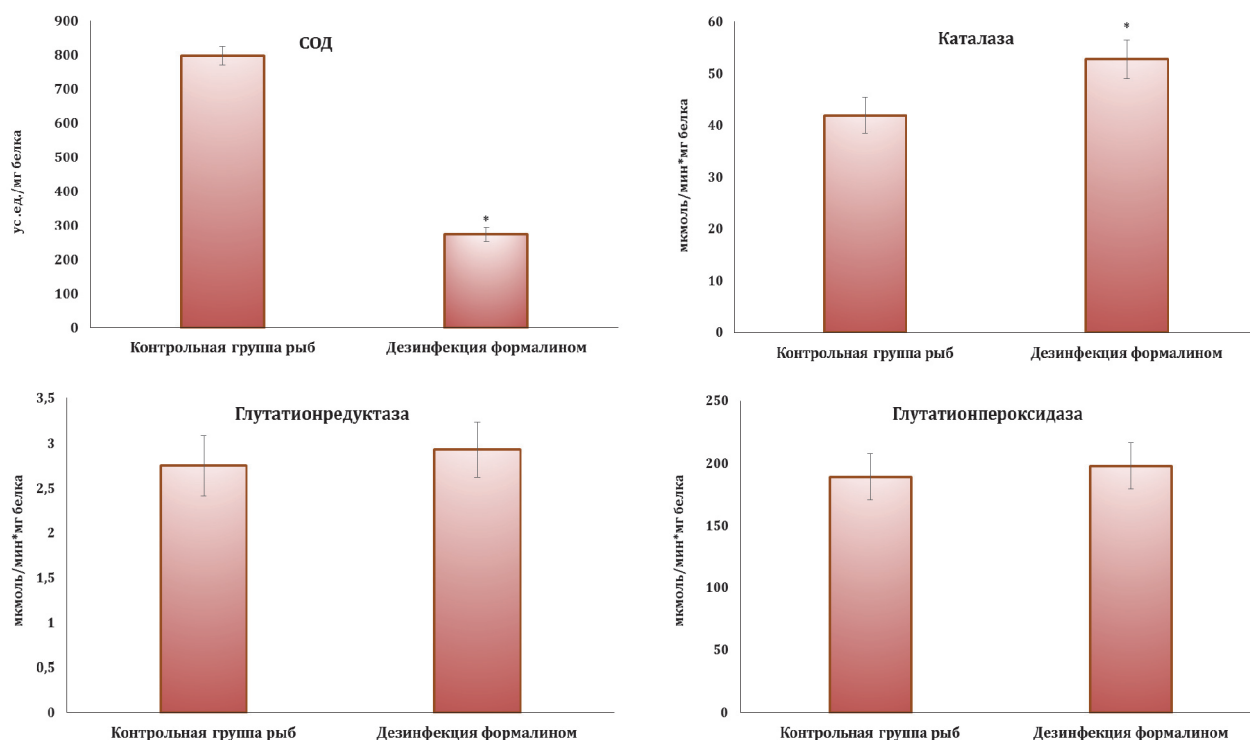


Рис. 1. Активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в сердечной ткани радужной форели после профилактических дезинфицирующих мероприятий с формалином:

* – изменения между контрольной и дезинфицированной группами рыб статистически существенные ($p < 0,05$)

Fig. 1. Activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, and glutathione peroxidase in the cardiac tissue of rainbow trout after preventive disinfecting measures with formalin:

* – the changes are statistically significant ($p < 0,05$) between the control and disinfected groups

Клеточная защита от активных форм кислорода (АФК) представляет собой многоуровневую систему биооксидантов. Первичная защита ослабляет реакции инициации свободнорадикального окисления, уменьшая концентрацию свободных радикалов [7, 8, 13]. В нашем исследовании была проведена оценка возможностей ферментативной антиоксидантной защиты сердца радужной форели ограничить развитие окислительного стресса после дезинфицирующих мероприятий с формалином. К ферментативной АОС относятся: супероксиддисмутаза, дисмутирующая супероксидный радикал, каталаза, удаляющая перекись водорода и глутатион, участвующий в детоксикации перекисей [7].

