

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ  
Научный Совет по проблемам гидробиологии и ихтиологии РАН  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
Межведомственная ихтиологическая комиссия  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства  
и океанографии

# **ПРОБЛЕМЫ ПАТОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ И ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ РЫБ И ДРУГИХ ГИДРОБИОНТОВ**

*Расширенные материалы  
IV Международной конференции*

БОРОК – МОСКВА  
2015

УДК [597.08:612.017] (063)  
ББК 28.082я431+28.67я431  
П 78

**Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов** : расширенные материалы IV Международной конференции, Борок, 24 – 27 сентября 2015 года / РАН, Федер. агентство науч. орг. России, ФГБУН Ин-т биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН ; [под ред. В. Р. Микрякова, Е. А. Криксунова, Д. В. Микрякова] ; отв. за вып. Д. С. Павлов [и др.]. – Ярославль : Филигрань, 2015. – 588 с.

Печатается по решению Оргкомитета Международной научной конференции.

Рассматриваются вопросы эволюционной, экологической, инфекционной, инвазионной патологии и иммунологии. Дается характеристика последствий антропогенного загрязнения водных экосистем, транспортного, токсического стрессов, условий содержания в аквакультурах на иммунологические, биохимические, генетические механизмы адаптации к паразитам, характер проявления патологических, эпизоотических процессов. Предлагаются новые подходы управления состоянием здоровья гидробионтов и иммунитетом рыб, основанные на использовании специфических и неспецифических иммуномодуляторов, гормональных препаратов и создании благоприятных для роста и развития экологических условий. Приводятся данные о возможности использования морфопатологических, биохимических, иммунологических, паразитологических показателей при оценке здоровья гидробионтов, обитающих в морских и пресноводных экосистемах и условиях аквакультуры.

Тематика представленных сообщений разнообразна и будет интересна биологам, ихтиопатолам, иммунологам, паразитологам, экологам, токсикологам, рыбоведам, практическим работникам по разведению гидробионтов, специалистам, занимающимся вопросами охраны природы, борьбы с болезнями и преподавателям ВУЗов.

*Ответственные за выпуск: академик РАН Д.С. Павлов;*

*чл.-корреспондент РАН Е.А. Криксунов;*

*д.б.н., проф. М.К. Глубоковский;*

*д.б.н., проф. В.Р. Микряков.*

За достоверность представленных к публикации материалов ответственность несут авторы.

**ISBN 978-5-906682-37-6**

©Федеральное агентство научных организаций, 2015

©ФГБУН Институт биологии внутренних вод РАН, 2015

©ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, 2015

**Problems of immunology, pathology and fish health protection.** Enlarged materials of IV International conference, Borok, 24 – 27 September 2015 / RAN, Federal agency of the scientific organizations, Institute for Biology of Inland Waters, Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography ; [Under the edited V. R. Mikryakov, E. A. Kriksunov, D. V. Mikryakov] ; Responsible for issue D.S. Pavlov [et al.]. – Yaroslavl : Filigran, 2015. – 588 p.

Questions of evolutionary, ecological, infectious, invasion pathology and immunology are considered. Characteristic is given of the effects of anthropogenic pollution of aquatic ecosystems, of transport, toxic stresses, and aquaculture conditions on immunological, biochemical, genetic mechanisms of adaptation, growth rates, development, survival, pathological and epizootic processes. New approaches for the control of hydrobiont health and fish immunity based on specific and non-specific immunomodulators, hormonal preparations and ecological conditions favorable for growth and development are suggested. Data on the use of morphopathological, biochemical, immunological and parasitological indices for assesment of aquatic organisms inhabiting marine and freshwater ecosystems as well as in aquaculture are presented.

The themes of presented works are diverse and will be of interest to biologists, ichthyopathologists, immunologists, parasitologists, ecologists, toxicologists, pisciculturists, aquatic organism breeders, specialists in the field of environmental protection and health control and lecturers at institutes of higher education.

*Editorial Board: Academician RAN D.S. Pavlov*

*Corresponding member RAN E.A. Kriksunov*

*Doctor of Biological Sciences, Prof. M. K. Glubokovski;*

*Doctor of Biological Sciences, Prof. V. R. Mikryakov;*

Authors of the corresponding materials are responsible for reliability of the data presented in these collected articles.

**ISBN 978-5-906682-37-6**

**УДК [597.08:612.017] (063)**

**ББК 28.082я431+28.67я431**

Книга печатается по решению Ученого совета ИБВВ РАН протокол № 9 от 04.08.2015 г.

*Издание осуществлено при финансовой поддержке ФАНО, ФГБНУ ВНИРО*

## Предисловие

В связи с усилением влияния хозяйственной деятельности человека на водные экосистемы вследствие поступления в водоемы поллютантов, нарушения газового, температурного режимов, скопления метаболитов, продуктов разложения органики, интенсификации процессов выращивания в рыбоводных предприятиях и т.д., нарушаются экологические условия, обеспечивающие оптимальный рост, развитие и выживаемость рыб, вследствие поступления в водоемы поллютантов, нарушения газового, температурного режимов, скопления метаболитов, продуктов разложения органики, интенсификации процессов выращивания в рыбоводных предприятиях и т.д., что становится причиной массовых заболеваний и гибели рыб (Бауэр и др., 1981; Канаев, 1983; Наумова, Ройтман, 1989; Боговский, 1997; Наумова и др. 1997, 2003; Шестаковская и др. 1997, 2003; Стрелков, 1997; Яременко и др., 1997, 2003; Головина и др., 1997, 2003; Грищенко, Акбаев, 2013; Кашулин и др. 1999; Решетников и др., 1999; Сапожников, 2001; Наумова, 2003; Размашкин и др., 2003 и многие другие).

Болезни являются внешним проявлением последствий нарушения функций иммунитета и общей резистентности (адаптивного потенциала), вызванных влиянием неблагоприятных факторов среды на состояние здоровья рыб, и отражением патологических процессов на молекулярном, клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях, возникающих в ответ на воздействие патогенных организмов, токсикантов и ухудшения условий среды обитания.

Охрана здоровья рыб и других гидробионтов на современном этапе развития аквакультуры – актуальная многоплановая проблема, которая связана с управлением биоресурсами в морских и пресноводных экосистемах в естественных и искусственных условиях их воспроизводства. Решение этих задач требует всестороннего изучения и привлечения широкого круга специалистов: ихтиопатологов, гидробиологов, паразитологов, генетиков, микробиологов, биохимиков, физиологов, иммунологов, токсикологов, рыбоводов и т.д.

Исходя из этого и стоящих перед рыбохозяйственной практикой задач научного обеспечения проблемы охраны здоровья рыб и других гидробионтов и повышения их продуктивности на современном этапе развития аква- и марикультуры, решением ФАНО, бюро отделения биологии РАН, Межведомственной ихтиологической комиссией совместно с ВНИРО решено провести Международную конференцию по проблемам патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов на базе лаборатории иммунологии ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН.

На конференции представлен широкий круг актуальных проблем иммунологии и патологии гидробионтов, направленных на охрану их здоровья, управление биологической продуктивностью, обеспечение оптимального роста, развития и определение роли иммунологических механизмов в реализации процессов адаптации к повреждающим факторам (паразитам, ксенобиотикам) в



антропогенно-трансформированных естественных экосистемах и при воспроизводстве их в условиях аквакультуры.

В сборник включены 93 научных сообщения. Авторами статей являются исследователи ведущих научных центров Российской академии наук, высших учебных заведений, отраслевых рыбохозяйственных и ветеринарных институтов не только Российской Федерации, но и Армении, Азербайджана, Украины, Польши, Вьетнама, Бельгии, США. В представленных материалах рассматриваются эволюционные, экологические, генетические, физиолого-биохимические, инфекционные, инвазионные, токсикологические и алиментарные аспекты патологии и иммунологии; вопросы оценки качества среды обитания, основанные на данных анализа морфопатологических, иммунологических, биохимических, физиологических, микробиологических, паразитологических показателей гидробионтов, обитающих в антропогенно-трансформированных, техногенно-загрязненных пресноводных и морских естественных экосистемах и в условиях их искусственного воспроизводства; вопросы управления охраной здоровья водных животных путем воздействия на структурно-функциональное состояние иммунной системы специфическими и неспецифическими иммуностимуляторами, использования лекарственных препаратов, пробиотиков, кормления их доброкачественными кормами и создания экологически безопасных условий среды обитания для обеспечения оптимального роста, развития и сохранения индивидуальной целостности объектов аквакультуры на всех этапах их онтогенеза.

В соответствии с основными направлениями научной программы, вынесенными для обсуждения на конференции, в сборнике представлены расширенные материалы, посвященные актуальным вопросам общей и частной иммунологии и патологии; иммунитету рыб и других гидробионтов к паразитам; иммунологическим механизмам адаптации к абиотическим факторам; проблемам охраны здоровья объектов аквакультуры; оценке состояния здоровья особи, популяций и экосистем.

В заключение следует отметить, что материалы исследований будут интересны для широкого круга специалистов, занимающихся разработкой фундаментальных и научно-практических проблем патологии, иммунологии, охраны здоровья и борьбы с болезнями водных животных при воспроизводстве в естественных и искусственных условиях выращивания.

Академик Д.С. Павлов  
Чл.-корр. Е.А. Криксунов  
Д.б.н. М.К. Глубоковский  
Д.б.н. В.Р. Микряков

# ПЛЕНАРНАЯ СЕКЦИЯ

## СПЕЦИФИЧНОСТЬ МИКСОСПОРИДИЙ ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ ЕВРАЗИИ

В.Н. Воронин<sup>1</sup>, А.С. Дудин<sup>2</sup>, М.Д.-Д. Батуева<sup>3</sup>, J.Y. Zhang<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Санкт-Петербургская Государственная Академия Ветеринарной  
медицины,*

*196084, Санкт-Петербург, Черниговская д. 5, Россия, e-mail:*

*[vnvoronin@mail.ru](mailto:vnvoronin@mail.ru)*

<sup>2</sup>*Государственный научно-исследовательский институт озерного  
и речного рыбного хозяйства, 199053, Санкт-Петербург,  
наб. Макарова д.26, Россия,*

<sup>3</sup>*Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН,  
670047, г. Улан-Удэ, Сахьяновой д. 6, Россия,*

<sup>4</sup>*Institute of Hydrobiology, Academy of Sciences, Wuhan, 430072,  
Hubei, China*

Миксоспоридии представляют большую и специализированную группу паразитов рыб в ранге типа Мухозоа. Из-за их широкого распространения и высокой патогенности они активно изучались многими исследователями начиная с конца XIX века. В основу системы миксоспоридий положены особенности строения (архитектоника) спор, а также число и расположение заключённых в них полярных капсул. Видовыми признаками являются форма и размерные значения длины и ширины споры и полярных капсул. У большинства видов споры имеют размер порядка 12 микрон, что позволило проводить описание миксоспоридий с использованием лишь световой микроскопии. Многочисленные фаунистические исследования миксоспоридий, выполненные отечественными учёными были обобщены и опубликованы в 1962 и в 1984 годах в «Определителях паразитов пресноводных рыб», что стало большим событием, как для отечественной, так и зарубежной ихтиопаразитологии. Несмотря на кажущуюся в целом завершённость фаунистических исследований миксоспоридий,

остался и ряд вопросов, в первую очередь об их гостальной и тканевой специфичности. Подобные вопросы особенно часто возникают при попытках видовой идентификации многочисленных (около 900 видов) представителей рода *Muxobolus*. Для отдельных его видов число зарегистрированных хозяев превысило два-три десятка при различной тканевой локализации. В результате сложилась тупиковая ситуация, когда, вне зависимости от систематического положения хозяина и локализации, обнаруженный в рыбе паразит должен быть отнесён к ранее описанному виду в случае совпадения морфометрических признаков спор. При этом, учитывая ранее выявленную внутривидовую изменчивость в строении спор, для разных хозяев также допускаются небольшие отклонения в размерах спор и полярных капсул по сравнению с первоописанием. Экспериментальные исследования по искусственному заражению, которые могли бы прояснить ситуацию о специфичности микроспоридий, были немногочисленны и противоречивы. Не случайно предположение о сборном характере многих массовых видов, в первую очередь *Muxobolus muelleri* Butschli, 1882, сделанное ещё В.А. Догелем (Догель, 1932), оставалось без ответа. Сходная ситуация, когда при определении видовой принадлежности микроспоридий за основу брались только морфометрические признаки спор, а систематическое положение хозяев игнорировалось, была характерна и для китайских исследователей. Они смогли найти большинство ранее описанных в Европе видов микроспоридий также и в китайских рыбах. Например, специфичный для щуки *Muxidium lieberkuehni* отмечен для четырех, а *Muxobolus macrocapsularis* из густеры – для восьми видов китайских карповых рыб (Chen, Ma, 1998). Таким образом, к концу XX века потенциал традиционного, морфометрического подхода в изучении микроспоридий, особенно представителей рода *Muxobolus*, был не только исчерпан, но в целом показал свою несостоятельность.

Одновременно с конца двадцатого столетия начался новый и многосторонний этап в изучении микроспоридий, который, к сожалению, протекает без активного участия отечественных учёных. Сенсационное открытие сложного, диксенного

жизненного цикла у микоспоридий со временем было подтверждено последующими многочисленными исследованиями. Участие в жизненном цикле микоспоридий различных беспозвоночных (олигохет, полихет, мшанок) не только в корне изменило старое представление о биологии этих паразитов, но и привело к пересмотру их макросистемы. За прошедшие три десятилетия выполнены многочисленные эксперименты по выявлению и описанию актиноспорейной фазы развития в беспозвоночных. Подобные исследования начаты и в России (Дудин, Воронин, 2010; Воронин, Дудин, 2012). Зарубежными учёными также была доказана строгая тканевая локализация микоспоридий, особенно паразитирующих в жабрах (Molnar, 2002). Необходимость детального описания плазмодия (цисты), его расположения, размера и формы, типа и характера поражаемой ткани, органа или клеток посредством гистологических исследований стали обязательным условием при описании микоспоридий и важными диагностическими признаками видового уровня. Настоящую революцию в биологии, в том числе и в микоспоридиологии, произвело внедрение молекулярно-филогенетического метода исследований (Ezsterbauer, 2004; Molnar et al., 2006, 2011). В результате многочисленных работ было показано, что, несмотря на внешнее сходство спор, микоспоридии выделенные из систематически разных хозяев, достоверно различаются филогенетически. Это безусловно позволяет считать их новыми, валидными видами. Применение комплексного диагностического метода, включающего традиционное морфометрическое описание спор, в сочетании с гистологическим и молекулярно-филогенетическим, стало основой для критического пересмотра ранее описанной фауны микоспоридий. Например, только из хорошо изученной ранее плотвы сразу было описано 3 новых вида микоспоридий рода *Muxobolus*, причём для всех был характерен разный гистотропизм при значительном сходстве в строении спор (Molnar et al., 2010). Два из ранее описанных венгерскими учёными новых видов (*M. fundamentalis* и *M. feisti*) также были найдены в плотве из водоёмов Ленинградской области при полном сходстве, как в морфометрии спор, так и в локализации паразитов (Воронин,

Дудин, 2012). В литературе также приведены сведения, когда внешне одинаковые по локализации, строению плазмодиев и спор, но развивающиеся в разных хозяевах одного семейства, виды рода *Myxobolus* оказались генетически разными и были признаны новыми (Molnar et al., 2014). Не случайно, что именно с развитием молекулярных исследований за период с 2005 по 2013 год в мире было описано 112 номинальных видов только одного рода *Myxobolus*, и для почти половины из них изучены нуклеотидные последовательности с их включением в генбанк (Eiras et al., 2014).

В этих условиях представляется весьма актуальным начать в России широкомасштабные исследования фауны миксоспоридий, но уже на базе современного комплексного подхода, включающего в себя традиционные морфологический и гистологический методы, а также молекулярно-биологический с расшифровкой жизненного цикла. В России подобные работы ещё только начинаются (Batueva et al., 2013). Важность и необходимость в проведение подобных исследованиях именно в России объясняется тем, что в нашей стране было описано много видов миксоспоридий с указанием типового хозяина и водоёма. Отбор образцов этих видов для молекулярных исследований из других видов рыб и водоёмов некорректен и может привести к последующему накоплению в Генбанке недостоверных сведений.

Таким образом, за последние годы появилось много данных свидетельствующих о строгой гостальной и тканевой специфичности у миксоспоридий, особенно рода *Myxobolus*, которые были подтверждены на молекулярно-генетическом уровне. Это является основанием для переописания видов миксоспоридий, особенно с широким кругом хозяев, на основании современного, комплексного диагностического подхода.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-91176 ГФЕН\_а.  
Список литературы

Воронин В.Н., Дудин А.С. 2012. О методиках изучения актиноспорейной фазы развития миксоспоридий. Паразитология, 46. (6): 493-499.

Воронин В.Н., Дудин А.С. 2012. О необходимости ревизии фауны миксоспоридий рыб России // Современные проблемы общей паразитологии. Мат. Межд. научн. Конференции. М.: 69-72.

Догель В.А. 1932. Пресноводные Мухосporidia СССР // Определители организмов пресных вод СССР, 4, Ленснабтехиздат. Л.: 1-70.

Дудин А.С., Воронин В.Н. 2010. Распространение актиноспорейной фазы развития микоспоридий в водоемах разных регионов России // Теоретические и практические проблемы паразитологии. Мат. Межд. научн. конференции, М.: 127-131.

Batueva, M.D-D., Katokhin A.V., Pronina S.V., Pronin N.M. 2013. Supplementary studies and molecular data on *Henneguya cerebralis* Pronin, 1972.

(Мухозоа: Мухоспореа), a parasite from Kosogol grayling *Thymallus arcticus nigrescens* in Mongolia // Parasitology International. 62 (6): 530-534.

Chen Q.L., Ma C.L. 1998 Мухозоа: Мухоспореа // Fauna Sinica, Beijing, Science Press, P. 528 (на китайском).

Eiras J.C, Molnar K, Lu Y.S. 2014. Synopsis of the species of *Myxobolus* Butschli, 1882 (Мухозоа: Мухоспореа: Мухобolidae) // Systematic parasitology. vol. 61 №1. P. 1-46.

Eszterbauer E 2004. Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus* species (Мухоспореа) of cyprinids: molecular evidence of importance of tissue-specificity // Dis Aquat Org. vol. 58, № 6. P. 35-40.

Molnár K. 2002. Site preference of fish myxosporeans in the gill // Dis Aquat Org. vol. 48. P. 197–207.

Molnár K, Marton S, Eszterbauer E, Székely C. 2006. Comparative morphological and molecular studies on *Myxobolus* spp. infecting chub from the River Danube, Hungary, and description of *M. muellericus* sp. n. // Diseases of aquatic organisms vol. 73. № 13. P. 49-61.

Molnar K, Cech G, Szekely C. 2011. Histological and molecular studies of species of *Myxobolus* Butschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea) in the gills of *Abramis*, *Blicca* and *Vimba* spp. (Cyprinidae), with the redescription of *M. macrocapsularis* Reuss, 1906 and *M. bliccae* Donec & Tozzyakova, 1984 // Systematic parasitology. vol. 79. № 2. P. 109-121.

Molnar K, Marton S, Szekely C, Eszterbauer E. 2010. Differentiation of *Myxobolus* spp. (Myxozoa: Myxobolidae) infecting roach (*Rutilus rutilus*) in Hungary // Parasitol Res. vol. 107. № 5. P. 1137-1150.

