

ВЕТЕРИНАРИЯ

УДК 59 + 577

А.Д. Кобылинская, А.В. Сахаров,
А.А. Макеев, А.Е. Просенко, Ю.В. Сафьянов

РОЛЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В МЕХАНИЗМЕ РАЗВИТИЯ ЖИРОВОЙ ДИСТРОФИИ ПЕЧЕНИ РЫБ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА ИСКУССТВЕННЫХ КОРМАХ

В статье описаны результаты морфогистохимического анализа печени сеголетков зеркального карпа, выращенных на аквакультурных предприятиях двух различных типов. В серии аквариальных экспериментов на *Barbus tetrazona* воспроизведены условия выращивания рыб при интенсивном типе аквакультуры, установлен свободнорадикальный механизм сублетальных и летальных повреждений гепатоцитов при развитии жировой дистрофии печени у рыб.

Ключевые слова: рыба, аквакультура, искусственные корма, алиментарные заболевания, диспротеинозы, печень, жировая дистрофия, активные кислородные метаболиты, свободнорадикальное повреждение клеток, окислительный стресс, антиоксиданты.

A.D. Kobylinskaya, A.V. Sakharov,
A.A. Makeyev, A.E. Prosenko, Y.V. Safyanov

THE ROLE OF FREE RADICAL LIPID PEROXIDATION IN THE DEVELOPMENT MECHANISM OF FISH LIVER FATTY DEGENERATION WHILE FARMING ON ARTIFICIAL FORAGE

The results of the morphological histochemical analysis of the mirror carp underyearling liver, grown in aquaculture facilities of two different types are described in the article. In series of aquarium experiments on *Barbus tetrazona*, the fish farming conditions in intensive aquaculture type are simulated, free-radical mechanism of the hepatic cell sublethal and lethal damage by the development of fish liver fatty degeneration is identified.

Key words: fish, aquaculture, artificial feed, nutritional diseases, disproteinosis, liver, fatty degeneration, active oxygen metabolites, cell free-radical damage, oxidation stress, antioxidants.

Рыбоводство является одной из наиболее рентабельных отраслей сельскохозяйственного производства, направленной на обеспечение потребностей населения в доступном белке [1, 4]. При увеличении масштабов управляемого воспроизводства рыбных ресурсов сбалансированное кормление и оптимизация условий содержания рыбы становятся первостепенными задачами рыбоводных предприятий. В этой связи состояние здоровья поголовья рыбы и качество комбикормов являются решающими факторами рентабельности индустриального рыбоводства [2]. Наличие требуемого количества белка в составе кормов известных зарубежных и лучших отечественных производителей не гарантирует удовлетворение потребностей организма рыб в протеине. В результате технологических процессов действие физических факторов на белковый компонент кормов при их приготовлении вызывает глубокие изменения структуры нативного протеина, что снижает его доступность для пищеварительных ферментов *in vivo* и приводит к развитию алиментарных заболеваний [5]. Задержка роста, ожирение, повышение уровня пероксидации и ослабление естественной резистентности являются признаками диспротеинозов у рыб при их выращивании в условиях аквакультуры с использованием искусственных кормов [3, 6]. Высокая плотность посадки, колебания кислородного режима воды, слабая проточность и высокая концентрация продуктов метаболизма в воде обуславливают напряжение адаптационных механизмов, что сопровождается развитием неспецифической ответной реакции организма рыб в форме окислительного стресса. При этом свободнорадикальные механизмы повреждения клеток органов пищеварительной системы рыб остаются наименее изученными.

По данным литературного анализа, антиоксидантные соединения вводятся в рецептуру кормов преимущественно для предупреждения окисления входящих в его состав липидов [2,6]. Сведения по применению антиоксидантных соединений для оптимизации физиологических процессов рыб с целью профилактики алиментарных заболеваний фрагментарны и представлены крайне недостаточно.

Цель исследования – изучить влияние свободнорадикального перекисного окисления липидов на развитие жировой дистрофии печени рыб при выращивании на искусственных кормах.

Материал и методы исследования. Исследования проводились на базе ООО «Беловское рыбное хозяйство» Кемеровской области и ООО «Маяк» Алтайского края, специализированных на разведении различных видов рыб в аквакультуре, в том числе карповых.