Ключевым ферментом антиоксидантной защиты организма является супероксиддисмутаза (СОД). Данный фермент осуществляет дисмутацию супероксидного анион-радикала – продукта одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода, который образуется практически во всех клетках организма, контактирующих с кислородом, и играет ведущую роль в процессах токсичности АФК. Супероксидный анион-радикал действует на все компоненты клеток (белки, липиды, нуклеиновые кислоты), на компоненты соединительных тканей (гиалуроновая кислота), а также является предшественником более токсичного гидроксильного радикала (ОН) [7–9, 12, 13]. Дезинфекция рыб в наших исследованиях вызвала разнонаправленные изменения в активности СОД и каталазы. В частности, активность СОД существенно уменьшилась на фоне увеличения активности каталазы (см. рис. 1). Значительное уменьшение активности СОД после воздействия формалина отражало, вероятно, длительное и интенсивное поступление в сердечную ткань высоких концентраций активных форм кислорода, которые приводят к декомпенсации адаптационных механизмов. С другой стороны, известно, что активность СОД зависит от уровня кислорода и его реакционноспособных интермедиатов в тканях [7]. Образующийся в результате метаболизма кислорода супероксидный анион-радикал является иницирующим фактором для СОД. Гипоксия может явиться причиной низкой активности СОД [7, 8, 13]. С другой стороны, существенное снижение активности СОД может указывать на ингибирующее действие пероксида водорода, образующегося в реакции дисмутации супероксидного анион-радикала [7]. Обоснованность этого факта подтверждает увеличение активности каталазы, которая раскладывает пероксид водорода до кислорода и воды. После дезинфицирующих мероприятий увеличение активности каталазы в сердечной ткани радужной форели можно считать приспособительной реакцией, направленной на компенсацию развивающейся гипоксии. Не исключена также аллостерическая активация фермента возросшей концентрацией реактивных кислородных радикалов [7, 8, 13].

Статистически существенных изменений в активности ферментов глутатионового звена АОС не выявлено (см. рис. 1). Несмотря на этот факт, общая антиоксидантная активность в сердечной ткани радужной форели после дезинфицирующих мероприятий с формалином имела тенденцию к увеличению (рис. 2). Как показали данные корреляционного анализа, повышенная активность каталазы обеспечивает высокий уровень общей антиоксидационной активности.

В наших предыдущих исследованиях мы оценивали последствия использования формалина на содержание маркеров окислительного стресса (ТБК-активные продукты, альдегидные и кетоновые производные окислительной модификации белков) в печени и сердце радужной форели. Действие формалина как дезинфицирующего агента существенно не повлияло на интенсивность липопероксидации в печеночной ткани и вызывало увеличение содержания ТБК-продуктов в сердце радужной форели. Дезинфекция рыб формалином увеличила содержание альдегидных и кетоновых производных окислительной модификации белков в сердце и уменьшила их содержание в ткани печени [2]. В ткани печени активность СОД существенно увеличилась (на 57 %, $p=0,024$) на фоне снижения активности ГР (на 69 %, $p=0,000$). Существенные изменения активности ГР и СОД явно указывают на

усиленное участие ферментов системы глутатиона (GSH) и первого звена АОС в элиминации активных форм кислорода (АФК) у дезинфицированных рыб. Статистически существенных изменений в активности каталазы и ГПО не выявлено [3, 6].

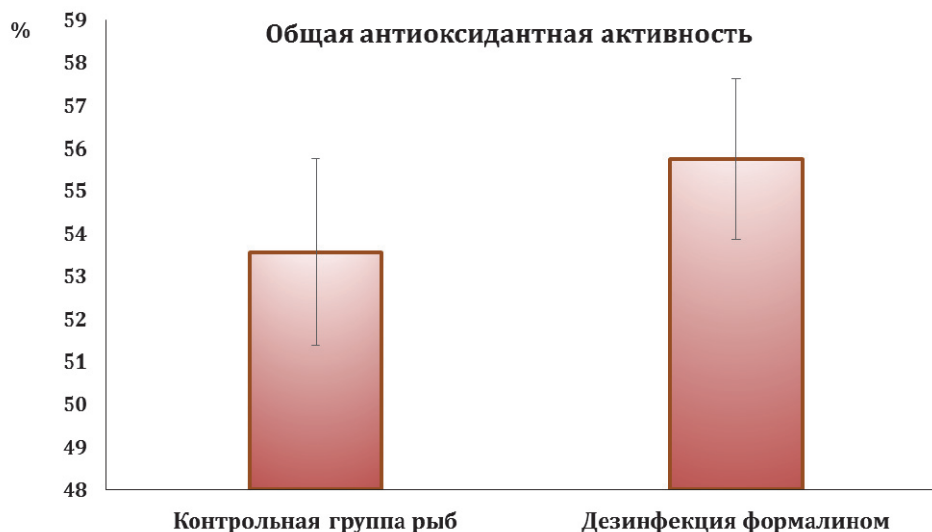


Рис. 2. Общая антиоксидантная активность сердечной ткани радужной форели после профилактических дезинфицирующих мероприятий с формалином

Fig. 2. The total antioxidant capacity in the cardiac tissue of rainbow trout after preventive disinfecting measures with formalin

В жаберной ткани радужной форели после профилактических дезинфицирующих мероприятий с формалином тиол-дисульфидное равновесие указывает на НАДФН-зависимое восстановление окисленного глутатиона и в сдвиге интенсивности обмена глутатионовой системы антиоксидантной защиты [3]. В мышечной ткани дезинфекция рыб формалином в дозе 200 мл/м³ вызвала статистически существенное снижение активности глутатионредуктазы и общей антиокислительной активности с одновременным несущественным уменьшением содержания маркеров перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков. Корреляционный анализ подтвердил зависимость между содержанием альдегидных и кетонных производных окислительно модифицированных белков, активностью супероксиддисмутазы и каталазы в мышечной ткани радужной форели после профилактических дезинфицирующих мероприятий с формалином [4]. Воздействие формалина на организм рыб проявлялось в снижении интенсивности обмена глутатионовой системы антиоксидантной защиты и общей антиоксидантной активности [5].

