



## ЭКОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ

УДК 639.371.2.09

### АКТИВНОСТЬ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ ТИМПАНИИ У МОЛОДИ СТЕРЛЯДИ *ACIPENSER RUTHENUS L.*

© 2012 *Абросимова Н.А., Абросимова К.С.*

*Филиал ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского» в г. Ростове-на-Дону*

При заболевании тимпанией у молоди стерляди отмечены биохимические и патофизиологические нарушения, о чем свидетельствует снижение активности малатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы и повышение активности лактатдегидрогеназы в их печени и мышцах. Эти нарушения сопровождаются изменением уровня и баланса жирных кислот  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 ряда в направлении уменьшения  $\omega$ -3 кислот.

When young sterlet is suffering from tympanism, biochemical and pathophysiological disorders are observed; the activity of malate dehydrogenase and succinate dehydrogenase lowers in the fish liver and muscles, while the activity of lactate dehydrogenase increases. Such disorders are accompanied by changes in the level and balance of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids towards decrease in  $\omega$ -3 fatty acids.

**Ключевые слова:** стерлядь, молодь, тимпания, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, жирные кислоты.

**Keywords:** sterlet, young fish, tympanism, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, fatty acids.

Проблема выращивания физиологически полноценной жизнестойкой молоди в промышленном рыбоводстве, несмотря на многочисленные научные разработки, остается актуальной. Это, в первую очередь, обусловлено со спецификой интенсивной аквакультуры, где рыбы выращиваются в условиях, существенно отличающихся от естественных мест обитания. Вследствие этого рыбы подвергаются стрессам различной природы, что отрицательно влияет на их физиологическое состояние и, соответственно, здоровье [1]. Исследования в области физиологии животных, в том числе осетровых рыб, показали, что при различных патологиях трофического, инфекционного или токсического характера активируются процессы свободнорадикального окисления, в частности перекисного окисления липидов [1, 2, 7]. При этом возникающие нарушения превышают надежность защитной антиоксидантной системы, что приводит к тому, что клетка не справляется с окислительной свободнорадикальной атакой и в ней начинают накапливаться продукты окислительной деградации липидов.

Так, например, в процессе развития тимпаний от начальной стадии к предагональной активность продуктов окисления липидов – малонового диальдегида и диеновых конъюгатов – увеличилась в 2,7 и 2,4 раза соответственно, а оснований Шиффа – более чем в 6 раз [3]. Следовательно, имело место повышение активности всех этапов свободнорадикального окисления – начальных, промежуточных, конечных.

Наиболее стереотипной реакцией организма на повреждение является понижение в тканях содержания супероксиддисмутазы и  $\alpha$ -токоферола, являющихся своеобразными внутриклеточными буферами, поддерживающие уровень активированного кислорода в определенной концентрации в зависимости от того или иного метаболического состояния клеток. Согласно С.И. Богославской с соавторами [5], снижение концентраций данных антиоксидантов служит диагностическим маркером на стресс-синдром в клинических и экспериментальных условиях.

В результате наших исследований установлено, что у стерляди на второй и третьей стадиях заболевания тимпанией активность супероксиддисмутазы и  $\alpha$ -токоферола ниже в 1,5-4,7 и 1,4-3,6 раза, соответственно, в сравнении с аналогичными показателями у рыб на первой стадии [3]. Эти данные наглядно свидетельствуют о патохимическом проявлении тимпаний на уровне процессов перекисного окисления липидов.



Возрастание активности процессов свободнорадикального окисления в организме больной стерляди может быть связано с постепенным снижением в ходе заболевания способности организма ингибировать свободнорадикальные реакции за счет истощения пула антиоксидантов и, вероятно, протекания иммунопатологических реакций.

В основе биологического окисления, тесно связанного с обеспечением клеток энергией, лежат реакции с участием дегидрогеназ. Реакции, катализируемые дегидрогеназами, как правило, обратимы, поэтому некоторые из них участвуют в восстановительных биосинтетических процессах.

Так, лактатдегидрогеназа катализирует обратимую реакцию восстановления пировиноградной кислоты до молочной кислоты на последней стадии гликолиза. Малатдегидрогеназа катализирует реакции глюконеогенеза, идущие в «обход» необратимых реакций гликолиза в цикле трикарбонных кислот, синтез жирных кислот. Сукцинатдегидрогеназа катализирует в цикле Кребса обратимое окисление янтарной кислоты до фумаровой. Поэтому активность дегидрогеназ может служить для диагностики состояния организма при заболеваниях или в неблагоприятных условиях.