Molnar K, Szekely C., Guti C.F., Eszterbauer E. 2014. Two new *Myxobolus* spp. (Myxozoa: Myxobolidae) from white bream, *Blicca bjoerkna* (Linnaeus, 1758) developing in basifilamental location of gills // Acta Protozoologica. vol. 53. P. 277-285.

## **A SPECIFICITY OF MYXOSPOREANS FROM FRESHWATER FISH OF EURASIA**

V.N. Voronin, A.S. Dudin, M.D. Batueva, J.Y. Zhang.

In contrast to older data, the strong of host and tissue specificity of myxosporeans from freshwater fish has been demonstrated on the base of modern phylogenetic studies. It is the reason for reinvestigation of these parasites of fish in Eurasia, especially with the broad range of hosts.

# **ТЕМПЕРАТУРА И ЗДОРОВЬЕ РЫБ. ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ, ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

В.К. Голованов

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,  
Борок, Россия, e-mail: vkgolovan@mail.ru*

Здоровье рыб, обитающих в самых разнообразных естественных и искусственных температурных условиях, представляет собой область исследований, которая касается многих научных дисциплин и представляет исключительный интерес для широкого круга исследователей и специалистов рыбного хозяйства. Многие теоретические вопросы гидробиологии, ихтиологии, экологии и поведения рыб, физиологии, биохимии и иммунологии рыб, а также практические вопросы рационального использования рыбных ресурсов в естественной среде и вопросы аквакультуры необходимо решать с учетом физиологического состояния рыб. Инфекционная болезнь в любой степени интенсивности коренным образом отражается на здоровье, росте, питании, воспроизводстве, выживаемости и, в целом, на благополучии существования рыб (Микряков, 1978, 1991; Avtalion, 1981; Van Muiswinkel, 1985, 2008; Лукьяненко, 1989; Van Muiswinkel, Nakao, 2014).

Среди абиотических факторов водной среды, влияющих на жизнедеятельность гидробионтов, особую роль играет температура (Голованов, 2013а, б). Именно температура определяет ход и интенсивность процессов питания, роста, развития и выживаемости водных организмов. Кроме того, распределение и поведение рыб в естественных условиях также в большой степени зависит от температуры окружающей среды. Эффективность и успех выращивания рыб в прудах, в условиях аквакультуры и разнообразных устройствах, кроме хороших кормов и нормального содержания кислорода в воде (при прочих удовлетворительных параметрах) требует оптимальной или близкой к оптимальной температуры. Поэтому очень важно представлять, где расположены зоны эколого-физиологического

оптимума, в которых рост и питание рыб наиболее эффективны (Голованов, 2013а, б), а также области сублетальной и летальной температуры, где жизненные процессы рыб или затруднены, или уже невозможны (Beitinger et al., 2000). При оценке физиолого-биохимического и иммунологического статуса отдельной особи или группы рыб необходимо знать, в каком отрезке температурного диапазона жизнедеятельности, в какой сезон года и при какой температуре акклимации (содержания) происходит усиление или ослабление иммунной защиты рыб. С изменением реакции и чувствительности рыб к температуре соответственно изменяется и их реакция на инфекционные заболевания.

К настоящему времени закономерности формирования иммунитета у различных видов рыб изучены достаточно подробно (Микряков, 1978, 1991; Avtalion, 1981; Van Muiswinkel, 1985, 2008; Лукьяненко, 1989; Van Muiswinkel, Nakao, 2014). Исследована межвидовая, внутривидовая и возрастная изменчивость иммунитета рыб и механизмы иммунитета. Проанализировано влияние различных абиотических и биотических факторов водной среды, а также антропогенных воздействий на устойчивость рыб к инфекционным болезням. Тем не менее, некоторые аспекты непосредственного влияния температуры, как важнейшего абиотического фактора среды, на способность рыб противостоять инфекции изучены явно недостаточно, что оставляют широкое поле для дальнейших исследований, в том числе с применением новейших методов и подходов. В настоящей работе рассмотрены экологические, физиолого-биохимические и иммунологические аспекты проблемы здоровья рыб и температуры среды, а также кратко охарактеризовано влияние температуры на восприимчивость рыб к инфекционным болезням.

Температурный диапазон жизнедеятельности морских и пресноводных видов рыб расположен в диапазоне от  $-1.5$  до  $+44.5^{\circ}\text{C}$ . Зона эколого-физиологического и иммуно-биохимического оптимума находится в центре диапазона жизнедеятельности у лососевых и сиговых видов, при этом она сдвинута вверх у таких видов рыб, как карповые, окуневые, щуковые и осетровые. В разные сезоны года рыбы подвержены



влиянию перепадов температуры, в условиях аквакультуры режимы выращивания также включают набор определенных температур, при этом эффективность их роста, развития и питания неодинаковы. Поскольку температурный предел активности комплемента у рыб колеблется от 0–4°C до 40–56°C, реакция рыб на инфекционные заболевания также меняется на разных участках диапазона жизнедеятельности как рыб, так и возбудителей заболеваний (Грищенко и др., 1999).

Известно, что температурный оптимум большинства лососевых, осетровых, окуневых и карповых видов рыб расположены в диапазонах от 13 до 18°C, 20–24°C, 22–28°C и 24–30°C соответственно, а верхние границы жизнедеятельности для тех же видов равны ~23–28°C, 31–35°C, 32–37°C и 34–41°C (Голованов, 2013а, б). В то же время, оптимальные условия для развития вирусов, которые часто вызывают заболевания у холодолюбивых лососевых рыб, отмечены при 10–12°C, а у теплолюбивых карповых – при 20–25°C (Ведемейер и др. 1981). Анализ существующих данных показывает, что оптимальная зона действия и развития возбудителя у лососевых, осетровых, окуневых и карповых видов рыб варьирует достаточно широко – от 5–10°C при хиллодонеллезе, до 5–40°C при сапролегниозе и 18–25°C при аэромонозе и вибриозе. Следует отметить, однако, что вспышки заболевания могут быть и не связаны с оптимальными температурными условиями размножения возбудителя (Ведемейер и др. 1991).

Характерно, что для многих возбудителей инфекций (весенняя виремия карпа, ихтиофтириоз, хилодонеллез, триходиноз, дактилогироз) температуры воды на уровне 32–34°C приводит к подавлению заболевания у рыб. Использование для аналогичных целей температуры ниже 4°C (в случае вирусной геморрагической септицемии и дактилогироза) также иногда успешно, но обычно просто замедляет проявление заболевания. Таким образом, температурные оптимумы у рыб и возбудителей их инфекций не всегда совпадают, что дает возможность использовать этот момент для лечения и профилактики заболеваний. Перспективным в данном случае представляется использование участка диапазона температуры между зоной

температурного оптимума и верхней летальной температуры (Голованов, Микряков В.Р., 2011). Такое соотношение, важные для предотвращения и лечения заболеваний у теплолюбивых и холодолюбивых видов рыб, изучено крайне слабо (Голованов, Микряков В.Р., 2011) и требуют дальнейших исследований.

Массовость вспышек инфекционных заболеваний рыб (краснуха карпа, фурункулез лососевых и др.) в определенные сезоны года, очевидно, определяется как особенностями эколого-физиологического состояния рыб, так и напряженностью их врожденного иммунитета, которые в свою очередь зависят от температуры окружающей среды (Кеннеди, 1978; Микряков, 1978, 1991; Avtalion, 1981; Van Muiswinkel, 1985, 2008; Лукьяненко, 1989).

Известно, что эпизоотии краснухи карпов в прудовых хозяйствах чаще возникают весной, после повышения температуры воды выше 10°C. Летом заболевания краснухой реже, еще реже они осенью. Известны также обострения таких эпизоотий зимой. Вспышки фурункулеза лососевых в рыбоводстве, которые приводят к гибели рыб, происходят чаще осенью и весной, а летом – лишь изредка. Возможно, что только лабораторный эксперимент в полной мере способен оценить роль температуры в возникновении той или иной инфекции и выходе из нее.

Известно, что резкие перепады температуры величиной более 6°C негативно влияют на физиолого-биохимический и иммунологический статус рыб, вызывая не только температурный стресс, но, в конечном итоге и температурный шок. При воздействии стресс-факторов, таких как перепады температуры и кислорода, а также загрязнения воды и корма в условиях аквакультуры бактериозы рыб возникают более часто (Исаева, Козиненко, 1999).

Хорошо известно, что многие виды рыб показывают реакцию поведенческой лихорадки в термоградиентных условиях, где после инъекции возбудителя инфекции избирают зону температуры, на 2–6°C большую по сравнению с контролем (Reynolds et al., 1976; Kluger, 1979; Голованов, Микряков Д.В. 2011). Данная реакция проявляется в широком диапазоне температуры и не зависит от метода изучения окончательно

избираемой температуры (конечного термопреферендума), а также вида возбудителя инфекции (*Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saprolegnia*) (Голованов, Микряков В.Р., 2000). Для карпа и серебряного карася нами установлено, что повышение температуры содержания (или самопроизвольный выбор температуры в гетеротермальных условиях) на 2–4°C выше оптимальной в диапазоне от 28 до 33°C, прекращает развитие инфекции. Такая же реакция показана и у канального сомика при заражении бактерией *Edwardsiella ictaluri* (Francis-Floyd, 1987). В отношении лососевых, по крайней мере, молоди нерки и радужной форели, все это не так однозначно, как в случае карповых (Amend, 1970; Hetrick et al., 1979) Поведенческая лихорадка имеет защитный характер, усиливает сопротивляемость организма рыб и способствует их большей выживаемости в процессе протекания болезни. Однако, практической разработки использования эффекта поведенческой лихорадки в целях лечения рыб и отработки соответствующей методики пока не существует.

Иммунология рыб – динамично развивающаяся область биологической науки. Периодически проводятся российские и зарубежные конференции, издаются современные журналы, такие как *Fish Shellfish Immunology*, *Developmental Comparative Immunology* и др. Развиваются новые направления и проводятся перспективные исследования. Например, проанализированы гуморальные факторы неспецифической защиты рыб (Козиненко и др., 1999), проиллюстрирована роль естественных антител в адаптивной иммунной реакции рыб (Sinyakov et al., 2006), выявлена роль медиаторов в иммунной защите у рыб посредством поведенческой лихорадки (Grans et al., 2012), выполнена общая оценка роли видов-вселенцев в распространении инфекционных болезней у разных видов животных (Conn, 2014 и др.). Рассмотрены функциональные аспекты лимфоцитов рыб (Scapigliati, 2013), выявлена роль пребиотиков в иммунной реакции рыб (Hoseinifar et al., 2015, in press), проанализировано значение моноклональных антител в иммунологии рыб (Scapigliati et al., 1999), выполнена оценка действия вакцин и пищевых добавок в аквакультуре (Ringø et al., 2014), проанализированы

адаптивные иммунные реакции на слизистых поверхностях рыб (Rombout et al., 2014).

Обобщена имеющаяся к настоящему времени информация о функциональных основах иммунной деятельности некоторых видов костистых рыб, а полученные данные оценены в эволюционном контексте и прикладных аспектах (Randelli et al., 2008). В частности, затронут вопрос клеточных маркеров и детерминант в иммунологии рыб. Существенный интерес представляют исследования иммунных реакций как у отдельных рыб, так и их семейств (Rijkers et al., 1980, Marnila, Lilius, 2015). Наконец, суммируются итоги развития иммунологии рыб, описана в деталях история иммунологии и вакцинации рыб (Van Muiswinkel, 2008; Van Muiswinkel, Nakao, 2014 и др.). К сожалению, далеко не всегда при рассмотрении частных и общих вопросов иммунологии рыб в публикациях рассматривается роль и значение температуры среды. В докладе будут приведены новые данные на основе анализа исследований последних десятилетий, проведенных отечественными и зарубежными исследователями.

Таким образом, дана предварительная оценка инфицированности рыб из водоемов и условий аквакультуры, видоспецифичности возбудителей, определено значение температурного порога начала инфекций, а также возможных механизмов температурного контроля иммунитета. Обсуждены вопросы присутствия возбудителей инфекций в организме рыб и проявления заболевания, комплексного влияния различных факторов, включая температуру, на устойчивость рыб к разным инфекциям. Особое внимание уделено соотношению температурных оптимумов рыб и возбудителей их инфекций. Показано, что температура среды существенно изменяет проявление иммунитета рыб в диапазоне их жизнедеятельности как в естественных условиях, так и в условиях аквакультуры. Несмотря на противоречивость некоторых результатов и недостаток экспериментальных данных, приведенные примеры свидетельствуют о том, что с использованием особенностей влияния температуры на иммунитет рыб можно эффективно противостоять их инфекционным заболеваниям.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы

России: Динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» и Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-2666.2014.4 «Экологические аспекты адаптаций и популяционная организация у рыб».

#### Список литературы

Ведемейер Г.А., Мейер Ф.П., Смит Л. Стресс и болезни рыб. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1981. 128 с.

Голованов В.К. Температурные критерии жизнедеятельности пресноводных рыб. Москва: Полиграф-Плюс, 2013а. 300 с.

Голованов В.К. Эколого-физиологические закономерности распределения и поведения пресноводных рыб в термоградиентных условиях // Вопр. ихтиологии. 2013б. Т. 53. № 3. С. 286–314.

Голованов В.К., Микряков В.Р. Эволюционные и эколого-физиологические аспекты поведенческой лихорадки рыб // Сб. тез. докл. научно-практ. конф. «Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре», М., 2000. С. 47–48.

Голованов В.К., Микряков В.Р. Модифицирующее влияние температуры на иммунитет рыб к инфекционным болезням // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширенные материалы III Международной конференции, Борок, 18–22 июля 2011 года М.: Изд-во РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева, 2011. С. 95–99.

Голованов В.К., Микряков Д.В. Терморегуляционное поведение и температурные границы жизнедеятельности у инфузорированной молоди некоторых видов пресноводных рыб // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширенные материалы III Международной конференции, Борок, 18–22 июля 2011 года М.: Изд-во РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева, 2011. С. 201–204.

Грищенко Л.И., Акбаев М.Ш., Васильков Г.В. Болезни рыб и основы рыбоводства М.: Колос, 1999. 456 с.

Исаева Н.М., Козиненко И.И. Иммуномодулирующее действие бактерий (их продуктов) на рыб // Вопр. ихтиологии. 1992. Т. 39. № 4. С. 527–534.

Кеннеди К. Экологическая паразитология. М.: Мир, 1978. 230 с.

Козиненко И. И., Исаева Н. М., Балахнин И. А. Гуморальные факторы неспецифической защиты рыб // Вопр. ихтиологии. 1999. Т. 39. № 3. С. 394–400.

Лукияненко В.И. Иммунобиология рыб: врожденный иммунитет. Москва; ВО «Агропромиздат», 1989. 271 с.

Микряков В.Р. Актуальные вопросы иммунологии рыб // Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ. Л.: Наука, 1978. С. 116–133.

Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск, 1991. 154 с.

Amend D. F. Control of infectious hematopoietic necrosis virus disease by elevating the water temperature // J. Fish. Res. Board Can. 1970. V. 27. N 2. P. 265–270.

- Avtalion R.R. Environmental control of the immune response in fish // CRC Crit. Rev. Environm. Contr. 1981. V. 11. N 2. P. 163–188.
- Beitinger T.L., Bennet W.A., McCauley R.W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature // Env. Biol. Fishes. 2000. V. 58. N 3. P. 237–275.
- Conn D.B. Aquatic invasive species and emerging infectious disease threats: a one health perspective // Aquatic Invasions. 2014. V. 9. Iss. 3. P. 383–390.
- Francis-Floyd Ruth, Beleau Marshall H., Waterstrat Paul R., Bowser Paul R. Effect of water temperature on the clinical outcome of infection with *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish // J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1987. V. 191. N 11. P. 1413–1416.
- Grans A., Rosengren M., Niklasson L. Axelsson M. Behavioural fever boosts the inflammator response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* // J. Fish Biol. 2012. V. 81. Iss. 3. P. 1111–1117.
- Hetrick F. M., Fryer J. L., Knittel M. D. Effect of water temperature on the infection of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson with infections haematopoietic necrosis virus // J. Fish. Dis. 1979. V. 2. N 3. P. 253–257.
- Hoseinifar S.H., Esteban M.A., Cuesta A., Yun-Zhang Sun. Prebiotics and fish immune response: a review of current knowledge and future perspectives // Rev. Fish. Science Aquaculture. 2015. (In press).
- Kluger M.J. Fever in ectotherms: evolutionary implications // Thermoregulation in ectotherms. Symp. Richmond. 1978. / Amer. Zool. 1979. V.19. N 1. 295–304.
- Marnila P., Lilius E-M. Thermal acclimation in the perch (*Perca fluviatilis* L.) immunity // J. Thermal Biology. 2015. (In press).
- Randelli E., Buonocore F., Scapigliati G. Cell markers and determinants in fish immunology. Review Article // Fish Shellfish Immunol., 2008. V. 25. Iss. 4. P. 326–340.
- Reynolds W.W., Casterlin M.E., Covert J.B. Behavioral fever in teleost fishes // Nature, 1976. V. 259. № 5538. P. 41–42.
- Rijkers G.T., Frederix-Wolters E.M.H., Van Muiswinkel W.B. The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (*Cyprinus carpio*) // Immunology. 1980. V. 41. P. 91–97.
- Ringø E., Olsen R.E., Jensen I., Romero J., Lauzon H. Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges // Rev. Fish. Biol. Fisheries. 2014. V. 24. N 4. P. 1005–1032.
- Rombout J.H.W.M., Yang G., Kiron V. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish // Fish Shellfish Immunol. 2014. V. 40. Iss. 2. P. 634–643.
- Scapigliati G. Functional aspects of fish lymphocytes // Developm. Comp. Immunology. 2013. V. 41. Iss. P. 200–208.
- Scapigliati G., Romano N., Abelli L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes // Aquaculture. 1999. V. 172. P. 3–28.

Sinyakov M.S., Dror M., Lublin-Tennenbaum T., Salzberg S., Margel S., Avtalion R.R. Nano- and microparticles as adjuvants in vaccine design: Success and failure is related to host natural antibodies // *Vaccine*, 2006. V. 24. Iss. 42-43. P. 6534–6541.

Van Muiswinkel W.B. A history of fish immunology and vaccination I. The early days // *Fish Shellfish Immunol.* 2008. V. 25. Iss. 4. P. 397–408.

Van Muiswinkel W.B., Anderson D.P., Lamers C.H.J., Egberts E., Van Loon, J.J.A., Ijssel J.P. Fish immunology and fish health. In: Manning, M.J., Tatner, M.F. (Eds.), *Fish Immunology*. Academic Press, London, 1985. P. 1–8.

Van Muiswinkel W.B., Nakao M. A short history of research on immunity to infectious diseases in fish // *Developm. Comp. Immunology*. 2014. V. 43. Iss. 2. P. 130–150.

### **TEMPERATURE AND FISH HEALTH. ECOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS**

Golovanov V.K.

It is shown that the temperature of the environment significantly changes the display of the immunity of fish in the range of their life in nature and aquaculture. Despite some contradictory results and a lack some of experimental data, these examples show that by using features of the influence of temperature on the fish immune system can effectively resist their infectious diseases.