Для оценки морфофункционального состояния органов пищеварительной системы у сеголетков карпа в возрасте 1 месяц (n=25) и 6 месяцев (n=25), выращенных в Беловском рыбном хозяйстве на искусственных кормах, и образцов из ООО «Маяк», выращенных в выростных прудах на естественных кормах, забирали печень и все отделы кишечника. Образцы тканей данных органов фиксировали в 10 % буферном растворе формалина по стандартной методике. Обзорные препараты окрашивали гематоксилином Бемера и эозином. Кислые гликозаминогликаны (ГАГ) выявляли реакцией с альциановым синим. Уточнение причинно-следственных связей между развитием жировой дистрофии при кормлении искусственными кормами и свободнорадикальным перекисным окислением липидов (СПОЛ), а также оценку возможности управления оксидативными процессами в организме рыб за счет использования антиоксиданта «Тиофан» осуществляли в серии аквариальных экспериментов на *Barbus tetrazona*. Согласно протоколу эксперимента было создано две группы животных: контрольная (n=50) и опытная (n=50). Рыбы обеих групп содержались в стандартных условиях – аквариум объемом 50 л с возможностью поддержания уровня кислорода на уровне до 5 мг/л и температуры воды 26° С. Кислородный режим в выростных аквариумах обеспечивался при помощи двух фильтров эрлифтной системы. Подмена воды в рабочих емкостях производилась полуавтоматическим путем: слив через общий шланг, а заливка – через дегазатор при помощи насоса и шланга. Подмена воды осуществлялась один раз в 10 дней в объеме 30% от общего объема аквариума. Кормление рыб обеих групп осуществлялось гранулированным стартовым кормом для карпов «AQUAREX» три раза в день. Суточная норма потребления корма составляла 3% от массы тела рыбы. Животным опытной группы в состав корма вводили антиоксидант «Тиофан» в дозе 100 мг/кг массы тела рыбы. Животных обеих групп по 25 особей в каждой выводили из эксперимента на 30 и 60 сутки. На гистологических препаратах исследовали состояние печени и кишечника. В объединенных гомогенатах печени и кишечника определяли содержание белка по Лоури, активность ферментов антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и содержание продуктов свободнорадикального перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК). Морфометрические параметры рыб оценивали по методике Правдина (Правдин, 1966).

Результаты исследования и их обсуждение. Исследование гистологических препаратов гепатопанкреаса беловского зеркального карпа позволило выявить наличие дегенеративных изменений печени у сеголетков на всех сроках отбора проб (1 и 6 месяцев). Различия касались лишь степени развития жировой дистрофии. Для образцов печени сеголетков месячного возраста характерным признаком являлась локализация мелких липидных капель в гепатоцитах преимущественно интермедиарной и центрлобулярной зон дольки печени (рис. 1, А). У 6-месячных сеголетков крупнокапельная жировая дистрофия затрагивала все зоны дольки печени, что характеризуется как крайне выраженная степень стеатоза (рис. 1, Б).

Степень выраженности жировой дистрофии в динамике возрастного развития рыб от 1 до 6 месяцев, а также топография сублетальных изменений клеток печени в различных долях органа указывают на прогрессирующее повреждение гепатоцитов. Важно отметить, что развитие дистрофических изменений происходит в направлении от центрлобулярной зоны, клетки которой эволюционно приспособлены для детоксикации и синтеза ферментов антиоксидантной защиты, прогрессирует в направлении к перипортальной зоне на более поздних сроках развития. В соответствии с принципами классической патоморфологии данные изменения объясняются с позиции свободнорадикального механизма повреждения клеток. Это явилось основанием для проверки данного утверждения в модельных аквариальных экспериментах на *Barbus tetrazona*.

У рыб обеих групп через месяц наблюдения в печени обнаружены признаки стеатоза. Вместе с тем, у рыб контрольной группы степень жировой дистрофии имеет более выраженный характер по сравнению с опытной (рис. 1, В, Г).

