

УДК 597.554.3–111.11:612.017

Содержание иммунных комплексов и уровень окислительных процессов в сыворотке крови различных селекционных групп карпа

Г.И. Пронина¹, Д.В. Микряков², Н.И. Силкина², А.Б. Петрушин¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства (ФГБНУ «ВНИИР»), п. им. Воровского, Московская обл.

² Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН (ФГБУН «ИБВВ им. И.Д. Папанина»), п. Борок
e-mail: gidrobiont4@yandex.ru

Проведено сравнительное исследование содержания иммунных комплексов и уровня окислительных процессов в сыворотке крови карпа *Cyprinus carpio* из разных климатических зон. Материалом для исследования послужили двухлетки разных пород и кроссов карпа из рыбоводных хозяйств «Кирия» Чувашской республики (2-я зона рыбоводства), «Ергенинский» и «Флора» Волгоградской области (5-я зона рыбоводства). Исследованные породы и кроссы карпов различались уровнем иммунных комплексов и состоянием окислительно-восстановительного баланса в сыворотке крови. На фоне высоких показателей содержания иммунных комплексов у некоторых кроссов карпа отмечено повышенное содержание продуктов перекисного окисления липидов и снижение антиоксидантной защиты. Повышенные уровни иммунных комплексов, малонового диальдегида и константы окисления субстрата указывают на супрессию механизмов гуморального иммунитета и нарушение прооксидантно-оксидантного баланса, которые могут быть вызваны попаданием в организм антигенов или нарушением условий содержания. Полученные результаты указывают на возможность использования иммуно-биохимических показателей для оценки состояния здоровья рыб в условиях аквакультуры.

Ключевые слова: породы и кроссы карпа *Cyprinus carpio*, неспецифические иммунные комплексы, перекисное окисление липидов, антиокислительная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Одна из актуальных задач аквакультуры — оценка состояния здоровья рыб с использованием простых для определения и в тоже время информативных показателей. С их помощью специалисты смогут в короткие сроки провести мониторинг и определить необходимые профилактические и лечебные процедуры.

При выращивании в условиях аквакультуры наибольшее влияние на состояние здоровья

рыб оказывает воздействие неблагоприятных стресс-факторов (колебаний кислородного и температурного режимов, изменений рН-среды и условий кормления, транспортировки и др.), которые приводят к снижению иммунитета и выживаемости, а также темпов роста и развития. При этом в организме рыб происходит нарушение функционирования иммуно-биохимических механизмов гомеостаза, обеспечивающих оптимальный рост, разви-

тие и воспроизводство [Головина и др., 2003; Головин, 2004; Baumann, 1998; Aaltonen et al., 2000; Dethloff et al., 2001; Pronina, 2013 и др.]. В литературных источниках недостаточно сведений об особенностях иммунологического и биохимического статуса рыб, выращиваемых в аквакультуре. На наш взгляд эти показатели можно использовать для осуществления мониторинга состояния здоровья рыб.

Цель данной работы — сравнительная характеристика содержания иммунных комплексов и уровня окислительных процессов в сыворотке крови карпа *Cyprinus carpio* (L., 1758) из разных климатических зон.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом для исследования послужили двухлетки разных пород и кроссов карпа. Работа выполнялась в рыбоводных хозяйствах: «Кирия» Чувашской республики — 2-я зона рыбоводства, «Ергенинский» и «Флора» Волгоградской области — 5-я зона рыбоводства (см. табл.).

Кросс «Петровский» — реципрокный гибрид чувашской чешуйчатой и анишской зеркальной пород карпа в р/х «Кирия». Кросс «Ергенинский» — реципрокный гибрид породных групп: чешуйчатого и зеркального карпа в р/х «Ергенинский». Кросс «Зеркальный» получен путём скрещивания самцов зеркального карпа (породной группы) из р/х «Ергенинский» и самок волжского рамчатого в р/х «Флора».

Все исследуемые рыбы содержались в рыбоводных прудах. Гидрохимический режим

прудов соответствовал нормативам каждой рыбоводной зоны.

Отбор проб проводили осенью после облова рыбоводных прудов. Кровь собирали у рыб из хвостовой вены прижизненно с соблюдением правил асептики. Пробы замораживали в морозильной камере (при температуре минус 15–20 °С) и транспортировали в специальных термоконтейнерах со льдом в лабораторию для исследования. В отобранных пробах определяли содержание неспецифических иммунных комплексов (ИК), продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровень антиоксидантной защиты (АЗ).