## **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ, ПАТОМОРФОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЯХ И ТОКСИКОЗАХ РЫБ**

Л.И. Грищенко

*Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, e-mail: [ihtiopatolog@mail.ru](mailto:ihtiopatolog@mail.ru)*

Одним из факторов, препятствующих прогрессу рыбного хозяйства России, является отрицательное антропогенное воздействие на природные и искусственные водоемы, что неизбежно ведет к ухудшению в них эколого-токсикологической и эпизоотической ситуации, появлению новых или изменению форм проявления известных болезней рыб. С развитием аквакультуры и расширением международных связей у нас обострилась обстановка по вирусным болезням карповых, лососевых и осетровых рыб (Яременко и др. 2000). Поэтому для выяснения причин их возникновения, проведения

эпизоотологического мониторинга, своевременной и качественной диагностики необходим комплексный подход, в котором важное место занимают патолого-морфологические исследования.

Цель исследований – сравнительное изучение патоморфологии и патоморфогенеза при малоизученных протозойных, инфекционных болезнях и токсикозах рыб пестицидами.

Работа по патоморфологии рыб проведена вначале в Центральной лаборатории по изучению болезней рыб ВИЭВ под руководством профессоров А.И. Канаева и А.В. Акулова (1964–1981г.), а затем продолжена МГАВМиБ им. К.И. Скрябина. Методологической основой исследований послужили фундаментальные разработки медицины и ветеринарии, предусматривающие комплексность и углубленность работ с привлечением специалистов разного профиля: бактериологов, вирусологов, биохимиков, токсикологов, паразитологов и др.

Исследованиям подвергнуты патологические материалы, собранные в рыбхозах разных областей России и СНГ от спонтанно больных рыб и используемых в экспериментах. Патологоанатомическое вскрытие и патогистологические исследования проводили общепринятыми методами. Учитывая специфику морфологии и физиологии органов и тканей рыб, нами внесено ряд дополнений и модификаций в методики патоморфологических исследований рыб: подобраны оптимальные фиксирующие жидкости и режимы фиксации органов, заливки материала, окраски срезов и др.

За прошедший период нами изучена патоморфология и вопросы патогенеза при воспалении плавательного пузыря, аэромонозе, псевдомонозе, весенней виремии, банхионекрозе карпов; фурункулезе, вирусной геморрагической септицемии, папилломатозе лососевых; миксобактериозе форели и осетровых, микробактериозе аквариумных рыб и др. Кроме того, впервые в ветеринарной практике проведена серия работ по водной токсикологии: изучены токсические и иммунодепрессивные свойства, патоморфология и механизм действия на рыб хлор- и фосфорорганических инсекто - акарицидов (9 препаратов),



гербицидов (2 препарата), соединений ртути, фторидов и др. токсикантов.

*При воспалении плавательного пузыря (ВПП)* впервые была изучена патологоморфология и некоторые стороны патогенеза, что послужило основанием выделить ее в самостоятельную нозологическую единицу. По данным гистологических исследований было высказано предположение об участии в этиологии болезни микроспоридий, которые на разных стадиях развития обнаруживались в сосудистом слое плавательного пузыря и в просвете мочевых канальцев почек (Грищенко, 1967). Однако, в тот период из-за недостатка сведений о биологии микроспоридий их этиологическая роль не была доказана. Только в 80-х годах, благодаря работам венгерских ученых и нашим повторным исследованиям, установлено, что возбудителем болезни являются микроспоридии *Sphaerospora renicola* (Csaba et al 1984, Афанасьев, 1989). Несмотря на это, патоморфологический метод до сих пор используется как основной при диагностике данного заболевания.

*Весенняя вирусная карпов (ВБК)* впервые была диагностирована сотрудниками лаборатории болезней рыб ВИЭВ при нашем участии в Курской и Белгородской области в 1971 г. Результаты комплексных исследований позволили выделить это заболевание из комплекса «краснухи» карпов. Нами установлено, что клинико-морфологическая картина болезни при остром течении проявляется преимущественно в форме вирусной септицемии. Для нее характерны: брюшная водянка, ерошение чешуи, экзофтальм, геморрагический диатез в виде множественных кровоизлияний в коже, печени и других органах, фибриноидное перерождение стенки сосудов, дермато-миозит, острый вирусный гепатит. В почках – гиалиново-капельная дистрофия и некроз эпителия мочевых канальцев, распад элементов кроветворной ткани. В сердце преобладают явления эпикардита и миокардита, в кишечнике катаральное воспаление или фокальный некроз слизистой, в головном мозге отмечен периваскулярный отек и гиперхроматоз в отдельных нейронах (Грищенко, 2015).

При изучении *вирусной геморрагической септицемии форели* (ВГС), как и при ВВК установлены аналогичные по характеру, но более выраженные и тяжелые патоморфологические изменения.

Сопоставление полученных результатов показывает, что они проявляются очень сходными патоморфологическими изменениями, обусловленными общностью их патогенеза. Особо следует подчеркнуть, что при обеих болезнях проявлялась гиалиново-капельная дистрофия эпителия мочевых канальцев, которую мы рассматриваем как характерный признак и его следует использовать в комплексной клинико-морфологической диагностике этих инфекций. В дополнение к этому изучены изменения при хроническом течении болезни, которые характеризовались инкапсуляцией поствоспалительных очагов некроза и склерозом паренхимы печени, а в почках – продуктивным гломерулонефритом.

Бактериальные болезни отличаются от вирусных комплексом патоморфологических изменений и патогенезу. Так, при остром течении *псевдомоноз* карповых рыб, как и *аэромоназ* проявляется в форме бактериальной септицемии и характеризуется эритематозным дермато-миозитом, экзофтальмом, увеличением брюшка вследствие развития асцита и перитонита, спленомегалией, гиперплазией гемопоэтической ткани почек, серозным гломерулонефритом, гидрорической дистрофией печеночных клеток и эпителия мочевых канальцев.

Клинико-морфологическая картина при *аэромоназе* карпов отличается от ВВК и псевдомоноза карпов более разнообразным симптомокомплексом и динамикой развития патологического процесса: постепенной сменой или комбинацией острой септической, подострой асцитно-язвенной и хронической язвенной формы. Указанную стадийность развития и проявления болезни считаем важным дифференциально-диагностическим признаком *аэромоназа*, отличающим его от псевдомоноза и ВВК.

Результатами клинических и патоморфологических исследований при отравлениях рыб пестицидами показано, что *хлорорганические* соединения (ХОС) оказывают на рыб, как и на млекопитающих, преимущественно нейротоксическое и

гепатотропное, а *фосфорорганические* (ФОС) – антихолинэстеразное действие. В клинической симптоматике отравлений рыб этими пестицидами ведущее место занимает нервно-паралитический синдром, а в комплексе патоморфологических нарушений – гемодинамические расстройства, дистрофические и некротические изменения в разных органах. Так, при интоксикации ХОС более выражены дистрофические и некротические изменения в жабрах - токсический отек, дистрофия и очаговая десквамация респираторного эпителия; в печени – белковая дистрофия и очаговый некроз паренхимы; в разных отделах головного мозга – перичеллюлярный отек, дистрофия и рассеянный некроз нейронов.

При отравлениях ФОС на фоне менее выраженных дистрофических и некротических изменений в паренхиматозных органах и жабрах рыб нами впервые выявлено гистохимически ингибирование активности холинэстеразы в нервно-мышечных синапсах и миокарде, сочетающееся с деструкцией синапсов.

В экспериментальных условиях показано, что пестициды в субтоксических концентрациях оказывают иммунодепрессивное действие. Так, полихлоркамфен такое действие оказывал в концентрации 0,005 мг/л и выше. Оно проявлялось повышением восприимчивости рыб к заражению рыб псевдомонодами, летальные дозы которых снижались в 2-4 раза, угнетением продукции фагоцитов (лейкоцитов на 50,4, нейтрофилов на 24,6, моноцитов на 85,8 и плазмобластов в крови на 42,2%) и ослаблением их функций за счет уменьшения гликогена (на 17,4 – 28,8%) в нейтрофилах, клетках миелоидного и лимфоидного ряда в почках и селезенке.

Представленные результаты вносят определенный вклад в сравнительную патологию и патоморфологию при болезнях рыб, что позволило усовершенствовать диагностику основных заразных болезней и токсикозов рыб, а также сформулировать базовые концепции их патогенеза.

Установлено, что патологические процессы у рыб протекают по тем же закономерностям, что и у высших позвоночных животных. Однако в их проявлении имеются существенные

отличия, связанные с анатомо-физиологическими особенностями и уровнем эволюционного развития рыб как низших водных позвоночных животных.

Полученные нами данные использованы при составлении соответствующих нормативных документов по диагностике, профилактике и борьбе с болезнями и токсикозами рыб. Отработанные методологические подходы следует шире использовать при установлении предельно допустимых концентраций вредных веществ в рыбохозяйственных водоемах, а также оценке безопасности лечебных препаратов, применяемых в рыбоводстве.

Несмотря на достигнутые успехи, сравнительная патология рыб и других низших позвоночных животных нуждается в дальнейшем изучении не только на тканевом, но и клеточном и субклеточном уровне.

#### Список литературы

Яременко Н.А. Эпизоотическая обстановка по заразным болезням рыб в Российской Федерации. Яременко Н.А., Мачнев А.Н. // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре. Сб. тезисов докл. нач. практ. конф. М: Россельхозакадемия. 2000.

Грищенко Л.И. О воспалении плавательного пузыря. Грищенко Л.И. // Ветеринария. 1967. № 4.

Csaba G., Studies into posible protozoan aetiology of swimblade inflamacion in carpifry. / Csaba G., Molnar K. u. a. // J. Fish Diseases. 1984. № 1.

Афанасьев В.И. К этиологии и эпизоотологии воспаления плавательного пузыря карпов./ Афанасьев В.И., Рудиков Н.И., Грищенко Л.И. и др. // Ветеринария. 1989. № 6.

Грищенко Л.И. Патолого-морфологические изменения и патогенез при весенней виремии карпов. // Российский ветеринарный журнал. СХЖ. 2015. № 1.

### **COMPARATIVE PATHOLOGY, PATOMORPHOLOGY AND PATHOGENESIS BY INFECTIONS DISEASES AND TOCSICOSES OF FISH**

L.I. Grishenko

Pathologo-anatomical and histological changes of Fish with SVC, VGS, Pseudomonosis, Aeromonosis, Tocsikosis of pesticides u. a., the morphological aspects of pathogenesis, recommendations regarding diagnostics of disease are given.

## ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА КАРПОВ С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНФЕКЦИОННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ

И. Ирнazarов, К. Rakus, P. Jurecka, T. Kaminska  
*Polish Academy of Sciences, Ichthyobiology and Aquaculture Unit,  
Kalinowa str.2, 43-520 Chybie, ilgiz.irnazarow@golysz.pan.pl*

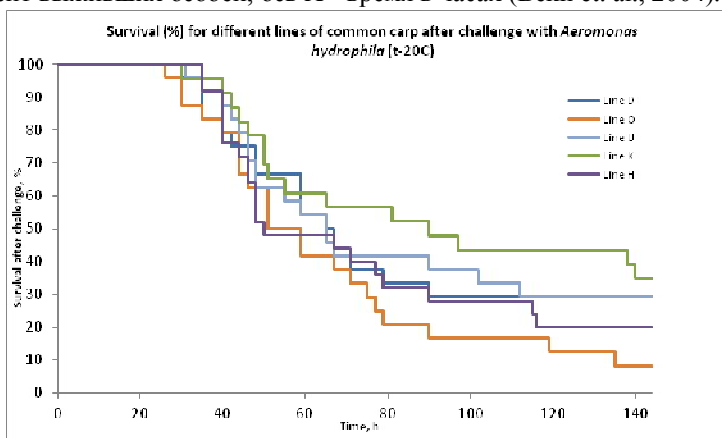
Проводимые в течение многих лет работы в Департаменте Ихтиобиологии и Аквакультуры (ZIGR) Польской Академии Наук привели к созданию около двух десятков селекционных линий (отводок) карпа. Многие из них имеют характеристики, уникальные для данной линии. Эти особенности являются признаком генетической однородности линии. Прежде всего, имеются в виду характерные фенотипические признаки (окраска, тип чешуйчатого покрова, экстерьер) или же признаки, связанные с типом и степенью физиологической реакции или иммунного ответа (реакции на стресс, репродуктивные качества, восприимчивости к определенным патогенам и т.д.). Линии эти были созданы в результате инбридинга в течение многих поколений и целенаправленного отбора.

Обладание большим количеством линии карпа, выведенных в Гольше (18 линий), многие из которых имеют "иностранное происхождение", предоставляет возможность изучения реакции организма на различные раздражители внешней среды с учетом генотипа. Коллекция линии, одновременно является генетическим банком, в котором собраны пулы генов представляющие изначальные популяции карпов разводимых в таких странах как Венгрия, Германия, (бывшая) Югославия, Франция, Россия и т.д.

В настоящее время собран обширный материал показывающий "неравноценность" линии по отношению к различным факторам внешней среды. Например, на графике 1 представлена смертность, наблюдаемая в 5 линиях карпа в результате бактериальной инфекции *Aeromonas hydrophila*. Мы видим, что разброс процента выживших особей составляет от 10% в венгерской линии - "0" до около 40% в польской линии "К". Учитывая, что условия содержания были одинаковыми, можно

полагать что различия в резистентности к аэромонозу между линиями, могли быть обусловлены генетическими факторами.

График 1. Выживаемость годовалых особей карпа во время инфекции *Aeromonas hydrophila*. В опыте использовалось по 20 карпов в каждой из 5 линий: D - израильская DOR-70, O - венгерская, U - украинская, K - кнышинская (польская) и H - лабораторная. Внутримышечная инфицирующая доза составляла  $3.0 \times 10^7$  бактерий в 0.1 мл ФСБ, соответственно в группе контрольной рыбы получили только раствор ФСБ (0.1 мл/особь). Мониторинг смертности проводился в течение первых 6 дней. Температура воды составляла 20°C. Ось Y - процент выживших особей, ось X - время в часах (Bekh et. al., 2004).



Похожую картину мы наблюдали во многих других случаях – будь то выживаемость в прудах молодняка, резистентность к вирусным заболеваниям (напр., к герпесвирусу карпа – KHV) или же степень паразитемии карпов в прудах. Все это вместе взятое убедительно показывает на значение генетической составляющей. Так как инфекционные заболевания представляют серьезную проблему для современной аквакультуры, в Голыше, в начале двухтысячных годов, предприняты шаги с целью понять глубже природу генетических различий касательно резистентности карпов. Учитывая мультигенный характер признака, эксперименты, проводимые в Департаменте Ихтиобиологии и Аквакультуры ПАН, идут двумя параллельными путями. С одной стороны, осуществляется интенсивное и всестороннее изучение ключевых иммунных генов, имеющих значение с точки зрения резистентности к

распространенным в прудовой аквакультуре патогенам (так называемых генов-кандидатов). С другой стороны, сравнительно недавно были разработаны и внедрены в практику методы анализа микросателлитарных маркеров и AFLP. Они уже сейчас с успехом используются в селекционной практике, а также в работах по поиску и отбору маркеров устойчивости карпа к КНВ.

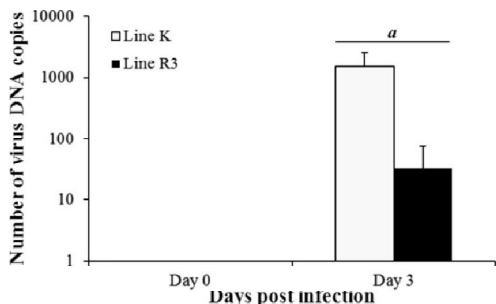
В исследованиях над иммунитетом рыб используется не только *Aeromonas hydrophila*, но и другие патогенные микроорганизмы, такие как вирусы (*CyHV-3*) и простейшие *Trypanoplasma borreli* (паразитирующие в крови).

Например, путем многократного тестирования линии по показателю различий в выживаемости во время инфекции КНВ (*CyHV-3*) было выбрано 2 линии (польские линии R3 и K) достоверно различающихся по этому признаку. Анализ активности генов иммунной системы выявил значительные различия в характере иммунного ответа. Различия касались прежде всего генов, вовлеченных в процесс распознавания патогена, активации системы комплемента, процессинга антигена и его презентация молекулами главного комплекса гистосовместимости, а также адаптивного иммунитета слизистой (Rakus et al., 2012).

На графике 2 видно, что различия в реактивности иммунной системы непосредственно отразились на степени зараженности вирусами особей, принадлежащих к двум тестируемым линиям, что в конечном итоге определило отличия в выживаемости. Из этого следует, что следует присмотреться именно к тем группам генов, которые демонстрируют отличия в реакции на вирусную инфекцию.

Например, выявленные различия касались генов комплекса гистосовместимости класса II (МНС класса II). Это группа генов и кодируемых ими антигенов клеточной поверхности, функцией которых является обеспечение взаимодействия между Т-лимфоцитами и макрофагами в процессе иммунного ответа.

График 2. Титр вируса инфицированных рыб линии K и R3 на третий день болезни определенной методом TAqMan ПЦР в туловищной почке. На оси Y количество копий вирусного ДНК в 250 нг ДНК изолированного из исследуемой ткани у 10 особей карпа (Rakus et al., 2012).



Мы выяснили, что некоторые генетические варианты молекул МНС класса II обеспечивают более высокие шансы на выживание у рыб инфицированных СуHV-3. Анализ частот распределения аллели среди тестируемых групп выявил один аллель (СусА-DAB1\*05) значительно увеличивающий, и два аллеля (СусА-DAB1\*02 и СусА-DAB1\*06) значительно снижающих устойчивость к СуHV-3, независимо от генетического фона (Rakus et al., 2009a).

Таблица 1. Коэффициент риска (*hazard ratio*) неблагоприятного исхода (смерть) носители аллели СусА-DAB1\*05, СусА-DAB1\*02 и СусА-DAB1\*06 инфицированных СуHV-3. Всего в эксперименте инфицировано  $n = 934$  около 7 и 10 месячных карпов методом внутривентральной (IP) инъекции 0,2 мл суспензии вируса изолированного при концентрации 4TCID<sub>50</sub>/мл. В группе контрольной вводили 0,2 мл среды неинфицированной культуры KFC. Величина показателя Смертность определялась на 33 день эксперимента. (Rakus et al., 2009a).

Аллель	Коэффициент риска (95% CI)	Смертность
СусА-DAB1*02	1.526 (1.271, 1832)	87%
<b>СусА-DAB1*05</b>	<b>0.497 (0.417, 0.591)</b>	<b>74%</b>
СусА-DAB1*06	1.233 (1.053, 1.442)	88%

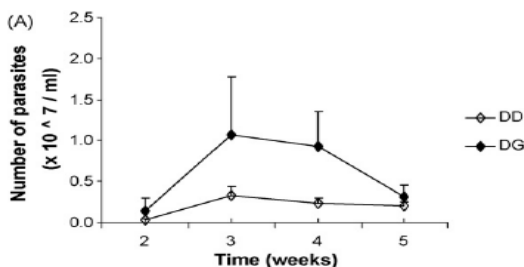
Что примечательно, носители аллеля СусА-DAB1\*05 имели также намного больше шансов выжить в случае заражения рыб рачком карпоедом аргулюс, как это было выявлено в отдельном эксперименте (Rakus et al., 2009b). Наши данные показывают, что гены МН класс II В могут рассматриваться как потенциальные генетические маркеры в селекции карпа на устойчивость к вирусу.