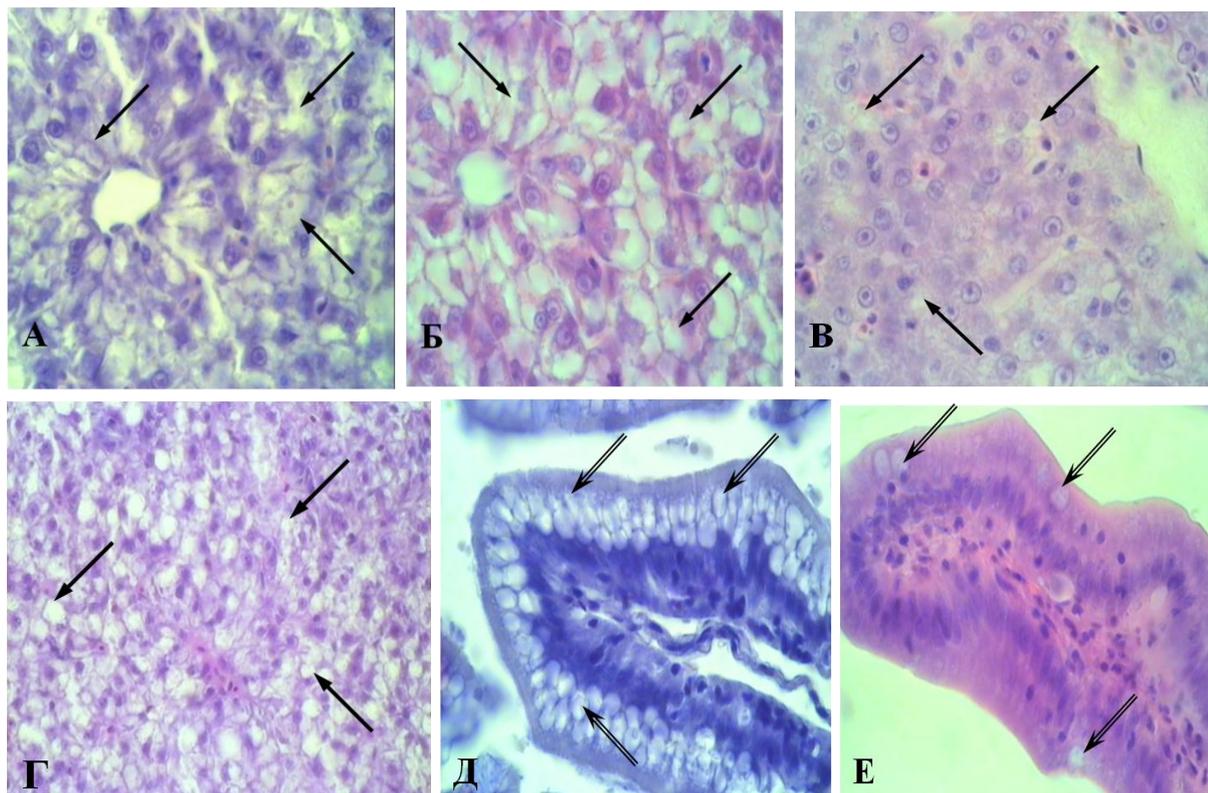
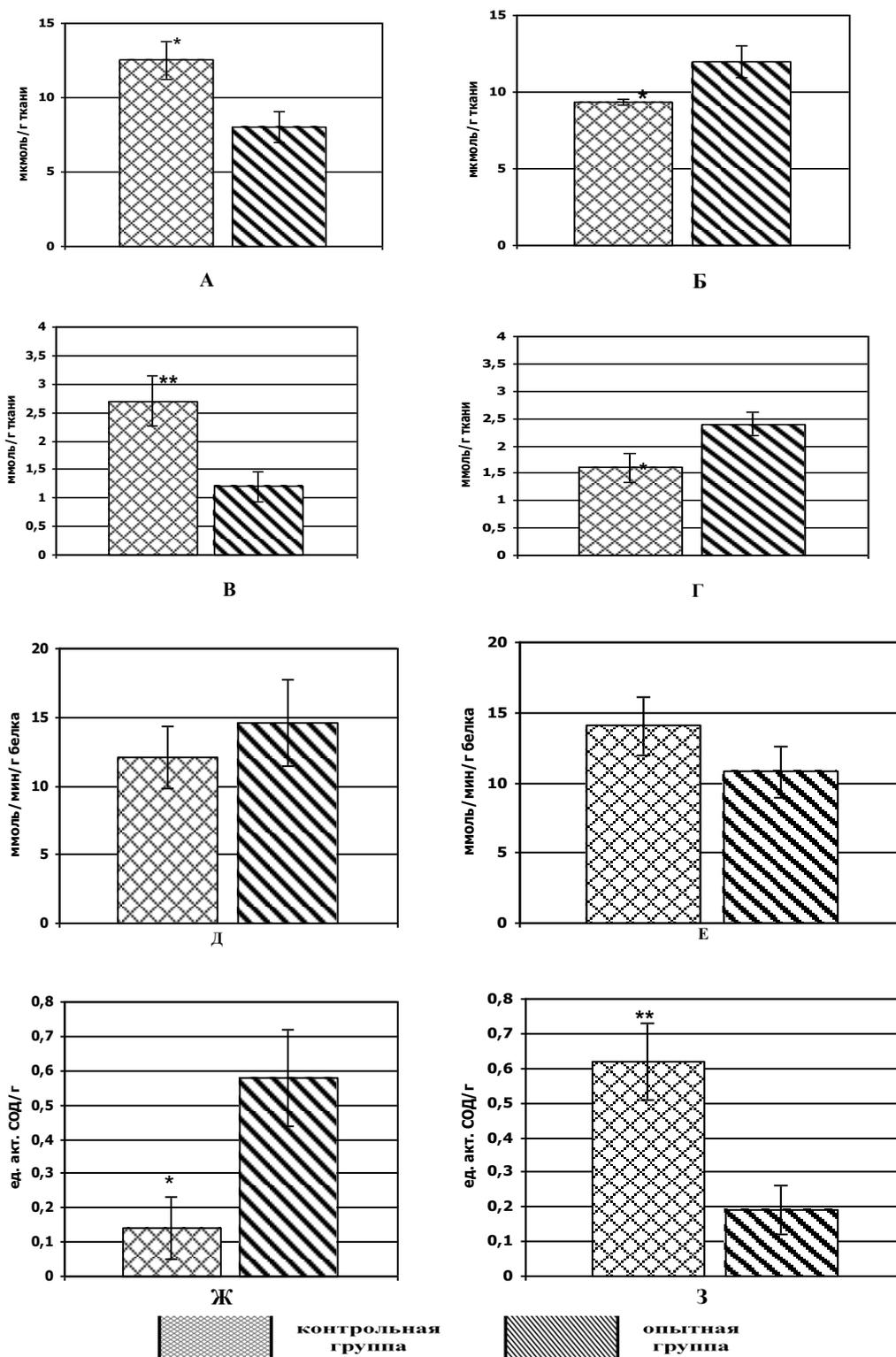