Содержание ИК устанавливали спектрофотометрически на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО) при длине волны 280 нм методом селективной преципитации с 7% полиэтиленгликолем по Гриневич и Алферову [1981].

Об интенсивности ПОЛ судили по накоплению малонового диальдегида (МДА) — одного из конечных продуктов перекисного окисления. Концентрацию МДА определяли по количеству продуктов ПОЛ, 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]. Расчёт содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, проводили с учётом коэффициента молярной экстинкции МДА ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$) и выражали в наномолях на 1 г ткани.

Уровень АЗ оценивали по кинетике окисления субстрата восстановленной формы

Таблица. Исследуемые породы и кроссы карпа.

Название породы (1) и кросса (2)	Количество рыб	Рыбоводная зона
Ангелинские краснухостойчивые чешуйчатые (1)	7	2
Ангелинские краснухостойчивые зеркальные (1)	7	2
Южный зональный тип чувашского чешуйчатого карпа (1)	10	5
Волжский рамчатый (1)	10	5
«Петровский» чешуйчатая группа (2)	7	2
«Петровский» зеркальная группа (2)	5	2
«Ергенинский» чешуйчатая группа (2)	8	5
«Ергенинский» зеркальная группа (2)	8	5
«Зеркальный» (2)	10	5

2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха по общепринятой методике [Семенов, Ярош, 1985]. Сущность метода заключается в том, что чем выше скорость окисления субстрата в присутствии биологического материала (КОС), тем ниже содержание антиоксидантов в тканях. Константу ингибирования окисления субстрата (КОС), являющуюся показателем антиокислительной активности ткани, определяли относительно контроля по формуле: $K_i = K_{кон} - K_{оп} / C$, где $K_{кон}$ и $K_{оп}$ — константы скорости окисления субстрата соответственно в контроле и в опыте; C — концентрация биологического материала в кювете.

Статистическая обработка цифрового материала осуществлялась при помощи стандартного пакета программ (приложение Statistica) с использованием t -теста, $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали отличия исследуемых иммуно-биохимических показателей у карпов разных пород (рис. 1–3).

Наиболее высокий показатель ИК у карпа кросса «Зеркальный», а низкие — у красну-

хустойчивых пород. Более высокие значения ИК установленные у особей кроссов по сравнению с другими породами, свидетельствуют о наличии патологического процесса. Известно, что ИК — комплексы антиген-антитело и связанные с ними компоненты комплемента, образующиеся в результате взаимодействия с низкомолекулярными чужеродными соединениями (гаптенами, растворимыми антигенами и аутоантигенами) [Койхо и др., 2008]. Они играют важную роль в процессах регуляции иммунных реакций, элиминации ксенобиотиков из организма и поддержании иммунологического и биохимического гомеостаза. При насыщении организма чужеродными телами, происходит избыточное образование ИК вследствие супрессии клиринговой функции клеток фагоцитарной системы [Логинов и др., 1990]. Повышенный уровень ИК, установленный у некоторых пород, указывает на супрессию механизмов гуморального иммунитета и может быть причиной снижения иммунореактивности.

Аналогичные различия установлены при исследовании показателей ПОЛ и АЗ. У особей краснухустойчивых пород, чувашской чешуйчатой и волжской рамчатой показатели

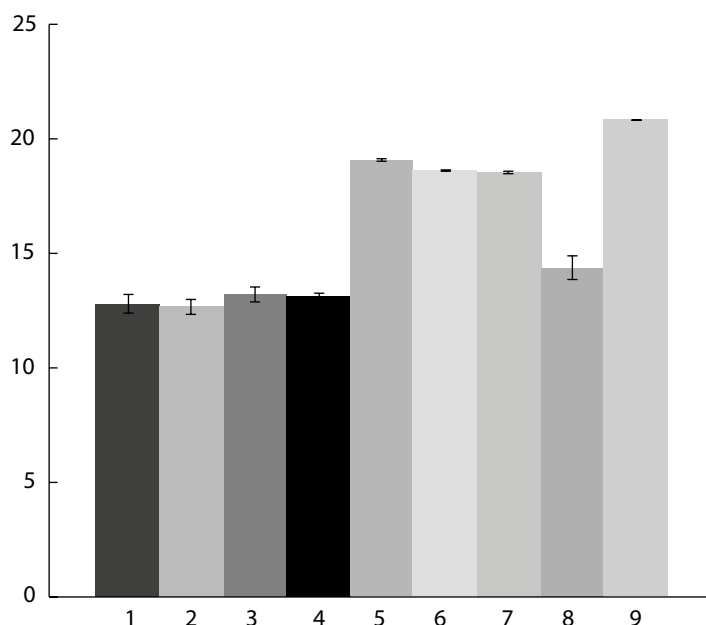


Рис. 1. Содержание ИК.