В обеспечении нормального функционирования организма важная роль отводится эссенциальным жирным кислотам, в частности отдельным высоконенасыщенным жирным кислотам  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 ряда, являющихся протекторами экстремальных состояний и их соотношению.

Жирные кислоты  $\omega$ -3 ряда участвуют в регуляции ферментативной активности, проницаемости и вязкости мембран. Недостаток или избыток приводит к существенным нарушениям физиологического статуса организма. Доказано, что среди полиеновых кислот особую роль играет самая ненасыщенная из них - докозагексаеновая кислота ( $C_{22:6}$   $\omega$ 3). Недостаточность докозагексаеновой кислоты приводит к резкому снижению устойчивости рыб к экстремальным воздействиям. В силу своих физиолого-биохимических свойств эта кислота в значительной степени определяет функциональное состояние и защитные возможности вида [8].

**Материал и методы исследований.** Объектом исследований служила молодь стерляди массой 2-3 г с различной степенью тяжести заболевания. Выделяли 3 стадии тимпании: первая (начальная), вторая (средней тяжести) и третья (тяжелая или предагональная).

Изучали активность лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, и соотношение активности сукцинатдегидрогеназы к активности лактатдегидрогеназы на исследуемых стадиях заболевания в печени и мышцах молоди стерляди, а также жирнокислотный состав мышц молоди на предагональной стадии. Контролем служила клинически здоровая стерлядь.

Определение активности лактатдегидрогеназы проводили по методу Зумермана и Вестейна [6], малатдегидрогеназы – по методу Амелунга с соавторами [4], уровень сукцинатдегидрогеназы – по методу Сонтула с соавторами [9].

Жирные кислоты определяли методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «ЦВЕТ-5». В качестве неподвижной среднеполярной фазы использовали "Лас 2R-446" – 27%. Идентификацию жирных кислот осуществляли путем сравнения графиков зависимости логарифмов удерживаемых объемов от длины цепи углеродных атомов. В качестве метчиков использовали стандартные смеси метиловых эфиров жирных кислот – "Sigma-189-1" и "Sigma-189-6".

**Результаты исследований.** В основе развития патологического процесса всегда лежат те или иные нарушения ферментативных реакций. Исследования показали, что дегидрогеназы дыхательной цепи митохондрий сукцинатдегидрогеназа, а также субстратные дегидрогеназы лактатдегидрогеназа и малатдегидрогеназа очень зависимы в своей активности от степени развития заболевания.

Известно, что печень без признаков функциональной и морфологической патологии характеризуется наибольшей активностью малатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы и наименьшей лактатдегидрогеназы.

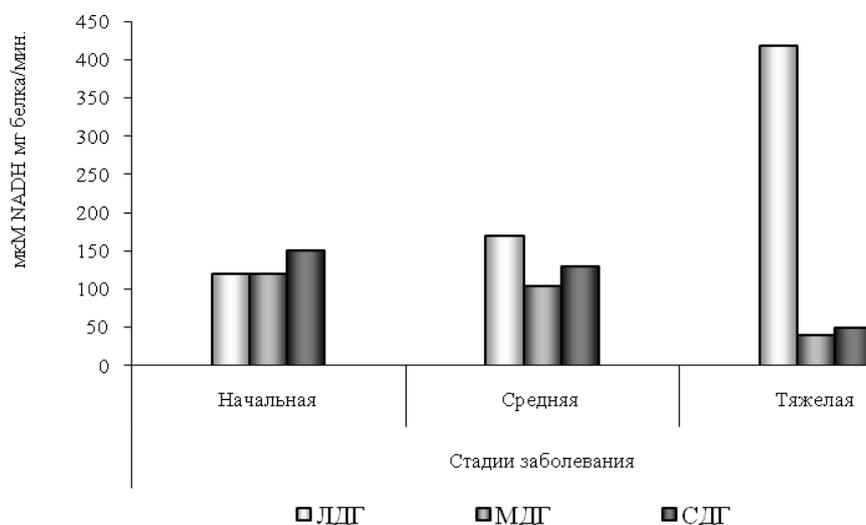
В печени стерляди на средней и тяжелой (предагональной) стадиях заболевания активность как малатдегидрогеназы, так и сукцинатдегидрогеназы оказалась в 1,2 и 3 раза соответственно ниже, чем на первой начальной (рис. 1).