Еще одна генетическая система, которая углубленно изучается в Голыше это комплекс генов ответственных за метаболизм железа в организме. В сыворотке крови большинство молекул железа связано с трансферрином (Тf), полиморфным



белком, являющимся переносчиком железа. Как известно, железо является одним из важнейших кофакторов роста и размножения патогенов. Обеспечивая свои потребности, они отбирают его у клеток и железосодержащих белков (гемоглобина, трансферрина) хозяина. Серия экспериментов с паразитом *Trypanoplasma borreli* выявила корреляцию между различными генотипами Tf карпа а степенью зараженности рыб (Jurecka et al., 2009a). Причем корреляция эта зависила от генетического фона, а именно, не наблюдалась в линиях, восприимчивых к паразиту. Считается, что биологический смысл полиморфизма Tf состоит в ограничении доступности железа, необходимого для роста микроорганизмов, что способствует повышению устойчивости организма к инфекции.

График 3. Паразитемия (кол-во *T. borreli*/мл крови) карпа в течении 5 недель хронической инфекции. Данные представляют средние значения (n = 30) карпов с генотипом трнсферрина DD и DG. (Jurecka et al., 2009a).



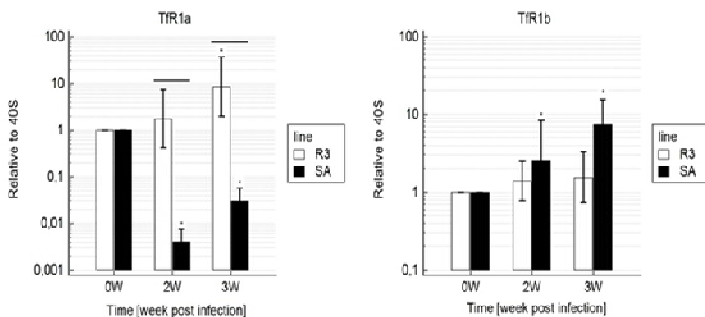
Однако наши дальнейшие исследования показали, что повышенная устойчивость связана скорее не с большей или меньшей доступностью железа у носителей определенных генетических вариантов молекул Tf, а скорее со способностью носителей определенных аллелей инициировать более эффективный иммунный ответ (Jurecka et al., 2009b). Так как карп является тетраплоидным видом, иногда это затрудняет понимание механизма действия достаточно хорошо изученных генов, но одновременно раскрывает возможности лучшего понимания эволюционных аспектов их специализации.

Например, мы выявили у карпа четыре изоформы альфа-2-макроглобулина, достаточно хорошо изученного высокомолекулярного белка крови, обладающего очень широким

спектром активности и кроме всего прочего имеющего способность ингибировать бактериальные и эукариотические эндопептидазы. Исследование активности альфа-2-макроглобулина в течение инфекции *T. borreli* не выявило какой либо значимой роли этого белка. Но в случае ихтиофтириоза (*Ichthyophthirius multifiliis*) оказалось, что только один из 4 генов кодирующих изоформы альфа-2-макроглобулина карпа значительно повысил свою активность (Onaga, 2008).

Транспорт железа в клетку происходит при взаимодействии комплекса железо-трансферрин со специфичным для трансферрина рецептором плазматической мембраны. Мы идентифицировали у карпа две изоформы рецептора трансферрина типа 1 - TfR1a и TfR1b. Известно, что повышение экспрессии TfR1 способствует более эффективному процессу доставки железа в клетку где оно хранится связанное с белком ферритина и в связи с этим становится менее доступным, например для паразитов крови. Кроме того, экспрессия TfR1 может увеличиться в ответ на стимуляцию оксидом азота (NO). Известно также, что *T. borreli* провоцирует выделение больших объемов NO активированными макрофагами как одну из защитных мер организма во время инфекции. Поэтому во время экспериментальной инфекции двух линии R3 и SA паразитом *T. borreli* мы ожидали увидеть последовательное увеличение активности генов кодирующих TfR1a и TfR1b, допуская, что функции этих 2 изоформ могут быть примерно однотипны. Однако экспериментальные данные показали рост активности гена TfR1a только у особей линии R3, а у карпов линии SA угнетение активности этого гена. С другой стороны ген TfR1b карпов R3 не реагировал на увеличивающуюся паразитемию, в то время как у карпов SA показал умеренный рост активности.

График 4. Экспрессия генов рецептора трансферрина 1a и 1b у карпов линии R3 и SA во время хронической инфекции *Trypanoplasma borreli*. Значения экспрессии генов логарифмически преобразованы как кратное изменение ( $\pm$  SD) по отношению к гену 40S (N = 5). Отличия от контрольной группы считались значимыми при  $p \leq 0,05$  и отмечены звездочкой. Различия между линиями считались значимыми при  $p \leq 0,05$  и отмечены горизонтальной линией (Kamińska et al., in preparation).



Основываясь на вышеизложенном следует думать, что попытки идентификации генетических маркеров резистентности к инфекционным болезням имеют большие перспективы так как две главные составляющие как изменчивость по признаку и генетическое разнообразие присущи карпу. С другой стороны к любым корреляциям следует подходить с большой осторожностью в связи с тетраплоидным происхождением этого вида и соответственно с нашим ограниченным пониманием как факт дубликации повлиял на функциональные особенности изучаемых генов. Также мы имеем много примеров когда генетический фон модифицирует эффект маркера.

#### Литература

Bekh V., Imnarow I., Onara D., Rakus K., Jurecka P., Pilarczyk A., 2004. Wyniki eksperymentalnego zakażenia karpi (*Cyprinus carpio* L.) bakterią *Aeromonas hydrophila*. In: „Ochrona zdrowia ryb – aktualne problemy”, IRS Publisher, pp. 143-150 (in Polish).

Jurecka, P., Wiegertjes, G.F., Rakus, K.L., Pilarczyk, A., Imnarow, I., 2009a. Genetic resistance of carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Trypanoplasma borreli*: Influence of transferrin polymorphisms. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127, 19–25. doi:10.1016/j.vetimm.2008.09.006

Jurecka, P., Imnarow, I., Stafford, J.L., Ruszczyk, A., Taverne, N., Belosevic, M., Savelkoul, H.F.J., Wiegertjes, G.F., 2009b. The induction of nitric oxide response of carp macrophages by transferrin is influenced by the allelic diversity of the molecule. *Fish & Shellfish Immunology* 26, 632–638. doi:10.1016/j.fsi.2008.10.007

Onara, D.F., Forlenza, M., Gonzalez, S.F., Rakus, K.L., Pilarczyk, A., Imnarow, I., Wiegertjes, G.F., 2008. Differential transcription of multiple forms of alpha-2-macroglobulin in carp (*Cyprinus carpio*) infected with parasites. *Developmental & Comparative Immunology* 32, 339–347. doi:10.1016/j.dci.2007.06.007

Rakus, K.L., Irnazarow, I., Adamek, M., Palmeira, L., Kawana, Y., Hirono, I., Kondo, H., Matras, M., Steinhagen, D., Flasz, B., Brogden, G., Vanderplasschen, A., Aoki, T., 2012. Gene expression analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L.) lines during *Cyprinid herpesvirus 3* infection yields insights into differential immune responses. *Developmental & Comparative Immunology* 37, 65–76. doi:10.1016/j.dci.2011.12.006.

Rakus, K.L., Wiegertjes, G.F., Jurecka, P., Walker, P.D., Pilarczyk, A., Irnazarow, I., 2009b. Major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism influences disease resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 288, 44–50. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.11.016

Rakus, K.L., Wiegertjes, G.F., Adamek, M., Siwicki, A.K., Lepa, A., Irnazarow, I., 2009a. Resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Cyprinid herpesvirus-3* is influenced by major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism. *Fish & Shellfish Immunology* 26, 737–743. doi:10.1016/j.fsi.2009.03.001

## **ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СИГОВЫХ РЫБ В ВОДОЕМАХ КОЛЬСКОГО СЕВЕРА В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ**

И.М. Королева

*Институт проблем промышленной экологии Севера, Кольского  
научного центра РАН, Апатиты, Россия  
e-mail: koroleva@inep.ksc.ru*

Гематологические показатели объективно отражают физиологическое состояние организма и достаточно часто являются необходимым элементом в ихтиологических исследованиях. Варьируя в узких пределах, они способны отражать различные физиологические и патологические изменения организма, что находит свое применение в медицинских и ветеринарных исследованиях. Исследования крови рыб в естественных условиях позволяют установить гематологическую норму рыб и выяснить степень отклонений от нормы и характер гематологических адаптации в период активного антропогенного воздействия на водоемы (Головина, 1979, Житенева и др., 1989). Исследования по крови сиговых рыб в пресноводных водоемах Мурманской области крайне немногочисленны (Моисеенко, 1998, Королева, 2004, Антропогенные... 2007).

Мурманская область относится к арктическим и субарктическим территориям с концентрацией крупных предприятий горнодобывающей промышленности и цветной металлургии, производственная деятельность которых в течение нескольких десятилетий привела к негативным последствиям для растительного и животного мира. Значительное воздействие испытывают оз. Имандра, на водосборе которого расположены комбинаты "Североникель", "Олкон", "Апатит" и многочисленные населенные пункты, в т.ч. гг. Оленегорск, Мончегорск, Апатиты, Кировск. Приграничный с Норвегией район Кольского п-ва тоже является одним из центров "экологического неблагополучия" региона. Расположенный здесь горно-металлургический к-т "Печенганикель" - мощный источник загрязнения природной среды, в т.ч. оз. Куэтсъярви, окислами серы и рядом тяжелых металлов (в первую очередь Ni, Cu, Zn и др.). На юго-западе полуострова Ковдорский горно-обогатительный к-т полностью изменил гидрохимический состав вод оз. Ковдор. Остальные водоемы испытывают преимущественно аэротехногенную нагрузку и в определенной степени могут служить фоновыми (контрольными).

Целью данной работы явилось изучение гематологические показатели сиговых рыб, обитающих в водоемах с различной степенью антропогенного загрязнения вод.

Сбор материала производился с 1996 по 2007 гг. в озерах Кольского полуострова, отличающихся по типизации и уровню загрязнения. У сигов *Coregonus lavaretus* L. (в абсолютном большинстве малотычинковой формы) определялись основные биологические параметры (размерно-весовая, возрастная структуры, соотношение пол и стадия зрелости). Из гематологических параметров определялись содержание гемоглобина (Hb), количество эритроцитов, СОЭ, эритроцитарная и лейкоцитарная формулы, выполнен цитоморфологический анализ. Идентификацию форменных элементов крови проводили по классификации Н.Т. Ивановой (1983).

В условно-чистых водоемах, таких как оз. Кочьяур и плес Бабинская Имандра среднее содержание гемоглобина у рыб варьировало от 107 до 110 г/л. Количество эритроцитов в  $1 \text{ мм}^3$  -

от 1 до 1.45 млн./мм<sup>3</sup>. Содержание гемоглобина в эритроците колебалось от 0.75 до 0.95 г/л (табл. 1). Размеры эритроцитов составляли 9 мкм большой диаметр и 6 мкм малый. Красная кровь представлена на 95-97% зрелыми эритроцитами, оставшаяся часть приходилась на полихроматофильные клетки (2.0–5.0%), базофильные эритробласты (0.8–1.0%) и проэритробласты (0.3–1.0%).

Таблица 1. Характеристика красной крови сигов в условно-фоновых водоемах

водоем	гемоглобин, г/л	эритроциты, млн/мм <sup>3</sup>	СГЭ, г/л	незрелые эритроциты, %
оз. Кочяур	$\frac{108 \pm 27}{62-146}$	$\frac{1.45 \pm 0.07}{1.40-1.50}$	0.75	1.1
Бабинская Имандра	$\frac{107 \pm 3.3}{76-144}$	$\frac{1.02 \pm 0.09}{0.7-1.35}$	0.95	5.6
Чунозеро	$\frac{110 \pm 2}{90-140}$	$\frac{0.9 \pm 0.03}{0.7-1.35}$	0.90	2.0

У сигов из оз. Чунозеро средний уровень содержания гемоглобина составил 110 г/л (90 – 126). Данная величина является нормальной для сигов, обитающих в водоемах Кольского полуострова. Среднее содержание эритроцитов в 1 мм<sup>3</sup> - 0.91 млн. клеток. На долю незрелых эритроцитов приходилось 2-3%, что свидетельствует о невысокой интенсивности эритропоэза. Патологические отклонения в морфологии клеток практически не отмечались. Скорость оседания эритроцитов была равна 1-2.5 мм/ч. Белая кровь представлена лимфоцитами (70 -82%), моноцитами (0-5%) и нейтрофилами (8-30%), в т.ч. на долю сегментоядерных приходилось 20-40%. Общее количество лейкоцитов не превышало 13 тыс/мм<sup>3</sup>.

Индекс обилия лейкоцитов у сигов, обитающих в оз. Кочяур колебался в пределах от 0.86 до 1.42, в среднем оставляя 1.19. Лейкоцитарная формула на 94% представлена лимфоцитами, т.е. кровь имела лимфоцитарный характер. Общее содержание нейтрофилов у сигов составляло 5.6%. Моноциты немногочисленны – 0.4% (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика белой крови сигов в условно-фоновых водоемах

водоемы	ИОЛ	лимфоциты, %	нейтрофилы, %	моноциты, %
оз. Кочеяур	1.19±0.04	94±0.82	5.6±0.73	0.4±0.09
Бабинская Имандра	0.9 ± 0.2	94.6±1.5	2.3±0.6	3.1±1.4
Охтозеро	0.46 ± 0.08	88 ± 5.0	10 ± 6.0	2.0 ± 0.7

В загрязняемом оз. Имандра, в губе Монча в период 1996-97 гг. содержание гемоглобина равнялось  $90. \pm 2.3$  г/л. Количество эритроцитов и содержание гемоглобина в них также соответствовало норме -  $0.97 \pm 0.02$  млн./мм<sup>3</sup> и 0.94 пг (табл. 3). СОЭ в среднем равняется 2.2 мм/ч, максимальные значения не превышали 3 мм/ч. Красная кровь на 93.2% была представлена дефинитивными эритроцитами. Были выявлены патологии в морфологии эритроцитов. На мазках встречались клетки с нарушением формы – пойкилоциты и разноразмерные эритроциты. Количество анизоцитов в г. Монча достигало 0.5%. Количество клеток с нарушением формы – пойкилоцитов в г. Монча было сравнительно выше (0.95%), чем в более чистых районах оз. Имандра (0.35%). Для части эритроцитов было отмечено состояние гипохромазии, т.е. клетки были окрашены менее интенсивно, что связано с недостаточным содержанием дыхательного пигмента. Кроме этого, поражения затрагивали ядро - происходила атипия его структуры и формы. Оно подвергалось как пикнозу, так и хроматинолизу (распаду хроматина ядра). В небольшом количестве встречались дегенеративно делящиеся эритроциты, в результате чего появлялись микроциты и шистоциты (безъядерные фрагменты цитоплазмы). У отдельных рыб произошло нарушение осморезистентности клеток.

Общее содержание лейкоцитов у сигов из г. Монча равнялось 24.6 тыс./мм<sup>3</sup>. Белая кровь на 92% состояла из лимфоцитов (табл. 4), преимущественно малых. Нейтрофилы были представлены большей частью сегментоядерными формами. Доля моноцитов наименьшая (2.5%).

Оз. Куэтсъярви (2005-2007гг.) Содержание гемоглобина у всех рыб варьировало от 78 до 104 г/л., в среднем - 90 г/л. Содержание эритроцитов колебалось от 0.90 до 1.70 млн/мм<sup>3</sup>. Среднее содержание гемоглобина в эритроците колебалось от 0.67 пг до 0.75 пг. Содержание незрелых эритроцитов варьировало от 0.40 до 2.70%, в среднем – 1.60% (табл. 3).

Таблица 3. Характеристика красной крови сигов в загрязняемых водоемах

водоемы	гемоглобин, г/л	эритроциты, млн/мм <sup>3</sup>	СГЭ, пг	незрелые эритроциты, %
Медно-никелевое производство				
оз. Куэтсъярви	$\frac{90 \pm 9}{78-104}$	$\frac{1.18 \pm 0.25}{0.90-1.70}$	0.75	1.6
г. Монче (оз. Имандра)	$\frac{90 \pm 2}{54-126}$	0.97±0.02	0.95	6.8
Апатит-нефелиновое производство				
г. Белая (оз. Имандра)	$\frac{80 \pm 3}{56-110}$	0.82±0.03	0.92	10.3
Бадделеит-apatит-магнетитовое производство				
оз. Ковдор	$\frac{116 \pm 3}{82-160}$	0.96±0.02	0.83	2.3

Влияние апатито-нефелинового производства. По результатам наших наблюдений у сигов в губе Белой (оз. Имандра) в 1996-1997 гг. концентрация гемоглобина равнялась  $80 \pm 3$  г/л. Общее количество эритроцитов в среднем составляло 0.82 млн./мм<sup>3</sup>, СГЭ – 92 пг. Число незрелых эритроцитов достигала 10.3% (табл. 3). У полихроматофилов часто была видна широкая неокрашенная зона вокруг ядра, т.е. накопление гемоглобина шло по периферии клетки. Предгемолизные клетки составляли 2.5%. В отдельных эритроцитах ядерное вещество выходило в цитоплазму без видимого нарушения клеточной оболочки ядра, в других случаях наблюдалась дегенерация ядра – оно увеличивалось в размерах и вследствие нарушения целостности ядерной оболочки содержимое ядра выходило в цитоплазму, заполняя строму эритроцита. Резистентность этих эритроцитов была резко снижена. Пойкилоцитоз и анизоцитоз были выражены слабо. Дегенеративно делящиеся эритроциты на мазке отмечались в единичных случаях, эритропластиды также были



немногочисленны. Лимфоциты являлись доминирующей группой, их доля в лейкоформуле достигала 89%. Количество моноцитов и нейтрофилов было равно соответственно 3.7 и 2.0% (табл. 4). Скорость оседания эритроцитов в среднем – 3.7 мм/ч.

Таблица 4. Характеристика белой крови сигов в загрязняемых водоемах

водоемы	ИОЛ	лимфоциты, %	нейтрофилы, %	моноциты, %
оз.Куэтсьярви	1.0±0.07	94.7±0.74	4.8±0.60	0.5±0.16
г. Монче (оз.Имандра)	0.92±0.2	92.1±1.2	2.5±0.3	5.4±0.7
г. Белая (оз.Имандра)	1.7±0.4	94.0±1.6	2.0±1.6	3.7±1.3
Йокостровская Имандра	0.96±0.3	89.1±2.0	6.7±0.8	4.2±1.2

Показано, что количественные показатели крови у рыб (содержание гемоглобина, количество эритроцитов и лейкоцитов) достаточно стабильны и мало зависят от уровня техногенной нагрузки. Среднее содержание гемоглобина в условно – фоновых водоемах варьирует от 90 до 120 г/л., в загрязняемых озерах обычно снижается до 80 – 90 г/л. Усиление эритропоза наблюдалось у сигов, выловленных вблизи сброса стоков промышленных предприятий: к-та "Североникель" и ОАО "Апатит". Усиление эритропоза служит общей защитной реакцией организма на действие какого-либо токсического фактора, поскольку молодые формы эритроцитов более устойчивы к действию повреждающих агентов.