Здесь и далее: 1. Ангелинская краснухустойчивая чешуйчатая; 2. Ангелинская краснухустойчивая зеркальная; 3. Южный зональный тип чувашского чешуйчатого; 4. Волжская рамчатая; 5. Кросс «Петровский» чешуйчатая группа; 6. Кросс «Петровский» зеркальная группа; 7. Кросс «Ергенинский» чешуйчатая группа; 8. Кросс «Ергенинский» зеркальная группа; 9. Кросс «Зеркальный».

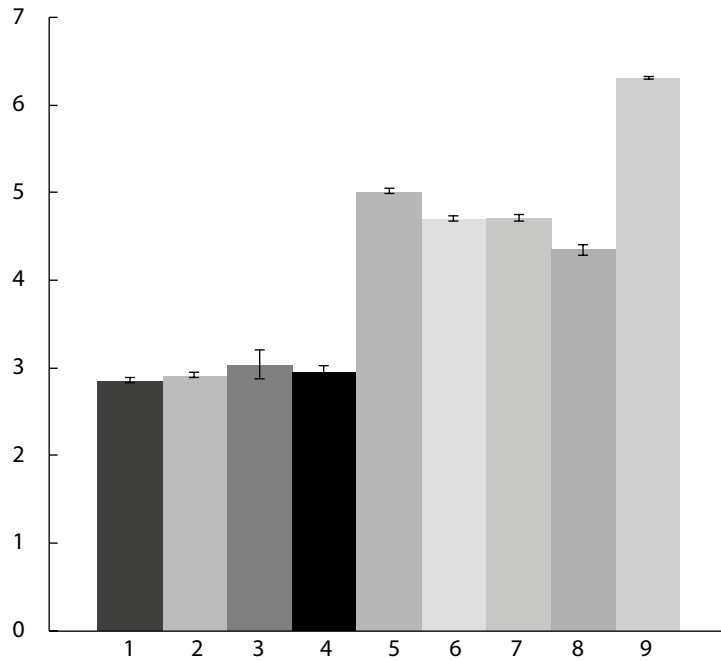


Рис. 2. Содержание МДА.

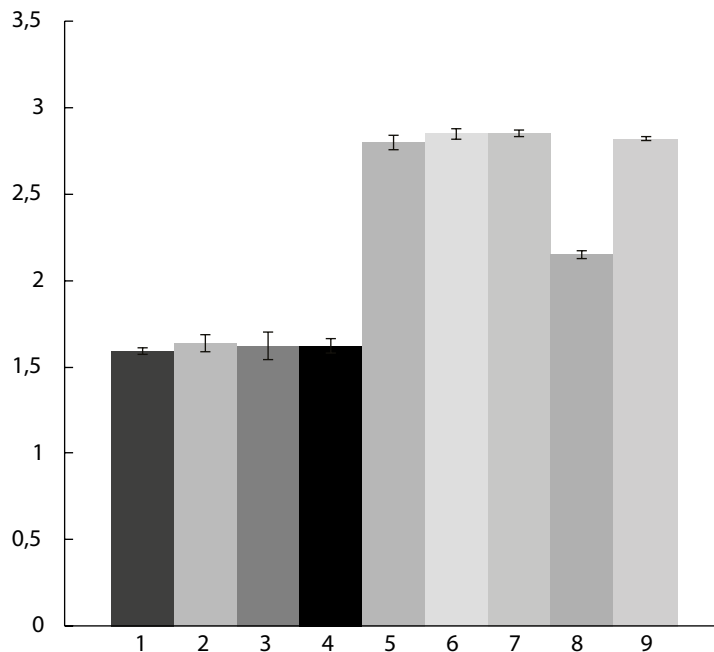


Рис. 3. Содержание КОС.

МДА и КОС достоверно ниже, чем у различных кроссов карпа.