Причем соотношение между сукцинатдегидрогеназой и лактатдегидрогеназой – СДГ/ЛДГ – последовательно снижалось на порядок. Так, данное соотношение на начальной стадии заболевания составило 1,2, на средней – 0,8, на предагональной – 0,12.

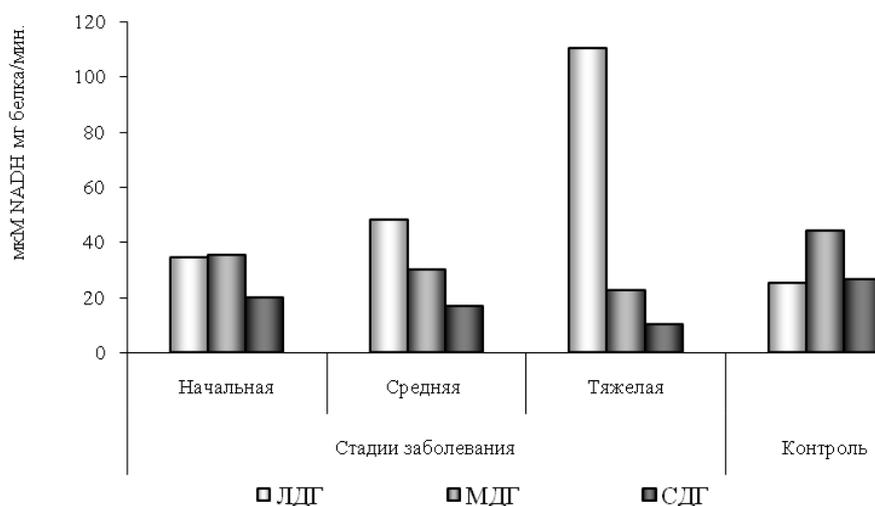
Такой исключительно низкий уровень активности малатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы в печени стерляди на предагональной стадии может быть причиной снижения эффективности участия печени в регуляции обмена веществ и энергии.



Аналогичная картина прослеживается и в мышцах пораженной рыбы, где активность лактатдегидрогеназы от начальной к предагональной (тяжелой) повысилась в 3 раза, а активность малатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы – снизилась в 1,6 и 2 раза (рис. 2).



**Рис. 1.** Активность дегидрогеназ в печени стерляди, пораженной тимпанией, мкМ NADH мг белка/мин: ЛДГ – лактатдегидрогеназа, МДГ – малатдегидрогеназа, СДГ – сукцинатдегидрогеназа



**Рис. 2.** Активность дегидрогеназ в мышцах стерляди, пораженной тимпанией, мкМ NADH мг белка/мин: ЛДГ – лактатдегидрогеназа, МДГ – малатдегидрогеназа, СДГ – сукцинатдегидрогеназа

Соотношение активности СДГ/ЛДГ в процессе развития заболевания уменьшилось от 0,6 на начальной стадии до 0,4 на средней и 0,1 на тяжелой, т.е. в 6 раз.

В сравнении со здоровыми рыбами у стерляди с развитием болезни активность лактатдегидрогеназы в мышцах повысилась от 1,4 до 4,3 раза, а активность малатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы снизилась от 1,2 до 2 раз и от 1,3 до 2,6 раз соответственно. Соотношение активности СДГ/ЛДГ уменьшилось от 1,7 до 10 раз.

Наблюдаемое снижение активности малатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы в печени и мышцах в сочетании с высокой активностью лактатдегидрогеназы, вероятно, свидетельствует об ухудшении функционального состояния стерляди. Снижение активности малатдегидрогеназы, одного из узловых ферментов цикла трикарбоновых кислот, влечет за собой нарушение непрерывного и направленного транспорта восстановленных эквивалентов из цитоплазмы в митохондрии.



рии. Снижение сукцинатдегидрогеназной активности приводит к нарушению в системе трансформации энергии в митохондриях.

Отмеченная обратная связь между уменьшением отношения сукцинатдегидрогеназы к лактатдегидрогеназе (СДГ/ЛДГ) и стадиями развития болезни является типичным проявлением изменения концентрации главных субстратов окисления и продуктов реакции.

Клетки нормальной здоровой ткани покрывают свои энергетические потребности прежде всего в процессе дыхания и связанных с ним процессах кислородного фосфорилирования и лишь незначительная часть энергии образуется в процессе субстратного фосфорилирования, происходящего во время гликолиза.