У всех сигов белая кровь имеет выраженный лимфоидный характер. Содержание лимфоцитов находится на уровне 70-95%, преобладали малые и средние формы. Количество нейтрофилов значительно варьирует как в различных водоемах, так и в пределах одного стада сигов (от 5 до 30%), моноциты регистрируются в незначительных количествах (от 0 до 6%). Индекс обилия лейкоцитов позволяет оценить состояние иммунного статуса. В исследованных районах его величина в среднем колеблется от 0.5 до 1.2, у отдельных индивидов он может снижаться до 0.14 либо возрастать до 5.4. В относительно

благополучных по качеству воды водоемах, данный показатель обычно не достигал 1.

Более информативными являются качественные характеристики, отражающие патологии отдельных клеток. При воздействии химических агентов наблюдается массовый пикноз ядра. При кариорексисе ядро распадается на фрагменты. При хроматинолизе хроматин ядра теряет свою структуру и растворяется, что на мазке проявляется как пятно розового цвета на месте ядра. В цитоплазме чаще встречается вакуолизация. Вакуоли могут быть единичными крупными или многочисленными мелкими. Разрушение ядра, а также нарушение осморезистентности клеточной оболочки, в основном, наблюдаются у эритроцитов в условиях влияния сточных вод. Вакуолизация цитоплазмы отмечается в эритроцитах и в лейкоцитах, а вакуолизация ядра только у нейтрофилов. Кроме этого отмечены неспецифические нарушения морфологии форменных элементов крови: анизо- и пойкилоцитоз, полихромазия эритроцитов.

Гематологические показатели, представляют собой частный случай гистологических данных и могут служить индикатором состояния организма и условий его существования (Яхненко, 1984), поскольку кровь рыб чувствительно реагирует на интоксикацию разнообразными веществами. Происходящие гематологические сдвиги являются показателями характера и степени действия различных веществ.

#### Список литературы

Антропогенные изменения лотических экосистем Мурманской области. 2007. Часть 2: Озерно-речная система реки Чуна в условиях аэротехногенного загрязнения // под ред. Н.А. Кашулина. Апатиты: Изд-во Кольского НЦ РАН. 238 с.

Головина Н.А. Методы гематологических исследований в ихтиологической практике // В кн. Рыбохозяйственное использование внутренних водоемов. Вып. 4. 1979. С. 8-18.

Житенева Л.Д., Полтавцева Т.Г., Рудницкая О.А. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб. Ростов-на-Дону: Ростовское книжное издательство, 1989. 112 с.

Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 184 с.

Королева И.М. Гематологические показатели сигов в водоемах Кольского полуострова // Тез. Материалов Международной конференции

"Экологические проблемы северных регионов и пути их решения". Апатиты, 2004. С. 191-193.

Моисеенко Т.И. Гематологические показатели рыб в оценке их токсикозов // Вопр. ихтиологии. 1998. Т. 38, № 3. С. 371-380.

Яхненко В.М. Морфологическая характеристика крови рыб озера Байкал (эколого-эволюционные аспекты). Наука, Сибирское отделение, 1984. 120 с.

## **HEMATOLOGICAL INDICES OF COREGONID FISHES IN THE WATERS OF THE KOLA NORTH IN CONDITIONS OF ANTHROPOGENIC IMPACT**

I.M. Koroleva

Hematological parameters of whitefish (*Coregonus lavaretus*), occupied the watercourse with different levels of anthropogenic pollution, were examined. Content hemoglobin (Hb), red blood cell count, erythrocyte sedimentation rate, erythrocyte and leukocyte formula were measured, made cytomorphological analysis.

## **ВЛИЯНИЕ СЕРОТОНИНА И ХОЛЕЦИСТОКИНИНА НА ПИЩЕВОЕ ПОВЕДЕНИЕ И ПРОЦЕССЫ ПИЩЕВАРЕНИЯ У РЫБ**

В.В. Кузьмина

*ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанова  
РАН, 152742. п. Борок Ярославской обл., e-mail:*

[vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru)

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что состояние иммунной системы в значительной мере зависит от эффективности питания рыб. Последняя в свою очередь обусловлена не только количеством и качеством пищи, но и состоянием систем, связанных с поиском и потреблением пищи, а также статусом ферментных систем желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) рыб (Кузьмина и др., 2011). Реализация пищевого поведения рыб, включающего последовательную смену ряда фаз – рецептивной, пищевого возбуждения, поиска пищи, консуматорной и фазы покоя (Павлов, Касумян, 1998), находятся под нейрогуморальным контролем. Кроме того, количество и качество потребляемой пищи зависит от состояния сенсорных систем и энергетического баланса организма (обзор: Кузьмина, 2005).

В цитируемом обзоре подчеркивается, что пищевое поведение рыб регулируется многоканальной системой,

включающей все известные механизмы нервного и гуморального контроля, интеграция которых осуществляется в гипоталамусе при участии других структур мозга. Интеграция сигналов из внешней и внутренней среды организма также реализуется в гипоталамусе. В последние годы интенсивно исследуются центральные механизмы регуляции потребления пищи. Установлено, что питание стимулируют нейропептид Y, орексины, галанин, меланинконцентрирующий гормон, норадреналин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота,  $\beta$ -эндорфин, апелин, а ингибируют холецистокинин, бомбезин, кортиколиберин, кокаин- и амфетамин-регулируемый транскрипт (CART), тахикинины, серотонин, дофамин, гистамин,  $\alpha$ -меланоцитстимулирующий гормон, пептид YY, и другие пептиды и амины (Lin et al., 2000; Penney, Volkoff, 2014).

Схемы регуляции пищевого поведения, как правило, строятся на признании главенствующей роли ЦНС. Вместе с тем они, как правило, базируются на данных, касающихся лишь количества потребленной пищи, и не учитывают сложного процесса пищевого поведения. Периферическим факторам в регуляции пищевого поведения, в том числе эндокринным, отводится второстепенная роль. При этом процессы, происходящие в ЖКТ, рассматриваются, как фоновые. Однако ранее нами подчеркивалось их важное значение как поставщиков утилизонов – мономеров, образующихся в процессе пищеварения и играющих роль сигнальных молекул (Кузьмина, 2005).

Цель работы – показать на примере влияния серотонина (5-НТ) и холецистокинина (ХЦК) на пищевое поведение и процессы пищеварения у рыб роль периферических факторов в регуляции процессов экзотрофии у рыб.

Объекты исследования – карп *Cyprinus carpio* и обыкновенный карась *Carassius carassius*. Проведено несколько серий экспериментов. Во всех экспериментах по поведению формировались две группы рыб – контрольная и опытная, по 5 особей в каждой. Рыбам контрольных групп внутривентриально вводили 0.1 мл р-ра Рингера, рыбам опытных групп – 5-НТ (0.1 мл в дозе 10 мкг/г массы тела) или ХЦК (0.1 мл в дозе 100 нг/кг массы тела), приготовленные на р-ре Рингера для

пойкилотермных животных. Рыб после адаптации к условиям эксперимента помещали в перфорированные камеры с поднимающейся передней стенкой, расположенные на противоположной от корма стороне аквариума. Регистрировали время нахождения рыб в камере после подъема ее передней стенки, время, необходимое для достижения рыбами кормового пятна и рацион (количество личинок хирономид, потребленных за 3 мин). Условия экспериментов и методы определения протеолитической (ПА) и аμιлолитической (АА) активности слизистой оболочки кишечника подробно описаны ранее (Кузьмина и др., 2010, 2011). Данные обработаны статистически с использованием приложения EXCEL программы MS Office'XP, а также в программе STATISTICA 6.0. Достоверность результатов оценивали по критерию Стьюдента для малых выборок  $p < 0.05$ .

Влияние серотонина и холецистокинина на пищевое поведение карпа. Установлено, что внутрив брюшинные инъекции 5-НТ и ХЦК карасю и карпу вызывают значительно изменение их пищевого поведения. Оказалось, что двигательные характеристики рыб под влиянием 5-НТ и ХЦК изменяются разнонаправленно. Так, время пребывания у исследованных видов рыб в стартовом отсеке через 1 ч после введения 5-НТ достоверно увеличивается по сравнению с интактными особями на 55-60%, время достижения кормового пятна – на 70-80%. После введения ХЦК величины этих показателей достоверно снижаются на 40-50% и 60% соответственно. Изменение двигательных характеристик во времени в ряде случаев носит колебательный характер. Рацион через 1 ч после введения 5-НТ в разных сериях опытов уменьшается на 40-55% (рис.1). Затем наблюдается постепенное восстановление величины R. После введения ХЦК рацион в эти же сроки снижается в меньшей степени – максимум на 35% по сравнению с интактными рыбами. Важно отметить, что уменьшение рациона в обоих случаях кратковременно и, как правило, через сутки возвращается к норме.

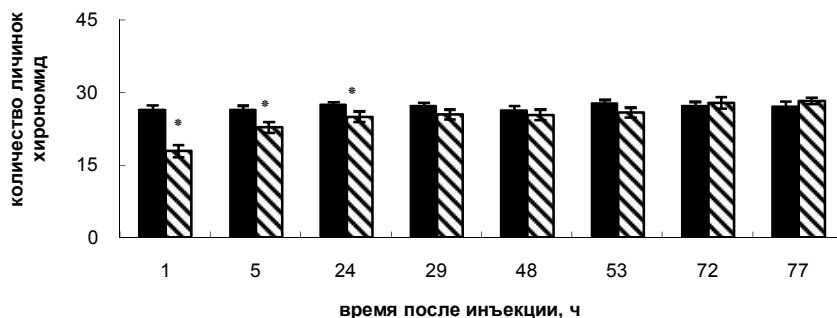


Рис.1. Влияние внутрибрюшинных инъекций серотонина на рацион карпа (по: Кузьмина и др., 2010).

Таким образом, 5-НТ и ХЦК, введенные периферически (внутрибрюшинно или внутримышечно), уменьшают двигательную активность и рацион рыб.

Влияние серотонина и холецистокинина на процессы пищеварения у карпов. В условиях *in vivo* под действием 5-НТ активность протеиназ и гликозидаз на протяжении эксперимента значительно варьирует (рис. 2).

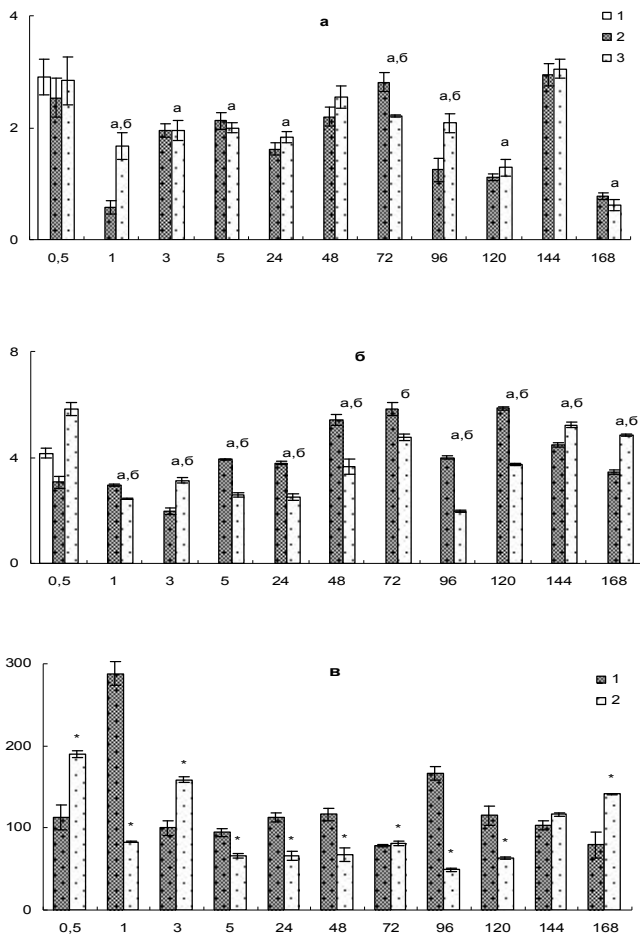


Рис. 2. Влияние серотонина на протеолитическую (а) и амилолитическую (б) активности слизистой оболочки кишечника карпа (по: Кузьмина, 2013).

Обозначения: по горизонтали – время после начала опыта, ч; по вертикали – уровень ферментативной активности, мкмоль/г·мин. 1 – интактные рыбы, 2 – контроль, 3 – опыт. «а» – различия достоверны по сравнению с интактными рыбами, «б» – различия достоверны по сравнению с контролем. На «в» по горизонтали – время после начала опыта, ч, по вертикали – уровень относительной активности протеиназ (1) и гликозидаз (2), % от контроля, принятого за 100.

Важно подчеркнуть, что под влиянием 5-НТ в первый срок наблюдения (0.5 ч) ПА не изменяется. Достоверное снижение показателя отмечено через 1-24 ч, а также через 72-120 и 168 ч после введения 5-НТ. Уровень АА, напротив, под действием 5-НТ повышается через 0.5 ч после его введения. Снижение АА наблюдается через 1-24 ч и 96 ч после начала эксперимента по сравнению с интактными рыбами. Сопоставление этих данных показывает, что во влиянии 5-НТ на активность пищеварительных гидролаз доминирует ингибирующий эффект. Также необходимо обратить внимание на разную динамику ПА и АА, вызванную введением серотонина: активность протеиназ первый раз после его введения возвращается к норме через 3 ч, активность гликозидаз – через 1 ч. В последующие сроки наблюдения колебательный цикл растягивается на несколько суток.

Под влиянием ХЦК уровень АА в течение суток увеличивается более, чем в полтора раза. Через 48 ч после введения гормона наблюдается резкое снижение АА. Через 72 ч после инъекции ХЦК активность ферментов достигает минимальных значений. При этом различия в величине АА у рыб опытной и контрольной группы минимальны. При этом значения АА у рыб опытных и контрольных групп сближаются. ПА у рыб контрольной и опытной групп достоверно увеличивается через 3 ч и сохраняется на несколько более низком уровне в течение всего опыта. Как и в случае АА, различия между ПА у рыб опытной и контрольной групп минимизируются (Кузьмина и др., 2011).

Таким образом, 5-НТ и ХЦК, введенные периферически, влияют на активность пищеварительных гидролаз. При этом 5-НТ действует разнонаправленно – уменьшает АА и увеличивает ПА по сравнению с таковой интактных рыб. ХЦК на исследованные ферменты влияет однонаправленно (увеличивает и АА, и ПА). 5-НТ в большей степени влияет на ПА, ХЦК – на АА.

При обсуждении представленных данных, прежде всего, следует отметить, что в многочисленных работах было доказано наличие в пищеварительном тракте рыб эндокринных клеток, входящих в состав гастро-энтеро-панкреатической (ГЭП)-системы (Ширкина, 1995; Пунин, 2001; Buddington, Kroghahl, 2004).



Большинство этих клеток синтезирует полипептиды, которые могут действовать локально (паракринные) или системно (эндокринные). Не вызывает сомнения вовлечение ГЭП-системы в регуляцию процессов пищеварения при участии таких гастроинтестинальных гормонов, как секретин, гастрин/холецистокинин, гастроингибирующий пептид (ГИП), глюкагон, вазоактивный интестинальный пептид (ВИП), мотилин, амилин и бомбезин. Показано, что клетки проксимального отдела кишечника, синтезирующие холецистокинин и секретин, способны регулировать экзокринные функции поджелудочной железы в соответствии с химическим составом химуса (Buddington, Krogdahl, 2004).

Кроме того, известно о наличии в слизистой переднего отдела кишечника рыб рецепторов (Краюхин, 1963), а также о том, что большая часть серотонина (до 98%) связана не с энтерохромаффинными клетками слизистой оболочки, а с серотонинергическими волокнами, расположенными в стенке кишечника (Саамаño-Tubío et al., 2007). Также продемонстрировано участие периферически введенных 5-НТ (Rubio et al., 2006; Кузьмина и др., 2010, Кузьмина, Гарина, 2013) и ХЦК (Кузьмина и др., 2011) в регуляции пищевого поведения рыб. Помимо 5-НТ и ХЦК, периферические сигналы включают такие факторы сытости, как глюкагон-подобный пептид-1, пептид YY, пептид, высвобождающий гастрин (GRP), бомбезинподобные пептиды и амилин (Volkoff, 2006).

Предполагается, что у млекопитающих сигналы сытости (ингибиторы питания), исходят из желудочно-кишечного тракта во время еды и через блуждающий нерв достигают ядра tractus solitarius в каудальной части мозгового ствола. Отсюда афференты волокон проецируют сигнал к аркуатному ядру, где сигналы сытости интегрируются с метаболическими сигналами (лептином и инсулином), а также с несколькими гипоталамическими и супрагипоталамическими стимулами. При этом нейроны аркуатного ядра секретируют орексигенные вещества (нейропептид Y и агути-родственный белок, AGRP) и анорексигенные пептиды (про-опиомеланокортин (предшественник АКТГ) и кокаин- и амфетамин регулируемый

транскрипт (CART). Помимо этого в латеральном гипоталамусе и периферикальной области гипоталамуса секретируются орексигенные вещества (орексин-А и меланин концентрирующий гормон), а паравентрикулярное ядро (PVN) производит анорексигенные пептиды – тиреотропин релизинг гормон, кортикотропин релизинг гормон и окситоцин (Valassi et al., 2008).

Эта схема хорошо сочетается со схемой пищевого поведения рыб (Павлов, Касумян, 1998). Действительно, рецептивная фаза (фаза готовности к проявлению пищевого поведения) и фаза пищевого возбуждения обусловлены сигналами, исходящими от интероцепторов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и различных тканей, сигнализирующих ЦНС о состоянии резервов. При этом стадия поиска пищи невозможна без участия экстракорпоральных сенсорных систем, таких как зрение, обоняние, вкус и другие. Повидимому, именно на этом этапе происходит интеграция сигналов из периферии о состоянии ЖКТ и метаболизма, а также экстракорпоральных сенсорных систем, в результате которой инициируется синтез факторов, стимулирующих поиск и потребление объектов питания. После реализации консуматорного акта и поступления пищи в ЖКТ информация от рецепторов растяжения стенки желудка или проксимальной части кишки, а также хеморецепторов поступает в ЦНС. Лишь после этого наступает фаза покоя. При этом продолжительность фазы покоя в значительной степени зависит от эффективности процессов пищеварения, обусловленных состоянием ферментных систем ЖКТ, и поступивших во внутреннюю среду организм нутриентов и метаболитов. Особую роль при этом играют (ГЭП)-система и интероцепторы ЖКТ и различных тканей. Таким образом, имеющиеся сведения свидетельствуют о значительной роли периферических факторов в регуляции пищевого поведения и пищеварения у рыб.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 09-04-00075 и № 13-04-00248).

#### Литература

Краюхин Б.В. Физиология пищеварения пресноводных костистых рыб // М.-Л.: Изд. АН СССР. 1963. 129 с.

Кузьмина В.В. 2005. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М.: Наука. 300 с.

Кузьмина В. В. Влияние серотонина на активность пищеварительных гидролаз у карпа // Пробл. биол. продукт жив. 2013. №4. С. 53-60.

Кузьмина В.В., Гарина Д.В. Влияние периферически введенного серотонина на пищевую и двигательную активность карпа *Cyprinus carpio* L. // Биол. Внутр. Вод. 2013. №1. С. 73-81.

Кузьмина В.В., Ушакова Н.В., Русанова П.В. Влияние экзогенного серотонина на пищевое поведение карпа *Cyprinus carpio* L. // Вестн. Морд. ун-та. 2010. № 1. С. 59–64.

Кузьмина В.В., Гарина Д.В., Семенова Е.М., Докучаева А.В., Русанова П.В., Куливацкая Е.В. Влияние серотонина и холецистокинина на процессы экзотрофии у карпа *Cyprinus carpio* L. // В кн.: Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. Изд. РГАУ-МСХА им. К.А.Тимирязева. 2011. С. 129-133.