Низкий уровень МДА и КОС свидетельствуют о более высоком содержании антиоксидантов у этих рыб и характеризуют оптимальное соотношение баланса параме-

тров прооксидантно-оксидантного статуса. Многоуровневая система антиоксидантной защиты, состоит из антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатион-s-трансферазы) и низкомолекулярных антиоксидантных

соединений (восстановленного глутатионом β -токоферолом, фенольной формой коэнзима Q₁₀, β -каротином, аскорбиновой кислоты и др.) [Меньшикова и др., 2008; Winston, 1991]. Антиоксидантной системе принадлежит важная роль в нейтрализации молекулярных механизмов, инициирующих активацию перекисеобразовательных процессов, и реализации адаптивных компенсаторных реакций в организме, поскольку компоненты этой системы участвуют в регуляции метаболических функций.

Высокие показатели МДА и КОС указывают на снижение способности антиоксидантной системы в нейтрализации активных форм кислорода. Известно, что активация ПОЛ в тканях приводит к разрушению нуклеиновых и полиненасыщенных жирных кислот клеточных мембран, повреждение ДНК и митохондрий, перекисидации липидов. Токсические продукты липоперекисидации могут стать причиной снижения содержания антиоксидантов и подавления иммунологических, регенеративных функций, преждевременного старения, снижения темпов роста, развития и жизнеспособности рыб [Барабой, 1991; Меньшикова и др., 2008; Winston, 1991; Fiho, 1996; Radi, Matkovic, 1988]. Интенсификация процессов перекисления липидов и пониженное содержание уровня антиоксидантов характерно для рыб, испытывающих состояние окислительного стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованные породы и кроссы карпов из трёх хозяйств разных зон рыбоводства различались уровнем ИК и состоянием окислительно-восстановительного баланса в сыворотке крови. На фоне высоких показателей содержания ИК у некоторых кроссов карпа отмечено повышенное содержание продуктов ПОЛ и снижение АЗ. Повышенные уровни ИК, МДА и КОС указывают на супрессию механизмов гуморального иммунитета и нарушение прооксидантно-оксидантного баланса, которые могут быть вызваны попаданием в организм антигенов или нарушением условий содержания. Полученные результаты наблюдений указывают на целесообразность дальнейших исследований возможности использо-

вания иммуно-биохимических показателей для оценки состояния здоровья рыб в условиях аквакультуры.

ЛИТЕРАТУРА

- Андрева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. 1988. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лабораторное дело. № 11. С. 41–43.
- Барабой В.А. 1991. Механизмы старения и перекисного окисления липидов // Успехи современной биологии. Т 3. Вып. 6. С. 923–931.
- Головин П.П. 2004. Проблема стресса у рыб в пресноводной аквакультуре: способы диагностики и коррекции // Сборник научных трудов. Болезни рыб. Вып. 79. М.: Компания Спутник. С. 54–61.
- Головина Н.А., Стрелков Ю.А., Воронин В.Н., Головин П.П., Евдокимова Е.Б., Юхименко Л.Н. 2003. Ихтиопатология. М.: Мир. 448 с.
- Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. 1981. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лабораторное дело. № 8. С. 493–496.
- Койко Р., Саншайн Д., Бенджамини Э. 2008. Иммунология: Уч. пособие. М.: Академия. 368 с. (Coico R., Sunshine G., Benjamini E. 2003. Immunology. A Short Course. John Wiley & Sons, Inc.).
- Логинов С.И., Смирнов П.Н., Трунов А.Н. 1999. Иммунные комплексы у животных и человека: норма и патология. РАСХН. Сиб. Отд-ние. ИЭВ-СибДВ. Новосибирск. 144 с.
- Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. Бондарь И.А., Труфакин В.А. 2008. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА. 284 с.
- Семенов В.Л., Ярош А.М. 1985. Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Украинский биохимический журнал. 57(3). С. 50–52.
- Altonen T. V., Jokinen E. I., Salo H. M., Markkula S. E., Lammi R. 2000. Modulation of immune parameters of roach, *Rutilus rutilus*, exposed to untreated ECF and TCF bleached pulp effluents // Aquat. Toxicol. V. 47. P. 277–289.
- Baumann P. C. 1998. Epizootics of cancer in fish associated with genotoxins in sediment and water // Mutation Res. V. 411. P. 227–233.
- Dethloff G. M., Bailey H. C., Maier K. J. 2001. Effects of dissolved copper on select hematological, biochemical, and immunological parameters of wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Arch. Environ. Contam. Toxicol. V. 40. P. 371–380.
- Fiho W.D. 1996. Fish antioxidant defences — A comparative approach // Brazilian J. of Medical and Biological Research. V. 29. № 12. P. 1735–1742.