Рис. 1. Образцы печени и кишечника рыб: А – печень сеголетка беловского зеркального карпа на сроке 1 месяц после начала кормления; Б – срок 6 месяцев кормления искусственными кормами. Гематоксилин и эозин. Ув. 1000 х.; В – печень *Barbus tetrazona* опытной группы на сроке 30 суток наблюдения. Ув. 400 х.; Г – печень *Barbus tetrazona* контрольной группы на сроке 30 суток наблюдения. Ув. 200 х. Гематоксилин и эозин; Д – средний отдел кишечника *Barbus tetrazona* опытной группы на 30 сутки эксперимента. Альциановый синий; Е – средний отдел кишечника *Barbus tetrazona* контрольной группы на 30 сутки эксперимента. Ув. 400 х. Гематоксилин и эозин. Темными стрелками обозначены липидные капли в гепатоцитах, двойными стрелками – транспортные вакуоли эпителиоцитов

На связь развития жировой дистрофии гепатоцитов с окислительным стрессом указывают результаты биохимического анализа образцов гепатопанкреаса и кишечника *Barbus tetrazona*. Через месяц кормления искусственными кормами уровень МДА и ДК у рыб контрольной группы на 62 и 44% соответственно превышает аналогичные показатели рыб опытной группы (рис. 2, А, В). Активность СОД в контрольных образцах имела статистически достоверный низкий показатель по сравнению с опытными (рис. 2, Ж). Активность КАТ в тканях контрольной и опытной групп на всех сроках отбора проб достоверных различий не имеет (рис. 2, Д, Е).