Увеличение активности лактатдегидрогеназы может свидетельствовать об усилении гликолиза и соответственно накоплении его продукта – молочной кислоты. В результате смещения реакции в сторону продукта, происходит уменьшение пировиноградной кислоты, которая в дальнейшем могла бы вступить в цикл трикарбоновых кислот. Изменение соотношения СДГ/ЛДГ в сторону увеличения лактатдегидрогеназной и уменьшения сукцинатдегидрогеназной активности свидетельствует об уменьшении сопряженности окисления с фосфорилированием, о вытеснении окислительно-восстановительных процессов анаэробными.

Образующаяся молочная кислота не может далее окисляться митохондриями, пока снова не подвергнется окислению до пировиноградной кислоты за счет НАД, находящейся в цитоплазме. Торможение образования высокоэнергетических соединений в цикле Кребса приводит к последующему увеличению гликолиза.

Вследствие снижения активности малатгидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы, увеличения активности лактатдегидрогеназы и изменения баланса между сукцинатдегидрогеназой и лактатдегидрогеназой, соотношение между которыми (СДГ/ЛДГ) уменьшилось до 10 раз, нарушаются реакции гликолиза и глюконеогенеза, синтез жирных кислот, что подтверждается нашими данными снижения уровня последних, особенно полиненасыщенных жирных кислот  $\omega$ 3 ряда (табл. 1).

Таблица 1

**Жирнокислотный состав общих липидов (ОЛ) и фосфолипидов (ФЛ) больной и здоровой молодежи стерляди, % жирных кислот**

Жирные кислоты	Тимпания (предагональная стадия)		Контроль	
	ОЛ	ФЛ	ОЛ	ФЛ
$\omega$ 3,	0,7	0,5	10,5	14,1
в т.ч.: 18:3	0,1	0,1	1,2	1,8
20:5	0,4	0,2	3,0	3,7
22:5	0,1	0,1	1,3	1,8
22:6	0,1	0,1	5,1	6,8
$\omega$ 6,	20,7	22,7	6,3	5,4
в т.ч.: 18:2	4,7	5,6	2,1	1,6
20:4	6,8	7,2	3,7	3,3
$\omega$ 3/ $\omega$ 6	0,03	0,02	1,7	2,6

Исследования показали, что при заболевании тимпанией у молодежи стерляди существенно изменяется уровень и баланс полиеновых жирных кислот  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 ряда. Так, доля  $\omega$ -3 кислот в составе общих липидов и фосфолипидов у молодежи на тяжелой предагональной стадии уменьшилась в 15 и 28 раз соответственно, а  $\omega$ -6 кислот увеличилось в 3 и 4 раза. Эти изменения обусловлены за счет значительного уменьшения в липидах докозагексаеновой (22:6), докозапентаеновой (22:5), эйкозапентаеновой (20:5) и линоленовой (18:3) кислот и увеличения линолевой (18:2) и арахидоновой (20:4) кислот. Причем в наибольшей степени в организме больной стерляди утилизируется докозагексаеновая кислота, уровень которой снизился в общих липидах и фосфолипидов более чем в 50 раз.

Изменение уровня  $\omega$ 3 и  $\omega$ 6 жирных кислот при заболевании тимпанией обусловило исключительно низкое соотношение суммы  $\omega$ 3/ $\omega$ 6 в липидах эти рыб (в норме более 1), что свидетельствует о патофизиологических перестройках в их организме.

Таким образом, по мере протекания заболевания и развивающихся патологических перестройках у молодежи возникают изменения в метаболических процессах, захватывающие раньше



всего реакции энергетического обмена, что приводит к дисбалансу углеводного обмена и в конечном итоге к энергетическому дефициту в организме рыб.

Полученные результаты позволяют предположить возможность лечения и профилактики тимпании за счет специализированного питания. Причем, исходя из анализа динамики заболевания по физиолого-биохимическим показателям, успешное лечение может быть гарантировано вплоть до средней стадии поражения. На предагональной тяжелой стадии защитные и компенсаторные функции организма находятся на грани истощения и нарушения носят необратимый характер.