Выводы

Дезинфекция рыб формалином в дозе 200 мл/м³ вызывает статистически существенные изменения активности супероксиддисмутазы и каталазы. Увеличение активности каталазы поддерживает высокий уровень общей антиокислительной активности сердечной ткани радужной форели. Воздействие формалина на организм рыб проявляется в поддержании равновесного состояния окислительно-восстановительных процессов, связанных с реализацией защитной функции каталазы. Корреляционный анализ подтвердил зависимость между активностью каталазы и высоким уровнем общей антиоксидантной активности в сердечной ткани радужной форели. Применение формалина как дезинфицирующего агента у радужной форели способствует сохранению функционального потенциала

стресс-лимитирующей системы антиоксидантной защиты, что предотвратит накопление в организме токсических продуктов перекисного окисления липидов и окислительно модифицированных белков.

This study was supported by grant of the Pomeranian University for Young Scientists.

Список литературы

1. Рахконен Р., Веннерстрем П., Ринтамяки П., Каннел Р. НИИ охотничьего и рыбного хозяйства. Здоровая рыба. Профилактика, диагностика и лечение болезней. Nuukuraino, Helsinki, 2013.

2. Ткаченко Г.М., Грудневская И. Влияние формалина на содержание маркеров окислительного стресса в печени и сердце радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) // Инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса: материалы IV Междунар. конф. / ФГБНУ «ВНИИОК», Ставрополь, 2015. Ставрополь: Бюро новостей, 2015. Т. 1, вып. 8. С. 540–543.

3. Ткаченко Г.М., Грудневская И. Маркеры антиоксидантной защиты в жаберной ткани радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) после профилактических дезинфицирующих мероприятий с формалином (Biomarkers of antioxidant defense in the gill tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) disinfected by formalin) // Инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса: материалы V Междунар. конф. / ФГБНУ «ВНИИОК», Ставрополь, 2016. Ставрополь: Бюро новостей, 2016. Т. 1, вып. 9. С. 319–322.

4. Ткаченко Г.М., Грудневская И. Окислительный стресс в мышечной ткани радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) после профилактических дезинфицирующих мероприятий с формалином // Континентальная аквакультура: ответ вызовам времени: материалы Всерос. науч.-практ. конф. (Москва, ВДНХ, 21–22 января 2016 г.) [Электронный ресурс]. М.: Изд-во «Перо», 2016. Т. 2. С. 271–280.

5. Ткаченко Г.М., Грудневская И. Система антиоксидантной защиты мышечной ткани радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), дезинфицированной формалином // Актуальные вопросы импортозамещения в сельском хозяйстве и ветеринарной медицине, 31 марта 2016 г.: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 110-летию с дня рождения доктора ветеринарных наук, профессора Есютина Александра Васильевича. Троицк: Южно-Уральский ГАУ, 2016. С. 200–205.

6. Ткаченко Г.М., Грудневская И. Маркеры антиоксидантной защиты в печени радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) после профилактических дезинфицирующих мероприятий с формалином // Аграрная наука – сельскому хозяйству: материалы XII Междунар. науч.-практ. конф. (7–8 февраля 2017 г.): в 3 кн. Барнаул: РИО Алтайского ГАУ, 2017. Кн. 3. С. 305–307.

7. Davies K.J. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems // IUBMB Life. 2000. 50(4–5). P. 279–289.

8. Kelly K.A., Havrilla C.M., Brady T.C., Abramo K.H., Levin E.D. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems // Environ. Health Perspect. 1998. 106(7). P. 375–384.

9. Limón-Pacheco J., Gonsbatt M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress // Mutat. Res. 2009. 674(1–2). P. 137–147.

10. Tkachenko H., Grudniewska J. Evaluation of oxidative stress markers in the heart and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) exposed to the formalin // Fish Physiol. Biochem. 2016. 42. P. 1819–1832.
11. Torgersen Y., Håstein T. Disinfection in aquaculture // Rev. Sci. Tech. 1995. 14(2). P. 419–434.
12. Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2006. 64(2). P. 178–189.
13. Winston G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Comp. Biochem. Physiol. C. 100(1–2). P. 173–176.
14. Zar J.H. Biostatistical Analysis, 4th ed., Prentice Hall Inc. New Jersey, 1999.
15. Zepeda C., Jones J.B., Zagnutt F.J. Compartmentalisation in aquaculture production systems // Rev. Sci. Tech. 2008. 27(1). P. 229–241.

Сведения об авторах: Ткаченко Галина Михайловна, кандидат биологических наук, доцент, докторант, e-mail: tkachenko@apsl.edu.pl, biology.apsl@gmail.com;

Грудневска Йоанна, кандидат биологических наук, докторант, e-mail: jgrudniewska@infish.com.pl.