Результаты исследования показали, что у рыб опытной группы клетки эпителия переднего и среднего отделов кишечника имеют признаки высокой функциональной активности. Об этом свидетельствует хорошо развитая щеточная каемка на апикальном полюсе эпителиоцитов, которая интенсивно окрашивается альциановым синим. Известно, что ее ультраструктурным эквивалентом являются микроворсинки, обеспечивающие процессы премебранного пищеварения. В цитоплазме клетки определяются многочисленные различного размера вакуоли, заполненные гомогенным содержимым (рис. 1, Д). С нашей точки зрения, данные структуры являются транспортными вакуолями и отражают интенсивные процессы трансмембранного переноса органических соединений из полости кишечника в цитоплазму эпителиоцитов.



Примечание: статистически достоверные различия между контрольной и опытной группами (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$)

Рис. 2. Показатели уровня свободнорадикального перекисного окисления липидов и активности системы антиоксидантной защиты у *Varbus tetrazona*: А – содержание МДА в гомогенатах печени и кишечника на сроке 30 суток наблюдения; Б – содержание МДА на сроке 60 суток наблюдения; В – содержание ДК на сроке 30 суток эксперимента; Г – содержание ДК на сроке 60 суток эксперимента; Д – активность каталазы на сроке 30 суток эксперимента; Е – активность каталазы на сроке 60 суток эксперимента; Ж – активность супероксиддисмутазы на сроке 30 суток эксперимента; З – активность супероксиддисмутазы на сроке 60 суток эксперимента

Комплексный подход к оценке состояния органов желудочно-кишечного тракта *Barbus tetrazona* позволил сделать заключение о влиянии окислительного стресса на снижение функциональной активности кишечника контрольной группы по сравнению с опытной (рис. 1, Е). Можно считать, что свободнорадикальное повреждение плазматической мембраны и мембранных органелл эпителиоцитов лимитирует синтез пищеварительных ферментов и снижает трансмембранный перенос органических элементов корма через эпителий кишечника в кровь и лимфу.

При этом данные морфометрического анализа показали, что линейные размеры и масса животных опытной группы через один месяц наблюдения статистически достоверно превышают аналогичные показатели рыб контрольной группы (табл.).

Морфометрические параметры экспериментальных животных

| Показатель | 1-й месяц | | 2-й месяц | |
|----------------|------------|-------------|-----------|-----------|
| | Контроль | Опыт | Контроль | Опыт |
| Длина общая | 2,41±0,13 | 3,08±0,16* | 3,40±0,95 | 2,94±0,43 |
| Длина туловища | 1,70±0,09 | 2,23±0,14* | 2,62±0,73 | 2,34±0,64 |
| Длина головы | 0,50±0,06 | 0,63±0,03 | 0,77±0,09 | 0,67±0,03 |
| Высота тела | 0,79±0,05 | 1,27±0,18* | 1,55±0,27 | 1,30±0,11 |
| Масса тела | 0,350±0,04 | 0,818±0,18* | 0,84±0,12 | 0,74±0,07 |

Примечание: достоверные различия по сравнению с контролем (* $p < 0,05$).

Как известно, увеличение линейных размеров во многом определяется интенсивностью пищеварения. Однако через 2 месяца после начала эксперимента исследуемые показатели рыб опытной группы хотя и не имеют достоверных различий с контролем, но достаточно четко прослеживается тенденция к их снижению по сравнению с контрольными животными (см. табл.). Данное противоречие потребовало проведения исследования функционального состояния системы антиоксидантной защиты и уровня СПОЛ в гомогенатах кишечника и печени, а также оценки морфофункционального состояния всех отделов кишечника и печени. Исследованиями установлено, что уровень содержания МДА и ДК в гомогенатах печени и кишечника животных опытной группы достоверно превышает аналогичные показатели контрольной группы (рис. 2, Б, Г). Уровень активность СОД в контрольных образцах на 68% выше, чем в опытных (рис. 2, И).