Павлов Д.С., Касумян А.О. Структура пищевого поведения рыб // Вопр. ихтиологии. 1998. Т. 38. № 1. С. 123-136.

Пунин М.Ю. Кишечная регуляторная система безпозвоночных животных и ее предполагаемая эволюция у многоклеточных // СПб ЗИН РАН. 2001. Т. 290. 166 с.

Ширкина Н.И. Строение и гистотопография гастроэнтеропанкреатической эндокринной системы костистых рыб // Морфология. 1995. Т. 108. № 3. С. 78-83.

Buddington, RK; Krogdahl, A. Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. *Compar. Biochem. Physiol.* 2004. V. 139 A. P. 261–271.

Саамаño-Tubío R.I., Pérez J., Ferreira S., Aldegunde M. Peripheral serotonin dynamics in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Compar. Biochem. Physiol.* 2007. V. 129 C. P. 245–255

Lin, X, Volkoff, H, Namaware, Y, Bernier, J, Peyon, P, Peter, RE. Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. *Compar. Biochem. Physiol.* 2000. V. 126 A. P. 415–434.

Rubio V.C., Sanchez-Vazquez F.J., Madrid J.A. Oral serotonin administration affects the quantity and the quality of macronutrients selection in European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. // *Physiol. Behavior.* 2006. V. 87. P. 7–15.

Valassi E., Scacchi M., Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2008. V. 18. P. 158–168.

Volkoff H. Neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine-related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish. *Compar. Biochem. Physiol.* 2006. V. 142 A. P. 325 – 331.

Penney C.C., Volkoff H. Peripheral injections of cholecystokinin, apelin, ghrelin and orexin in cavefish (*Astyanax fasciatus mexicanus*): Effects on feeding and on the brain expression levels of tyrosine hydroxylase, mechanistic target of rapamycin and appetite-related hormones // *Gen. Compar. Endocrinol.* 2014. V.196. P.34-40.

## ФЕНОДЕВИАНТЫ СЕМЕННИКОВ ТИХООКЕАНСКИХ ЛОСОСЕЙ: НОРМА ИЛИ ПАТОЛОГИЯ?

Е.В. Микодина

*Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного  
хозяйства и океанографии, Москва, Россия, e-mail:  
[mikodina@vniro.ru](mailto:mikodina@vniro.ru)*

Феномен фенодевиантов семенников у рыб появился относительно недавно: его описания относятся к 1990 годам XX века. Изменения формы семенников впервые были обнаружены у рыб из Норило–Пясинской озёрной системы и впервые были названы фенодевиантами (Савваитова и др., 1995; Павлов и др., 1999; Чеботарёва, Савоскул, Савваитова, 1998). Такие же изменения наряду с другими морфологическими аномалиями были описаны у сиговых рыб Coregonidae оз. Севан (Решетников, 1998). Позднее они регистрировались в водоёмах Палеарктики также у сигов (Лукина, 2014; Шарова, Лукин, 2000). Нами в 2009 г. при фоновой оценке состояния здоровья представителей ихтиофауны Тазовской губы Гыданского залива Карского моря фенетическими методами, у 5 видов сиговых рыб (пыжьян *Coregonu slavaretus pidschian*, ряпушка *C. sardinella*, пелядь *C. peled*, муксун *C. muksun*, чир *C. nasus*) также обнаружены фенодевианты семенников, причём только у чира и в единичном количестве – 2% (Пресняков и др., 2010), что в пределах нормы (Кирпичников, 1987). Таким образом, первые документированные случаи обнаружения фенодевиантов семенников относятся к сиговым рыбам.

Практически с того же времени, начиная с 1998 г. и позднее, разнообразные отклонения от описанной еще в 1939 г. (Кулаев, 1999) классической формы семенников циприноидного типа – фенодевианты, также стали встречаться у самцов тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus*, обитающих в природных условиях пресноводных водотоков и водоёмов тихоокеанского бассейна, в исключительной экономической зоне (ИЭЗ) Тихого океана. У видов этого рода нами описано 25 типов фенодевиантов.

Наиболее часто встречаются перетяжки, перехлесты, фрагментация, добавочные доли, гипо- и гипертрофия гонад, перекручивание семявыводящего протока (Микодина, Пукова, 2002; Микодина и др., 2013). Установлено, что при перетяжках генеративная ткань заменяется соединительной, что создаёт препятствие для выведения спермы (Пукова, 2002; Пукова и др., 2002). Столь широкое разнообразие фенотипических семенников, частота встречаемости которых достигает во многих выборках 100%, среди представителей отряда лососеобразных выявлено только у тихоокеанских лососей. Обращает внимание тот факт, что другие морфологические или анатомические аномалии у представителей рода *Oncorhynchus* крайне редки. Зарегистрированы два случая поймок гермафродитов кеты: один в 2001 г. в Северо-Курильской (Микодина и др., 2002), другой – в 2008 г. в Петропавловско-Командорской промысловых подзонах Тихого океана. В 2002 г. в Восточно-Сахалинской подзоне поймана 1 самка кеты с искривлением тела, а в 2008 г. в Петропавловско-Командорской подзоне выловлены 1 нерка с клювовидной формой головы и 1 чавыча с верхним ртом. Следует подчеркнуть, что во всех исследованных районах Тихого океана самки тихоокеанских лососей с анатомическими отклонениями яичников не встречались.

Степень анатомической модификации гонад у самцов тихоокеанских лососей различна. В пределах одного вида у части особей видоизменены оба семенника или только правый, или только левый (табл. 1). У кеты из прикурильских вод Тихого океана в период с 09 июля по 06 сентября 2003 г., когда общая доля самцов с фенотипическими вариациями варьировала между 18.5 и 100%, фенотипическим преимущественно являлся также левый семенник (18.5–73.9%), встречаемость фенотипических отклонений в правой гонаде была существенно меньшей (0 – 46.4%).

Доля самцов тихоокеанских лососей с фенотипическими семенниками в период 1998-2003 гг. в разных выборках варьировала от 8 до 100%. По опыту В.С. Кирпичникова (1987), число аномалий в анатомии рыб в природе не превышает 6.7%. Высокая доля регистрируемых аномалий строения семенников у

лососей приводит к необходимости анализа возможных причин их возникновения.

Таблица 1. Ассиметрия распределения доли самцов с фенотипическими отклонениями семенников у тихоокеанских лососей из Восточно-Сахалинской промысловой подзоны

Период 2002 г.	Число самцов	Доля самцов с фенотипическими отклонениями, %		
		общий	правый семенник	левый семенник
кета				
03 июня – 12 августа	310	63	22	59
нерка				
13 июня – 06 августа	305	44	27	29
кижуч				
10 июля – 14 августа	123	37	13	27

Ранее были проанализированы некоторые возможные воздействия, приводящие к возникновению фенотипических отклонений именно у тихоокеанских лососей, в числе которых рассматривали природный полиморфизм строения семенников, антропогенное загрязнение среды обитания, географию обитания популяций, изменения климата (Волобуев, Марченко, 2011; Микодина, Пукова, 2002; Пукова и др., 2002). Представляет интерес дополнительно рассмотреть такие факторы, как влияние систематического положения видов, отражающего течение эволюционного процесса, патологии внутренних органов, обусловленной воздействием на морфогенез органов и тканей лососей загрязнения окружающей среды, что позволит решить фундаментальный вопрос о статусе обнаруженных аномалий – норма или патология. Для решения поставленной задачи нами использованы методы патологической анатомии: сравнительная (частота, локализация, качественные показатели процесса), географическая (особенности найденной патологии, обусловленные геологическими, климатическими и иными факторами среды обитания), функциональная патологии (физиология, биохимия органа).

Важно отметить, что все имевшиеся ранее описания фенотипических отклонений семенников и частоты их встречаемости, вначале касались сиговых рыб (семейство сиговые *Coregonidae*, отряд лососеобразные *Salmoniformes*), обитающих в сильно загрязнённых водоёмах (Сидоров, Решетников, 2014). Примечательно, что практически одновременно подобные

аномалии семенников были описаны у карповых рыб (семейство *Cyprinidae*, отряд *Cypriniformes*) из водоёма-охладителя Чернобыльской АЭС в послеаварийный период (Белова, 2012; Белова и др., 1998), т.е. также у живших в загрязнённой среде обитания рыб. Таким образом, фенотипические семенников, наряду с аномалиями других органов, регистрируются у разных видов рыб, обитающих в условиях загрязнения водной среды. Это позволяло считать данное явление патологией рыб разных, эволюционно далеко отстоящих друг от друга таксонов, вызванной неблагоприятными факторами среды обитания.

Возможное влияние таксономического статуса рыб на возникновение у самцов фенотипических гонад можно оценить, исследовав данный феномен у других лососевых *Salmonidae* рыб, представителей второго семейства отряда лососеобразных. По нашим данным, у самцов из этого семейства при отсутствии аномалий других органов фенотипические семенников обнаружены у семи представителей рода *Oncorhynchus*: горбуши *O. gorbuscha*, кеты *O. keta*, кижуча *O. kisutch*, нерки *O. nerka*, симы *O. masou*, чавычи *O. tshawytscha*, камчатской семги (микижи), а также у двух представителей рода *Salvelinus*: мальмы *Salvelinus malma* и североамериканской палии *S. fontinalis*. У гольцов доля самцов с фенотипическими семенниками составляет 2.2–8.3%. Это позволяет заключить, что в пределах отряда лососеобразных фенотипические семенников отмечают преимущественно у таких представителей семейства лососевых как виды рода *Oncorhynchus*.

Географическая изменчивость может быть проиллюстрирована встречаемостью фенотипических гонад в разных регионах тихоокеанского бассейна. Они обнаружены у тихоокеанских лососей, пойманных разных водотоках российского Дальнего Востока: североохотоморского побережья (рр. Армань, Яна, Тауй, Кулькуты), на западном побережье Татарского пролива (лиман р. Май, бухта Юго-Западная), о. Сахалин (рр. Ударница, Калининка, Найба, Тымь, Пиленга, Поронай, а также оз. Тунайча), п-ва Камчатка (рр. Большая, Облуковина, Плотникова, Большая Воровская, Палана, Пахача, Апука), а также в различных районах ИЭЗ Тихого океана

(Западно-Беринговоморском, Карагинском, Петропавловско-Командорском, Петропавловско-Камчатском, Северо- и Южно-Курильском, Североохотоморском, Восточно-Сахалинском).

Кроме этого, доля самцов с фенотипическими семенников подвержена сезонной, видовой и межгодовой изменчивости. Так, например, в период с июня по август 2000 г. всеверо-западной Пацифике у кеты, горбуши, кижуча, нерки доля самцов с фенотипическими семенников варьировала от 8.3 до 30.8% (табл. 2). В 2002 г. в Карагинском заливе Берингова моря средняя доля фенотипических у горбуши была равна 19%, у кеты – также 19, в 2003 г. у кеты составляла 17%; у кеты Восточно-Сахалинской промысловой подзоны этот показатель в среднем был равен 73%. В 2003 г. у кеты *Oncorhynchus keta* в прикурильских водах Тихого океана доля самцов с фенотипическими семенников варьировала от 18.5 до 100%, причём у 77% самцов она превышала 50%. В 2012 г. доля самцов с фенотипическими была меньше: у горбуши и кеты из Олюторского залива она была равна соответственно 17 и 29%, у горбуши из зал. Мордвинова составляла 53%, у горбуши и кеты о-ва Итуруп – 19 и 50% соответственно. В среднем этот показатель наибольший у кеты, наименьший у горбуши.

Таблица 2. Доля самцов тихоокеанских лососей из разных промысловых подзон северо-западной Пацифики с анатомическими нарушениями в гонадах (%,) 2000 г.

Кета	Горбуша	Кижуч	Нерка
Западно-Беринговоморская подзона, июль			
9.7	не было лова	не было лова	46.7
Петропавловско-Камчатская подзона, июнь-июль			
25.9	10.7	30.8	30
Петропавловско-Командорская подзона, июнь-июль			
не было лова	не было лова	не было лова	17.4
Карагинская подзона, август			
11.6	не было лова	28.6	8.3
Камчатско-Курильская подзона, июль			
26	15.1	26.7	12.5
Северо-Курильская подзона, август			
15.4	9.5	14.3	12.5

Показатель встречаемости фенотипических семенников, как правило, уменьшается (или не изменяется) от начала к концу



морской преднерестовой миграции в Тихом океане (табл. 3), в реках он меньше, чем в океане.

Таблица 3. Сезонная динамика доли самцов кеты с семенниками-фенодевиантами, выловленных в прикурильских водах Тихого океана в 2003 г.

Месяц	Число самцов		
	всего, шт.	с фенодевиантами семенников	
		шт.	%
Июнь	300	152	<u>50.7</u> 18.5-76.7
Июль	249	197	<u>79.9</u> 62.5-100
Август	194	154	<u>79.4</u> 72.4-87.0

Морфофункциональные показатели самцов тихоокеанских лососей с фенодевиантами семенников отличаются от самцов с нормальными гонадами большей вариабельностью. При этом средние масса самцов и их гонад, а также объём продуцируемой спермы у них меньше, чем у особей с нормальными семенниками (табл. 4).

Биохимические исследования спермы, полученной от самцов кеты с фенодевиантами семенников в заводских условиях, и их сравнение с аналогичными показателями анатомически нормальных особей показывают, что у первых достоверно снижена активность таких ферментов-индикаторов как аспартат- и аланинаминотрансферазы: в 2.8 и 2.5 раз соответственно (табл. 5), что свидетельствует об ухудшении её качества.

Таблица 4. Репродуктивные показатели самцов кеты с нормальными семенниками и фенодевиантами в период морской преднерестовой миграции из прикурильских вод Тихого океана, 2003 г.

M lim	Масса самцов, кг		Масса гонад, г		ГСИ, %		Объём спермы, мл	
	норма	фенодевианты	норма	фенодевианты	норма	фенодевианты	норма	фенодевианты
		3.9±1.0 3.3-5.5	3.7±0.82 2.2-4.9	134.5±18.8 118.0-161.0	127.0±29.1 80.0-186.0	3.7±0.5 3.1-4.3	3.7±0.6 2.5-5.2	29.0 22.0-35.0
n	4	21	4	21	4	21	4	21

Таблица 5. Биохимические и рыбоводные показатели кеты с разной анатомией гонад в нерестовый период 2001 г., Охотский ЛРЗ, о-в Сахалин (\* –  $p < 0.001$ )

Показатель	Семенники	
	нормальные	фенодевианты
Активность аспаратаминотрансферазы (АсАТ) спермы, МкМ ПВК/ мг белка в час	320.5±93.29	113.5±20.36*
Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) спермы, МкМ ПВК/ мг белка в час	335.5±94.95	133.8±19.72*
Объём эякулята, мл	27.1±6.23	21.4±2.00*
Относительная «плодовитость», %	0.71±0.127	0.57±0.047*

Рыбоводные показатели спермы, полученной от самцов с фенодевиантами семенников, также ухудшены: на 20% уменьшены объём продуцируемой спермы и относительная «плодовитость» (объём эякулята/масса самца). Эти данные свидетельствуют об ухудшении состояния здоровья самцов с фенодевиантами семенников, что отражается в снижении качества половых продуктов.

Число регистрируемых самцов тихоокеанских лососей с гонадами-фенодевиантами демонстрируют географическую, видовую, межгодовую, сезонную изменчивость. У таких самцов выявлена высокая вариабельность морфофизиологических и рыбоводных показателей. Биохимические маркёры (АсАТ и АлАТ) свидетельствуют о том, что наличие самцов с семенниками-фенодевиантами является патологией. Однако, с учётом данных о высокой численности тихоокеанских лососей, сопровождавшейся уменьшением их биологических показателей в исследуемый период (Кловач, 2003), можно констатировать, что в их популяциях реализуется механизм адаптивной саморегуляции численности через снижение воспроизводительной способности у большинства самцов.

#### Список литературы

Белова Н.В., Емельянова Н.Г., Макеева А.П. и др. Состояние воспроизводительной системы самцов белого (*Hypophthalmich thysmolitrix*) и пестрого (*Aistich thysnobilis*) толстолобиков в водоёме-охладителе Чернобыльской АЭС в послеварийный период // Проблемы репродуктивной биологии в трудах профессора С.И. Кулаева и его последователей. М.: МГУ, 1998. С. 270-286.

Белова Н.В. Радиационное воздействие на репродуктивную систему рыб. Последствия Чернобыльской катастрофы. PalmariumAcademicPublishing, 2012. 168 с.

Волобуев В.В., Марченко С.Л. Тихоокеанские лососи континентального побережья Охотского моря (биология, популяционная структура, динамика численности, промысел). Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2011. 303 с.

Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. Л.: Наука, 1987. 520 с.

Кловач Н.В. Экологические последствия крупномасштабного разведения кеты. М.: Изд-во ВНИРО, 2003. 164 с.

Кулаев С.И. 1998. Годовые циклы и шкалы зрелости семенников некоторых видов костистых рыб и их сравнительно-эмбриологический и промысловый анализ. (Докторская диссертация, Москва, 1939) // Проблемы репродуктивной биологии в трудах профессора С. И. Кулаева и его последователей. М.: МГУ. С. 23–161.

Лукина Ю.Н. Проблемы здоровья рыб в водных экосистемах Европейско-Сибирской области Палеарктики. Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. Петрозаводск, 2014. 36 с.

Микодина Е.В., Пукова Н.В., Хоревин Л.Д., Коваленко С.А. О редком случае гермафродитизма у тихоокеанских лососей // Морфологические и физиологические особенности гидробионтов. Мат-лы межрегион. конф., 2002. С. 18–22.

Микодина Е.В., Пукова Н.В. Методические рекомендации по изучению фенотипов семенников у дальневосточных лососей. М.: Экономика и информатика, 2002. 93 с.

Микодина Е.В., Кловач Н.В., Углова Т.Ю., Новосадов А.Г. Репродуктивная система тихоокеанских лососей Сахалино-Курильского региона как зоны радиационного риска после аварий на ядерных объектах Японии в 2011 г. // Воспроизводство естественных популяций ценных видов рыб. Мат-лы докл. 2-й междунауч. конф. 16-18 апреля 2013 г. Санкт-Петербург, 2013. С. 252–255.

Павлов Д.С., Савваитова К.А., Груздева М.А. и др. Систематика, экология, структура видов как основа биоразнообразия в высших широтах, современное состояние в условиях антропогенного воздействия // Разнообразие рыб Таймыра, 1999. М.: Наука. 207 с.

Пресняков А.В., Микодина Е.В., Макоедов А.Н. 2010. Опыт оценки здоровья сиговых рыб Тазовской и Обской губ двумя фенетическими методами // Биология, биотехника разведения и состояние запасов сиговых рыб. Мат-лы Седьмого международного научно-производственного совещания (Тюмень, 16-18 февраля 2010 года). Тюмень: Госрыбцентр, 2010. С. 140-144.

Пукова Н.В. Особенности строения и развития репродуктивной системы кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) в жизненном цикле. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.: ВНИРО, 2002. 23 с.

Пукова Н.В., Микодина Е.В., Королев А.Л., Новиков А.В. Полиморфизм семенников у дальневосточных лососей р. *Oncorhynchus* // Экологическая физиология и биохимия рыб в аспекте продуктивности водоемов. Труды ВНИРО, 2002. Т. 141. С. 152–166.