- Pronina G. I.* 2013. Oxygen independent factors of cellular immunity of hydrobionts // Science, Technology and Higher Education: materials of the III international research and practice conference. Westwood, Canada. P. 96–100.
- Radi A. R., Matkovics B.* 1988. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, proteins contents and lipid peroxidation of carp tissues // Comparative Biochemistry and Physiology. V. 906. № 1. P. 69–72.
- Winston G. W.* 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Comparative Biochemistry and Physiology. V. 100. № 1–2. P. 173–176.
- REFERENCES**
- Andreva L. I., Kozhemyakin N. A., Kishkun A. A.* 1988. Modifikatsiya metodov opredeleniya perekisej lipidov v teste s tiobarbiturovoj kislotoj [Modification of methods for determining lipid peroxides in the thiobarbituric acid test] // Laboratornoe delo. № 11. S. 41–43.
- Baraboj V. A.* 1991. Mekhanizmy stareniya i perekisnogo okisleniya lipidov [Mechanisms of ageing and lipid peroxidation] // Uspekhi sovremennoj biologii. T 3. Vyp. 6. S. 923–931.
- Golovin P. P.* 2004. Problema stressa u ryb v presnovodnoj akvakul'ture: sposoby diagnostiki i korrektsii [The problem of stress in fish in freshwater aquaculture: methods of diagnosis and correction] // Sbornik nauchnyh trudov. Bolezni ryb. Vyp. 79. M.: Kompaniya Sputnik. S. 54–61.
- Golovina N. A., Strelkov Yu. A., Voronin V. N., Golovin P. P., Evdokimova E. B., Yuhimenko L. N.* 2003. Ihtiopatologiya [Ihtiopatologice]. M.: Mir. 448 s.
- Grinevich Yu. A., Alferov A. N.* 1981. Opredelenie immunnyh kompleksov v krovi onkologicheskikh bol'nyh [Determination of immune complexes in the blood of cancer patients] // Laboratornoe delo. № 8. S. 493–496.
- Loginov S. I., Smirnov P. N., Trunov A. N.* 1999. Immunnye komplekсы u zhivotnyh i cheloveka: norma i patologiya [Immune Complexes in Animals and Humans: the Norm and Pathology]. RASKHN. Sib. Otd-nie. IEHVSidV. Novosibirsk. 144 s.
- Men'shikova E. B., Zenkov N. K., Lankin V. Z., Bondar' I. A., Trufakin V. A.* 2008. Okislitel'nyj stress: patologicheskie sostoyaniya i zaboлевaniya [Oxidative Stress: Pathological Conditions and Diseases]. Novosibirsk: ARTA. 284 s.
- Semenov V. L., Yarosh A. M.* 1985. Metod opredeleniya antiokislitel'noj aktivnosti biologicheskogo materiala [Method for determination of antioxidant activity of biological material] // Ukrainskij biokhimicheskij zhurnal. 57(3). S. 50–52.
- Поступила в редакцию 20.08.2017 г.
Принята после рецензии 12.09.2017 г.*

The content of immune complexes and the level of oxidative processes in blood serum of different breeding groups of carp

G. I. Pronina¹, D. V. Mikryakov², N. I. Silkina², A. B. Petrushin¹

¹ Russian Scientific Research Institute of Irrigation Fish–breeding (FSBSI «VNIIR»), p.n. Vorovskogo, Moscow reg.

² I. D. Papanin' Institute for Biology of Inland Waters RAS (FSBSI «IBIW» RAS), Borok

Comparative study of the content of immune complexes and the level of oxidative processes in blood serum of the carp *Cyprinus carpio* from different climatic zones was made. The material for the study was two-year-olds of different breeds and crosses of carp from fish farms «Kirya» of the Chuvash Republic (the 2nd zone of fish farming), «Ergeninsky» and «Flora» of the Volgograd region (5th zone of fish farming). The studied breeds and crosses of carp differed in the level of immune complexes and the state of redox balance in the blood serum. Against the background of high indices of the immune complex content, in some carp crosses noted an increased content of lipid peroxidation products and a decrease in antioxidant protection. Elevated levels of immune complexes, malondialdehyde and substrate oxidation constant indicate the suppression of mechanisms of humoral immunity and the violation of prooxidant-oxidant balance, which can be caused by ingestion of antigens or violation of the detention conditions. The obtained results indicate the possibility of using immuno-biochemical indicators to assess the state of fish health in aquaculture.

Key words: breed and cross carp *Cyprinus carpio*, nonspecific immune complexes, lipid peroxidation, antioxidant activity.