С нашей точки зрения, жировая дистрофия печени у рыб опытной группы на сроке 2 месяцев наблюдения может являться не только следствием свободнорадикального повреждения гепатоцитов, но и недостатком поступающих в клетку белков, осуществляющих транспорт жирных кислот из клеток эпителия кишечника в кровь и лимфу. Результатом чего является низкое усвоение белков и как следствие развивается дефицит протеина, используемого для увеличения линейных размеров и массы тела. При этом на светооптическом уровне признаки высокой функциональной активности кишечника у рыб контрольной группы более выражены, чем в опытных образцах, а степень жировой дистрофии печени у рыб опытной группы характеризуется более низкими показателями по сравнению с контролем.

Полученные результаты позволяют считать, что при моделировании условий содержания рыб в условиях индустриального комплекса приводит к развитию окислительного стресса и повреждению АКМ клеток печени, кишечника и угнетению роста рыб. Использование антиоксиданта «Тиофан» в течение одного месяца наблюдения за счет ограничения развития окислительного стресса и защиты эпителиальных клеток от повреждения АКМ оптимизирует процессы пищеварения и способствует увеличению темпов роста осевого скелета на 60,10 %, а массы тела на 60,15 % по сравнению с контролем. При равном содержании общего белка в тканях рыб обеих групп, но увеличении осевого скелета и массы тела рыб опытной группы, становится очевидным, что под влиянием «Тиофан» интенсивность пищеварения и высокий уровень транспорта из кишечника органических соединений используется на обеспечение пластических процессов. Через 2 месяца наблюдения при высокой напряженности метаболических процессов у животных опытной группы белка в составе корма оказывается недостаточно для сохранения высоких темпов роста. С нашей точки зрения, при повышенном уровне метаболизма рыб требуется более высокий уровень обеспечения этих процессов протеином. При низкой биодоступности белка в искусственных кормах его оказывается крайне недостаточно, что приводит к дефициту белковых транспортеров липидов из печени и, как следствие, избыточному накоплению жирных кислот в гепатоцитах и развитию жировой дистрофии. Кроме развития стеатоза, избыток жирных кислот в клетках печени обуславливает их вовлечение в свободнорадикальный процесс, что приво-

дит к повреждению клеток печени АКМ. Этот вывод убедительно доказывается результатами проведенных биохимических и морфологических исследований. Главным выводом исследования является положение о необходимости использования антиоксидантной защиты для повышения темпов роста при условии дополнительного введения биодоступного протеина в состав корма рыб. В этой связи для индустриального рыбоводства рекомендуется сочетание кормления рыб искусственными кормами с обязательным использованием нативного протеина, например, мясного фарша или культур беспозвоночных животных.

В исследуемых образцах печени сеголеток карпа, выращенного в условиях аквакультуры ООО «Маяк» на естественных кормах с высоким содержанием протеина в составе зоопланктона, признаков жировой дистрофии печени в точках отбора проб 1 и 6 месяцев не наблюдалось.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют считать, что недостаток протеинов в искусственных кормах либо снижение его биодоступности в результате издержек при его производстве определяют развитие стеатоза и снижение темпов роста рыб при разведении в аквакультуре и кормлении искусственными кормами.

Литература

1. *Грейнджер Р.* Рыбохозяйственные ресурсы: тенденции в производстве, использовании и торговле // Состояние мирового рыболовства и аквакультуры. Ч.1. Мировой обзор рыболовства и аквакультуры. – 2010. – С. 3–14.
2. *Желтов Ю.А.* Рецепты комбикормов для выращивания рыб разных видов и возрастов в промышленном рыбоводстве. – Киев: ИНКОС, 2006. – 154 с.
3. *Желтов Ю.А., Алексеенко А.А.* Кормление племенных карпов разных возрастов в прудовых хозяйствах. – Киев: ИНКОС, 2006. – 169 с.
4. *Ильясов С.В.* Значение рыбного хозяйства // Право и безопасность. – 2004. – № 4(13).
5. *Мирзоева Л.М.* Болезни рыб при индустриальном выращивании. Обзорная информация // Болезни гидробионтов в аквакультуре. – М.: ЦНИИТЭИРХ, 2000. – Вып. 1. – С. 1–60.
6. *Скляров В.Я.* Корма и кормление рыб в аквакультуре. – М.: Изд-во ВНИРО, 2008. – 150 с.