Решетников Ю.С. Современное состояние и перспективы изменения запасов рыб // Биология сиговых рыб, 1988. М.: Наука. С. 5–17.

Савваитова К.А., Чеботарева Ю.В., Пичугин М.Ю., Максимов С.В. Аномалии в строении рыб как показатели состояния природной среды // Вопр. ихтиологии, 1995. Т. 35. Вып. 2. С. 182–188.

Сидоров Г.П., Решетников Ю.С. Лососеобразные рыбы водоёмов европейского северо-востока. М.: Т-во научных изданий КМК, 2014. 346 с.

Чеботарева Ю.В., Савоскул С.П., Савваитова К.А. 1998. Аномалии в строении воспроизводительной системы самцов рыб Норило-Пясинской водной системы (Таймыр) // Вопр. ихтиологии, 1998. Вып. 5. С. 653–659.

Шарова Ю.Н., Лукин А.А. 2000. Система воспроизводства сига *Coregonus lavaretus* в условиях многофакторного загрязнения // Вопр. ихтиологии. Т. 40. Вып. 3. С. 425-428.

## **PACIFIC SALMON TESTES PHAENODEVIANTS: THE NORM OR PATHOLOGY?**

E.V. Mikodina

In males of 7 Pacific salmon species of genus *Oncorhynchus* the 25 types of testes phenodeviants were described. The percentage of such fish susceptibles to the inter-annual, seasonal, geographical and species variability, ranging from 8 up to 100%. Possible causes of these phenomena are discussed. The high variability of morphological and hatcheries fish indices in Pacific salmon males with phenodeviants with reduction of fish and gonads weight, semen volume and relative «fertility» are revealed. Biochemical markers (AsAT and AlAT) indicate that the presence of males with testes-phenodeviants are an adaptive pathology related with self-regulation of populations number.

## **ИММУНО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ В ОРГАНИЗМЕ РЫБ В ПЕРИОД РАЗМНОЖЕНИЯ**

В.Р. Микряков, В.И. Мартемьянов

*Институт биологии внутренних вод РАН, Борок Ярославской  
обл., Россия, e-mail: [mvr@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:mvr@ibiw.yaroslavl.ru)*

Размножение является одним из важнейших звеньев жизненного цикла рыб, обеспечивающее воспроизводство себе подобных и сохранения вида в онто- и филогенезе (Никольский, 1965). Процесс размножения состоит из ряда циклически повторяющихся периодов: преднерестового, нереста, посленерестового и нагула. Каждый период отличается особенностями структурно-функционального состояния нейроэндокринной, водносолевой, метаболической, иммунной и воспроизводительной системах (Лав, 1976; Микряков, 1978;

Запруднова, Мартемьянов, 1988; Мартемьянов, 2001, 2004; Запруднова 2003 и др.). Эти различия обусловлены отклонением ионного гомеостаза перераспределением энергии для обеспечения созревания половых продуктов и осуществления икрометания, восстановления и формирования новой генерации половых продуктов. Наблюдаемые в период воспроизводства изменения носят аналогичный для общего адаптационного синдрома по Селье (1960), как это имеет место при стрессе, характер.

Как и при стрессе, у производителей рыб в преднерестовый период зарегистрировано усиление активности защитных функций, связанных с общим адаптационным синдромом. Незадолго до нереста у различных видов рыб наблюдается повышение активности гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы, выбрасывающей в кровотоки нейрогормоны преоптико-гипофизарной нейросекреторной системы. Гормоны гипофиза с током крови достигают интерреналовую железу (Баранникова и др., 1978; Васильева, Баранникова, 1978), стимулируя выброс в кровоток различных кортикостероидов (Баранникова и др., 1978; Васильева, Баранникова, 1978), в том числе кортизола (Wingfield, Grimm, 1977). Кортикостероиды осуществляют переход на катаболический путь обмена за счет ускорения глюконеогенеза, процесса образования глюкозы из неуглеводных источников, в том числе и белка.

Перед нерестом происходит снижение концентрации белков и аминокислот в сыворотке крови и тканях рыб. Результатом усиления глюконеогенеза и расщепления гликогена, главным образом в печени, является повышение содержания глюкозы в плазме крови, в том числе и перед нерестом, ее последующее использование на энергетические нужды организма. В преднерестовый период также происходит резкое снижение количества депонированного жира в теле и различных органах и тканях рыб, что свидетельствует об увеличении доли липолиза в энергетическом обмене.

Одновременно в преднерестовый период у рыб усиливается активность симпатической нервной системы, сопровождаемая повышением в крови концентрации катехоламинов.

Катехоламины через бета-адренергические рецепторы усиливают скорость поглощения кислорода жабрами за счет увеличения дыхания, жаберного тока крови, диффузионной емкости жабр и транспортной емкости крови для кислорода. Установлено, что перед нерестом повышается уровень потребления кислорода всем организмом и отдельными тканями. Кроме того, катехоламины усиливают гликогенолиз (Mommensen et al., 1988) и аэробный обмен посредством увеличения концентрации субстратов цикла Кребса. Показано также, что перед нерестом возрастает активность ферментов цикла Кребса.

В связи с активизацией генеративного обмена резко увеличивается расход запасных энергетических веществ (углеводов, липидов и белков). Концентрация холестерина,  $J_2$ ,  $J_3$ , в – глобулинов, липопротеинов, ионов  $Mg^{2+}$ , фосфолипидов, аргинина, гистидина, содержание воды в тканях, кортизона и кортизола в крови нарастает. Если многие органические вещества в тканях рыб снижаются, то в половых продуктах, наоборот, повышаются. В этот период показатели иммунитета по сравнению с зимним периодом претерпевают значительные сдвиги. Прежде всего, это сказывается на доле рыб, имеющих максимальные уровни БАСК (от 76 до 100 %), т.е. на долю рыб, относящихся к 5-му классу. Доля рыб этого класса уменьшается до 15 % против 40 % в зимний период. Одновременно с этим повышается доля рыб 3 и 4 классов с уровнем антимикробных свойств 26 – 50 и 5-75 %. Величины 1 и 2 классов, куда относятся лещи с низкими показателями иммунитета, в этот период не меняются.

На фоне усиления общего адаптационного синдрома, происходит преобладание защитных функций, связанных с поддержанием ионного гомеостаза. Так, перед нерестом у плотвы зарегистрировано достоверное повышение концентрации натрия на 10.1 % и снижение калия в 6.2 раза в плазме крови (Запруднова, Мартемьянов, 1988).

Перед нерестом существенно уменьшается уровень калия в плазме крови плотвы и других видов рыб (Запруднова, Мартемьянов, 1988). Снижение уровня калия в плазме крови вызывает увеличение градиента концентрации по этому катиону между клетками тканей и внеклеточной жидкостью, приводя к

росту мембранного потенциала клеток тела. Мембранный потенциал – источник физической энергии, используемой на осуществление разнообразных функций клетки, включая усиление активности ферментов, связанных с мембраной. Физиологическая активность организма рыб перед нерестом сопровождается увеличением использования как химической (АТФ), так и физической (мембранный потенциал) форм энергии.

В преднерестовый период на фоне усиления общего адаптационного синдрома происходит преобладание защитных функций, способствуя повышению уровня резистентности производителей. Показано, что в этот период наблюдается повышение устойчивости к стрессорным воздействиям (Запруднова, Мартемьянов, 1988), увеличение теплоустойчивости мышц (Алтухов, 1963), снижение концентрации кальция в эритроцитах и мышечной ткани (Мартемьянов, 2001). Уменьшение содержания кальция внутри клеток ведет к стабилизации цитоскелета, обуславливая повышение устойчивости к любым повреждающим факторам на клеточном уровне. Об этом свидетельствуют данные исследования БАСК и доли содержания МДА и ИМР особей (табл. и рис.).

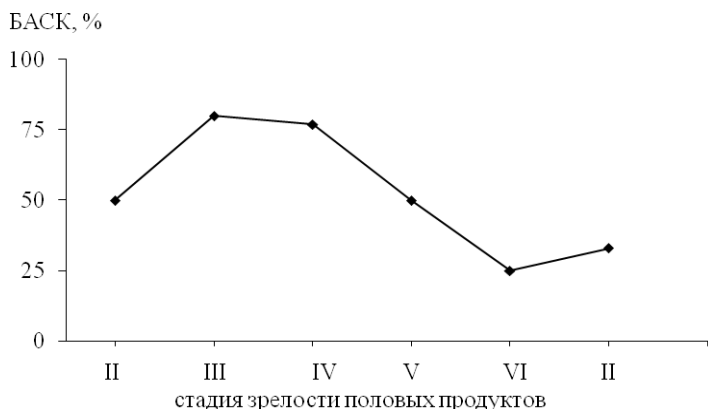


Рис. Динамика антимикробных свойств сыворотки крови леща в зависимости от стадии созревания половых продуктов.

Таблица. Распределение рыб по классам БАСК в различные периоды годового цикла, %.

Период годового	n	БАСК	Классы					
		M+m	1	2	3	4	5	

цикла							
преднерестовый	300	51±7.0	5±2.1	7±2.9	27±5.6	47±3.8	15±2.1
нерестовый	356	46±12.3	18±3.0	10±2.8	15±1.9	22±1.8	35±3.8
посленерестовый	490	33±7.1	30±7.2 <sup>x</sup>	5±1.9	20±2.8	26±4.6	19±2.3
нагульный	1000	70±8.1	9±7.6	4±2.2	8±2.4	23±3.1	58±6.7
зимовка	330	63±7.2	7±2.0	6±1.3	12±3.2	33±2.4	42±3.8

Примечание: <sup>x</sup> – в соответствии с условиями нереста и предшествующей подготовки рыб к зимовке число иммунодефицитных особей в после нерестовый период в отдельные годы может колебаться от 6 до 66 %; n – число рыб.

Напротив, нерестовый период является переломным периодом в жизненном цикле рыб. В это время происходит выметывание половых продуктов, требующее огромных энергетических затрат. В обменные процессы включаются структурные фракции липидов (фосфолипидов) и белков. Падают показатели холестерина, альбумина, гликогена, β-глобулина; процессы диссимилиации преобладают над ассимиляцией (Шатуновский, 1980; Решетников, 1980). Среди лещей исследуемой популяции в период нереста нарастает доля рыб с иммунодефицитным состоянием. К ним относятся рыбы 1 и 2 классов, т.е. тех, сыворотки которых не подавляли развития микробов или угнетали очень слабо (1 – 25 %). Число таких рыб в популяциях достигает около 25 %, что более чем в 1.5 – 3 раза выше, чем в предшествующий период. Частота встречаемости рыб 3 и 4 классов больше, чем в 2 раза падает, а 5-го, наоборот, нарастает против таковых показателей перед нерестом. На вопрос о том, какие факторы обуславливают повышение числа лещей 5-го класса, имеющих высокие показатели иммунитета, ответить не представляется возможным. Вполне вероятно, что они обусловлены активизацией всех процессов перед началом нереста, в том числе иммунологических, приводящих к активации синтеза антибиотических факторов иммунитета: лизоцима, комплемента, лизоцинов, лейкинов, пропердина и т.д.

Посленерестовый период, является одним из наиболее узких мест годового цикла. Значительная часть отнерестившихся особей сильно истощается. У таких рыб резко падают показатели гемоглобина, коллоидной устойчивости, осмотического давления сыворотки крови, содержание жира в тканях становится



минимальным, а воды, наоборот, нарастает (Мартемьянов, 2004). Снижается функция нейро-эндокринной системы. Вследствие сильного истощения, вызванного нерестом, большинства рыб погибает. Как правило, у таких рыб нарушаются отношения паразит-хозяин, приводящие к появлению массовых эпизоотий. Посленерестовый период для рыб Рыбинского водохранилища отражается не только на физиолого-биохимических показателях состояния организма (Микряков, Силкина, 1980), но и на функциональной активности иммунной системы. Наглядным подтверждением этому является резкое повышение иммунодефицитных особей в среднем до 30-35%, тогда как число лещей 4-5 классов, наоборот, уменьшается. По-видимому, нерест на рыб оказывает глубокое иммунодепрессивное воздействие, вследствие чего доля сильных иммунореактивных особей в первый период после нереста резко снижается. Возможно, этот период, когда в популяциях нарастает доля иммунодефицитных особей (или слабо иммунореактивных рыб), является причиной нарушения отношений паразит-хозяин и появления массовых эпизоотий в водоемах.

В основе этого, видно, лежат не только глубокие физиолого-биохимические сдвиги организма, но истощение структурных образований, отвечающих за регуляцию иммунного ответа рыб. Об этом, в частности, свидетельствуют данные исследований Тамура и Хонма (Tamura, Honma, 1974), по изучению гистологических изменений тимуса рыб в разные периоды года. Ими на ряде видов лососевых, бычков, пескарей отмечено, что тимус в процессе созревания половых продуктов претерпевает существенные сдвиги. Перед нерестом повышается размер (объем) тимуса, содержание в нем лимфоцитов, после нереста происходит атрофия и инволюция тимуса, сопровождающаяся снижением содержания тимоцитов. Согласно данным Макаджан и Диара, у обыкновенных ханмы *Chanma punctatus* Bloch в период размножения содержание лимфоцитов снижается.

Если исходит из того, что лимфоциты и тимус являются основными структурными единицами, от функционирования которых зависит иммунореактивность рыб, то становится ясным

причина столь резких изменений в функционировании иммунной системы леща в посленерестовый период.

Нагульный период характеризуется не только восстановлением израсходованных во время зимовки и нереста ресурсов пластических, энергетических веществ и водно-солевого обмена, но и повышением функциональной активности иммунной системы. Если запасы жира, гликогена и белка к концу нагульного периода достигают максимальных величин, сопровождающихся восстановлением соотношения белковых и липидных компонентов сыворотки крови (Микряков и др., 1979), то активность гуморальных факторов иммунитета резко повышается. У исследуемых рыб увеличивается не только средние величины БАСК, но и доля иммунореактивных особей. Напротив, число рыб с иммунодефицитным состоянием резко снижается до 5-10% против 30-35 %, обнаруженных у отнерестившихся особей.

В период зимовки процессы генеративного, водно-солевого обмена и иммунного статуса существенных изменений не претерпевают.

На основе сравнительного анализа, характера динамики иммунофизиологических показателей на примере рыб Рыбинского водохранилища показано, что производители на разных этапах нерестового периода реагируют де- и рестабилизацией функционального состояния организма. Они связаны с модификацией функции нейро-эндокринной, иммунной системы, метаболических процессов и ионного гомеостаза. В преднерестовый период, на фоне усиления общего адаптационного синдрома доминируют только защитные системы, способствуя повышению уровня резистентности производителей (стадия резистентности по Селье). Состояние, сравнимое с сильным стрессом, возникает у производителей только в момент нереста, сопровождаясь снижением устойчивости организма производителей, свидетельствуя об истощении защитных функций (стадия истощения по Селье). Со временем, как при стрессе, так и после нереста, в пределах 2-3 недель физиолого-биохимические и иммунологические показатели восстанавливаются и стабилизируются в пределах нормы.

### Список литературы

1. Алтухов Ю.В. Сезонные изменения теплоустойчивости изолированной мышечной ткани черноморской ставриды // Цитология. 1963. Т. 5. № 2. С. 241–243.
2. Баранникова И.А., Васильева Е.В., Тренклер И.В., Цепелован П.Г. Интерреналовая железа в жизненном цикле проходных осетровых (сем. Acipenseridae) // Вопр. ихтиологии. 1978. Т. 18. № 4. С. 719–734.
3. Васильева Е.В., Баранникова И.А. Ультраструктура клеток интерренальной ткани осетра и ее сравнительный анализ у самок до и после нереста // Цитология. 1978. Т. 20. С. 263–268.
4. Запруднова Р.А., Мартемьянов В.И. Сезонные изменения концентрации катионов в плазме крови пресноводных рыб // Вопр. ихтиологии. 1988. Т. 28. № 4. С. 671–676.
5. Лав Р.М. Химическая биология рыб. М.: Пищ. пром-сть, 1976. 350 с. Love R.M. The chemical biology of fishes. Academic press, London and New York, 1970. 350 p.
6. Мартемьянов В.И. Диапазоны регуляции концентрации натрия, калия, кальция, магния в плазме, эритроцитах и мышечной ткани плотвы *Rutilus rutilus* в природных условиях // Ж. эволюц. биохимии и физиологии. 2001. Т. 37. № 2. С. 109–113.
7. Мартемьянов В.И. Динамика содержания катионов в плазме, эритроцитах и мышечной ткани плотвы *Rutilus rutilus* L. в период размножения // Биология внутренних вод. 2004. № 2. С. 78–84.
8. Микряков В.Р. Актуальные вопросы иммунологии рыб // В кн: Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ. Л.: Наука, 1978. Вып. 32/25. С. 116–134.
9. Микряков В.Р., Силкина Н.И. О бактерицидных свойствах сыворотки крови. Ветеринария, 1980, № 4, с.32–34.
10. Микряков В.Р., Силкин Н.Ф., Силкина Н.И. Антимикробные свойства сыворотки крови. Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., Наука 1979. С. 125–133.
11. Никольский Г.В. Теория динамики стада рыб. М., Наука, 1965. 427 с.
12. Решетников Ю.С. Экология и систематика сиговых рыб. М., Наука, 1980, 300с.
13. Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 1980. 238 С.
14. Mommsen T. P., Walsh P. J., Perry S. F., Moon T. W. Interactive effects of catecholamines and hypercapnia on glucose production in isolated trout hepatocytes // Gen. Comp. Endocrinol. 1988. V. 70. P. 63–73.
15. Tamura E., Honma Y. Histological changes in the Organs and the Tissues of the Gobiid Fishes throughout ther Lite-Span-VI. Seasonal changen in the Lymphopoetic Organs of the Flat-head Goby. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 1974, v. 40, № 5, p. 447–455.

16. Wingfield J.C., Grimm A.S. Seasonal changes in plasma cortisol, testosterone and oestradiol-17 $\beta$  in the plaice, *Pleuronectes platessa* L. // Gen. Comp. Endocrinol. 1977. V. 31. P. 1–11.

### **IMMUNO-PHYSIOLOGICAL MODIFICATIONS IN ORGANISM OF FISHES IN REPRODUCTION**

Mikryakov V.R., Martemyanov V.I.

In article are analyzed immune-physiological modifications occurring in organism sexually mature fishes at different stages of the spawning period: prespawning, spawning, after spawning and their transition on fattening period. It is shown, that each period differs features of a structurally functional condition neuroendocrine, water-salt, metabolic, immune and reproductive systems. They are connected with function updating neuroendocrine, immune system, a metabolism and an ionic homeostasis. The conclusion is drawn, that dynamics of changes immune-physiological indicators corresponds to that observed at influence of fishes on stress the factor on Selye.

### **ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У РАЗЛИЧНЫХ ПО ЭКОЛОГИИ ВИДОВ РЫБ**

Д.В. Микряков, В.Р. Микряков, Ю.В. Герасимов, Н.И. Силкина,  
Т.А. Суворова

*Институт биологии внутренних вод РАН, Борок Ярославской  
обл., Россия, e-mail: [mvr@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:mvr@ibiw.yaroslavl.ru)*

В Рыбинском водохранилище и его притоках обитает 38 видов рыб (13 семейств), которые отличаются систематическим положением и экологией (Рыбинское водохранилище..., 1972; Поддубный, 1971; Современное состояние..., 1997; Экологические проблемы..., 2001). Наибольшее промысловое значение имеют лещ, судак, щука, налим, синец, плотва, окунь и налим (Современное состояние..., 1997), а их численность часто подвергается существенным колебаниям. Происходящие изменения численности рыбного населения связаны, не только с влиянием биотических и абиотических факторов, но и нарушением функций механизмов иммунологического гомеостаза. Несмотря на обстоятельное изучение трех гуморальных факторов иммунитета: комплемента, лизоцима и пропердина (Лукияненко, 1971), многие вопросы функционирования иммунной системы у разных по экологии

видов рыб и в зависимости от сезона года следует считать слабо изученными.