#### Библиографический список

1. Абросимов С.С. Стресс-факторы и их влияние на физиолого-биохимический статус молоди осетровых // Тр. Кубанского гос. аграрного ун-та, 2008. Вып. 3(12). С. 93-98.
2. Абросимов С.С., Абросимова Е.Б. Показатели липидного и жирнокислотного обмена молоди бестера при некрозе жабр // Тр. Кубанского гос. аграрного ун-та, 2009. Вып. 1(16). С. 149-153.
3. Абросимова К.С. Кормление рыб в интенсивной аквакультуре и окислительный стресс // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Мат-лы II Междунар. Науч. Конф. Ростов-на-Дону, 8-10 октября 2008 г. Ростов-на-Дону: Изд-во ЮФУ, 2008. С. 12-13.
4. Амелунг Д. и др. (Amelung D et al) Определение активности МДГ (малатдегидрогеназы) // Клиническая ферментология. Справочник. / Щеклик Э., Барановски Т. и др. / Под ред. Щеклика Э. Варшава: Польское государственное медицинское издательство, 1966. С. 189.
5. Богословская С. И., Петяев И.М., Филимоновская Л. С., Ключков В. А., Подземельников Е. В., Стученевская Л. И. Антигипоксическое действие этимизола // Биологические мембраны и энергетика организма в норме и патологии. Сб. научн. тр. Т110 (127). Саратов, 1984. С. 67-69.
6. Zimmerman Г.И., Вестейн Г. Я. (Zimmerman H.I., Weistein H.J.). Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) // Клиническая ферментология. Справочник. / Щеклик Э., Барановски Т. и др. / Под ред. Щеклика Э. Варшава: Польское государственное медицинское издательство, 1966. С. 166-167.
7. Козлов Ю. П., Данилов В.С., Каган В. Е., Ситковский М. В. Свободно-радикальное окисление липидов в биологических мембранах. М.: МГУ, 1972. 88 с.
8. Шульман Г. Е., Юнева Т. В. Докозагексаеновая кислота и ненасыщенность липидов у рыб // Гидробиологический журнал. 1990. Т. 26, № 6. С. 50-55.
9. Sontull A.D., Ancon G.D., Amelio V. Mitochondrial enzymes (succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase) activities and free carnitine levels in teleostea and selachian skeletal muscle // Rev int. Ceanorg. Med., 1998. Pp. 91-92.

#### Bibliography

1. Abrosimov S.S. Stress factors and their affect on physiological and biochemical parameters of young sturgeons // Scientific Journal Tr. Kubanskogo gos.agrarnogo un-ta, 2008. Issue 3(12). Pp. 93-98. (in Russian).
2. Abrosimov S.S., Abrosimova E.B. Indices of lipid and fatty acid metabolism of young bester affected by gill necrosis // Proceedings of Kuban State Agriculture University. 2009. Issue 1(16). PP. 149-153. (in Russian).
3. Abrosimova K.S. Fish feeding during intensive aquaculture and oxidation stress /Actual Problems of Biology, Nanotechnologies and Medicine: Proceedings of the Second Internat.Sci.Conf. Rostov-on-Don, 8-10 Oct. 2008. Rostov-on-Don: YuFU, 2008. Pp. 12-13. (in Russian).
4. Amelung D et al. Estimation of malate dehydrogenase activity // Clinical Enzymology. Manual. / Shcheklik E., Baranovski T. et al. / Ed. by Shcheklik E. Warsaw: Polish State Medical Publishing House. 1966. Pp. 189.
5. Bogoslovskaya S.I., Petyaev I.M., Filimonovskaya L.S., Klochkov V.A., Podzemelnikov E.V., Stuchenevskaya L.I. Antihypoxic action of ethymizol // Biological membranes and energy resources of an organism: norm and pathology. Proceedings. Vol. 110(127). Saratov, 1984. Pp. 67-69. (in Russian).
6. Zimmerman H.I., Weistein H.J. Estimation of lactate dehydrogenase activity // Clinical Enzymology. Manual. / Shcheklik E., Baranovski T. et al. / Ed. by Shcheklik E. Warsaw: Polish State Medical Publishing House. 1966. P. 189.
7. Kozlov Yu.P., Danilov V.S., Kagan V.E., Sitkovski M.V. Free radical lipid oxidation in biological membranes. MGU, 1972. 88 p. (in Russian).
8. Shulman G.E., Yuneva T.V. Docosahexaenoic acid and unsaturated lipids of fish // J. Hydrobiol. 1990. Vol. 26, No.6. Pp. 50-55. (in Russian).
9. Sontull A.D., Ancon G.D., Amelio V. Mitochondrial enzymes (succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase) activities and free carnitine levels in teleostea and selachian skeletal muscle // Rev int. Ceanorg. Med., 1998. Pp. 91-92.