### БАСК некоторых видов пресноводных рыб

С учетом вышеизложенного первоначально нами проведено изучение влияния сыворотки крови леща на развитие различных сапрофитных и условно-патогенных микроорганизмов (табл. 1), относящихся к грамположительным (*Micrococcus lysodeiticus*, *Bacterium megaterium*) и грамотрицательным (*Aeromonas punctata*, *Escherichia coli communis*, *Pseudomonas fluorescents*, *Bacterium vulgare*) микроорганизмам.

Таблица 1. Действие сыворотки крови рыб на развитие бактерий.

Вид бактерий	Разведение сыворотки					
	1:1	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
<i>Aeromonas punctata</i>	+	+	+	±	±	-
<i>Escherichia coli communis</i>	+	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescents</i>	+	±	-	-	-	-
<i>Bacterium vulgari</i>	+	+	±	-	-	-
<i>Micrococcus lysodeiticus</i>	+	+	±	±	±	±
<i>Bacterium megaterium</i>	+	+	-	-	-	-

Примечание: (+) – развитие бактерий подавляется, (±) – развитие бактерий обнаружено в 50% случаев опыта, (-) – отсутствие угнетающего действия сыворотки.

Исследования показали, что наиболее чувствительными к воздействию сыворотки оказались *M. lysodeiticus* и *A. punctata*, а более устойчивыми *Ps. fluorescents*, вызывающих псевдомоноз карпов (Лобунцов, 1975) и *B. megaterium*. Результаты опытов позволяют предложить, что иммуносупрессивное действие сыворотки крови на развитие микроорганизмов зависит от их биологических и физиологических особенностей.

Поскольку *A. punctata* по сравнению с другими видами бактерий оказались более чувствительными к воздействию сыворотки крови леща данный вид использовали в качестве тест-микробов при оценке защитных функций сыворотки других видов рыб (табл. 2). Сравнительными исследованиями БАСК у 9 видов пресноводных костистых рыб показано, что активность функционирования гуморальных факторов иммунитета у них отличается. Максимальная активность антимикробных свойств

крови обнаружена у щук и карасей (92 % и 96 % соответственно), а минимальная – у налима (54 %), окуня (55 %) и синца (63 %). Показатели БАСК судака, плотвы, леща и карпа отличались коэффициентом вариации, долей рефракторных особей и размаха иммунологического показателя между максимальными и минимальными величинами.

Таблица 2. Индивидуальная изменчивость БАСК различных видов рыб.

Вид	Возраст	n	M±m	Коэффициент вариации (V)	Число рефракторных особей, %	Пределы колебаний
Щука	-	10	92±3	12	0	79-100
Лещ	6	22	69±6	44	5.5	0-100
Лещ	8	20	80±6	33	5	0-100
Лещ	10	22	74±7	39	11	0-100
Синец	5	30	63±8	52	10	0-100
Плотва	7	25	77±6	46	0	15-100
Карп	3	30	75±3	20	0	50-100
Карась	3	20	96±3	14	0	55-100
Налим	-	35	54±7	53	11.2	0-100
Окунь	-	25	55±3	41	12	0-100
Судак	-	7	81±4	16	0	68-100

Наименьший размах индивидуальной изменчивости оказался у щуки, карасей, судака и карпа, а наибольший у налима, леща, окуня и синца. Различные величины БАСК, установленные у разных по экологии видов рыб, скорее всего, отражают видовую устойчивость рыб к заразным болезням, и в частности, к аэромонозу, вызываемый бактериями *A. punctata*. Конкретным примером этому являются данные опытов по изучению устойчивости разных видов рыб к бактериальному инфицированию (Микряков, Лапирова, 1989). Например, ЛД<sub>50</sub> для окуней, имеющих низкие показатели БАСК, по сравнению с таковыми для карасей, отличающихся высокими антимикробными свойствами, была более чем в 3 раза ниже. Это же можно сказать и в отношении других карповых рыб.

### Сезонная изменчивость БАСК у разных видов

Рыбы в течение года переживают ритмически повторяющиеся периоды, связанные с изменением гидрологических, гидробиологических, гидрохимических характеристик водных экосистем. Каждый период сезона года связан с морфофункциональными, физиолого-биохимическими изменениями, обеспечивающими устойчивое существование и

адаптацию организма в меняющихся условиях среды (Шульман, 1972; Никольский, 1974; Lioret et al., 2014). К сожалению публикаций, о сезонных изменениях функционирования иммунной системы рыб в доступной литературе мало. Исходя из этого, нами проведено изучение сезонной динамики БАСК (рис. 1) у разных по экологии видов рыб: щуки, леща, карпа, синца, плотвы и налима (Микряков, 1979; Силкин, Микряков 1978; Силкин, 1984; Силкина, 1988).

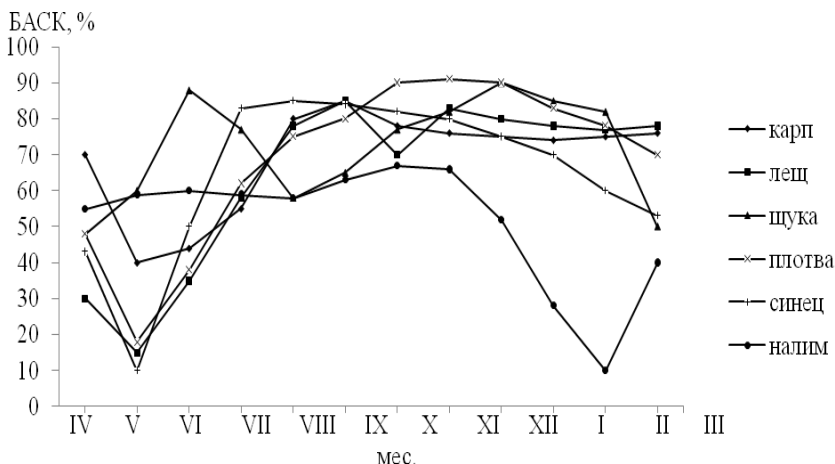


Рис. 1. Сезонная динамика БАСК разных видов рыб

Из представленных данных видно, что сезонная динамика БАСК типичного хищника – щуки (Иванова, 1965; Поддубный, 1971) отличается от таковой других видов рыб. Уровень БАСК колеблется в пределах 76-95 % и незначительно снижается в марте, апреле, августе и сентябре. Различие между максимальными и минимальными значениями 1,5-2 раза, тогда как у карповых и тресковых – от 4 до 8. Низкие величины БАСК в основном выявлены у щук, имеющих половые продукты на IV-V и V-VI стадиях созревания. С наступлением посленерестового жора в мае месяце исследуемые показатели повышаются быстрее. Следует отметить, что темп нарастания БАСК у отнерестившихся особей, по сравнению с другими видами, происходит быстрее. Некоторое снижение показателей БАСК, отмеченное у щук в августе и сентябре, мы связываем с изменениями характера

питания и содержания в крови иммуноферментов. Косвенным подтверждением этому являются исследования интенсивности питания щук (Иванова, 1965), и активности амилазы в сыворотке крови в разные периоды года (Кузьмина, 1979). Ими установлено, что щука активно питается весной в период нереста, в конце лета и осенний период. Сходный характер изменения активности  $\alpha$ -амилазы у щук отмечен В.В. Кузьминой (1979).

У факультативного хищника – налима (Поддубный, 1971 и др.), сезонная изменчивость исследуемых показателей, по сравнению с щукой и карповыми, отличается и проявляется в виде резких колебаний показателей БАСК и изменения доли ИМД и ИМР особей в популяциях. Если у щук функциональная активность иммунной системы падает весной, а у карповых – весной – в начале лета, то у налима – в зимний период.

Различный характер сезонной динамики БАСК, установленный у исследуемых видов, обусловлен биологическими особенностями рыб. Низкие величины обнаружены среди нерестующих и отнерестившихся особей, с половыми продуктами V-VI и VI-II, а высокие – со стадией зрелости II-III, III и IV-V. Характер кривой динамики БАСК в разные сезоны года определяются долей содержания ИМД особей (табл. 3).

Таблица 3. Сезонная динамика ИМД особей, %.

Вид рыб	n	Время года				Среднегодовой уровень
		зима	весна	лето	осень	
Щука	81	9	57	48	22	34
Налим	145	66	57	40	35	52
Лещ	205	15	52	35	10	30
Синец	195	34	65	40	35	43
Плотва	160	30	63	38	28	40
Карп	130	0	43	30	15	22

Зимой число ИМД особей среди налимов в среднем возрастает до 60 %. Показатели иммунитета у налима в летний период (июль) падают незначительно, что, вероятно, обусловлено голоданием и повышением температуры воды. Известно, что налим относится к холодолюбивым рыбам, питающимся и размножающимся в холодное время года, т.е. при более низких



температурных условиях, чем теплолюбивые. Вполне возможно, летнее повышение температуры воды является неблагоприятным для функционирования иммунной системы налима.

Вместе с тем у всех карповых исследуемые показатели колеблются сходным образом: в мае и июне снижаются, а в период интенсивного нагула (июль, август, сентябрь) повышаются, а осенью и зимой существенных изменений не претерпевают. У плотвы изменчивость БАСК сильнее выражена, чем у карпа, синца и леща. Размах колебаний между максимальными и минимальными средними значениями БАСК происходит за счет изменчивости коэффициента вариации и доли содержания ИМД и ИМР особей (табл. 3). Доля ИМР особей у плотвы в среднем равнялась 50 %, тогда как у карпа – 78 %, леща – 71%, синца – 56 %. У хищных рыб максимальная доля ИМР особей обнаружена среди щук (83%), а минимальная – у налима (41%). Максимальное количество ИМД особей у плотвы нами выявлено летом, а у других карповых – весной. Минимальное число ИМД особей среди карповых обнаружено у карпа, затем у синца, а максимальное – у леща и плотвы.

Таблица 4. Динамика коэффициентов вариации показателей БАСК, %.

Виды рыб	Месяц											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
лещ	9	19	27	79	180	74	36	-	28	28	-	14
плотва	35	37	37	68	87	90	-	-	32	14	-	20
синец	14	11	28	53	49	31	20	-	9	15	-	17
каarp	10	-	15	25	23	26	30	2	19	17	-	20
налим	74	25	41	23	29	24	27	-	19	31	-	18
щука	5	6	32	27	12	10	14	45	40	26	-	10

Анализ коэффициентов вариации, характеризующих степень индивидуального разброса показателей, свидетельствует, что уровень БАСК в течение года изменяется за счет разнообразия величин исследуемого признака. Независимо от видовых особенностей рыб спектр разброса уровней защитных свойств сыворотки крови в нерестовый период возрастает. Максимальный размах коэффициентов вариации нами установлен у леща – от 9 до 180, затем у плотвы – от 14 до 90 и налима – от 18 до 74, а

минимальный – у карпов и щуки – от 10 до 30 и от 5 до 45 соответственно. Синцы по разбросу коэффициентов вариации занимают промежуточное положение (табл. 4).

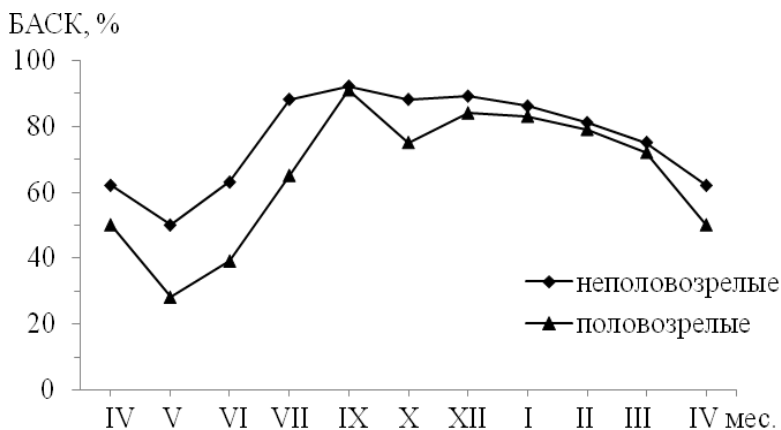


Рис.

2. Сезонная динамика БАСК неполовозрелых и половозрелых лещей.

Размах сезонной изменчивости БАСК зависит не только от видовых и экологических особенностей, но и от половой зрелости, возраста и пола рыб. На примере половозрелых (8+ – 10+) и неполовозрелых (5+ – 6+) лещей показано, что антимикробные свойства у них меняются с разной интенсивностью. Несмотря на сходный характер сезонной динамики БАСК, степень изменчивости у половозрелых особей выражена сильнее, чем у неполовозрелых (рис. 2).

Максимальное различие между исследуемыми показателями установлено нами в весенне-летний период. Выявленное различие в характере и интенсивности изменения исследуемых параметров, видимо, обусловлено как возрастными особенностями, так и нерестом, приводящим к глубоким физиолого-биохимическими изменениями организма рыб. Сходная динамика БАСК установлена у леща и синца: у самок показатели БАСК падают сильнее, чем у самцов (рис. 3, 4). Вероятно, это связано с тем, что нерест у самок вызывает более глубокие сдвиги в иммунной системе, чем у самцов.

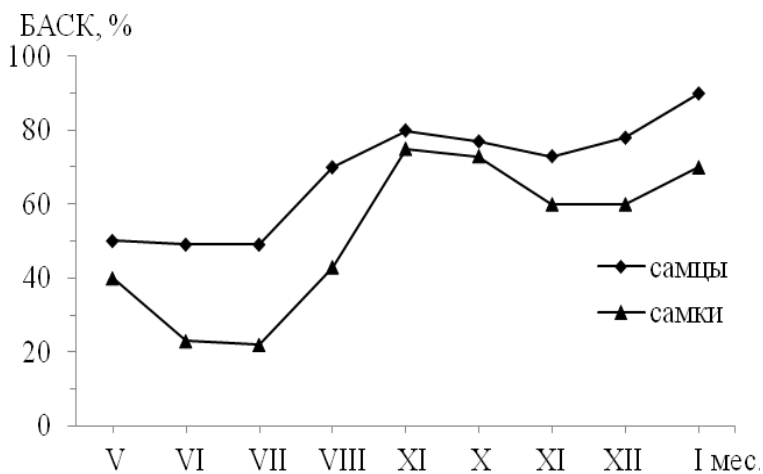


Рис. 3. Сезонная динамика БАСК у самок и самцов леща.

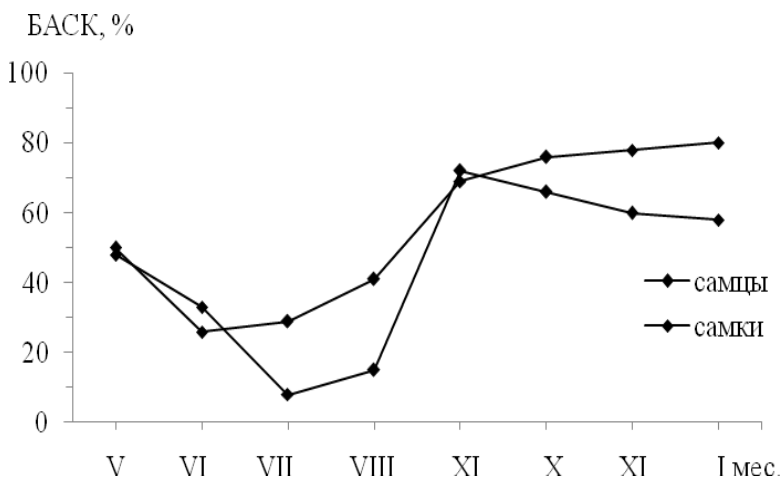


Рис. 4. Сезонная динамика БАСК у самцов и самок синца.

Анализируя характер сезонной динамики БАСК у разных видов рыб, следует считать, что они обусловлены внутренними ритмами и экологической специфичностью вида. Рассмотренные материалы по сезонной динамике БАСК показали, что динамика изменения БАСК в разные сезоны года отражает биологические особенности рыб. По сезонной динамике антимикробных свойств сыворотки крови щука, ведущая активный образ жизни и

питающаяся в течение года, отличается от налима, леща, плотвы, синца, карпа. Кривая динамики БАСК у щуки носит двувёршинный характер. В отличие от тресковых и карповых, антимикробные свойства щуки снижаются значительно. У всех карповых рыб, независимо от вида и образа жизни, исследуемые показатели в течение года меняются однообразно: от весны к лету повышаются, осенью и зимой продолжают оставаться на высоком уровне, а от зимы к весне постепенно падают. По сравнению с карпом, синцом и лещом степень снижения БАСК наиболее выражена у плотвы. В противоположность щуковым и карповым рыбам, у налима низкие иммунологические параметры выявлены зимой и ранней весной. Выявленное различие в сезонной динамике БАСК у налима по сравнению с другими видами объясняется сроками нереста. Независимо от видовых особенностей, низкие показатели БАСК зафиксированы у рыб, в том числе у налима на V-VI и VI-II стадиях зрелости половых продуктов. Показано, что степень сезонной изменчивости самок и половозрелых рыб (лещ) выражена сильнее, чем у самцов и неполовозрелых особей.

#### Литература.

1. Иванова М.Н. Сезонные изменения в питании хищных рыб Рыбинского водохранилища. *Вопр. ихтиол.* 1965. т. 5. вып. I (34). С. 127-134.
2. Кузьмина В.В. Уровень активности  $\alpha$ -амилазы в крови у пресноводных костистых рыб // *Вопр. ихтиол.*, 1979, т.19, вып.2 (115), с.332-340.
3. Лобунцов К.А. Микрофлора больных аэромонозом карпов // *Новые методы лечения инфекционных заболеваний рыб: Тез. докл. М. МСХ СССР, 1975, С. 58-59.*
4. Лукьяненко В.И. Иммунобиология рыб. М.: Пищевая промышленность. 1971. 364 С.
5. Микряков В.Р. Иммуниетет рыб к сапролегниозу. Тез. докл. VII Всес. совещ. по паразитам рыб и болезням. Л.: Наука. 1979. С. 70-71.
6. Микряков В.Р., Лапирова Т.Б. Естественный иммунитет леща к бактериальной инфекции на ранних этапах онтогенеза // Тезисы докл. VII всесоюз. конф. «Экологическая физиология и биохимия рыб», Ярославль, 1989. Т.2. С. 40-41.
7. Микряков В.Р., Силкина Н.И. Роль липидов в функционировании иммунологической системы рыб // *Мат. III Всесоюз. семин. по инфекционной патологии рыб.* М., ВАСХНИЛ, 1978. С. 40-41.
8. Никольский Г.В. Экология рыб. М. Высш. шк., 1974. 367 с.

9. Поддубный А.Г. Экологическая топография популяции рыб в водохранилищах. Л. Наука. 1971. 309 с.
10. Рыбинское водохранилище и его жизнь. Л. Наука. 1972. 364 с.
11. Силкин Н.Ф., Микряков В.Р. Корреляционная связь антимикробных свойств сыворотки крови леща с некоторыми физиолого-биохимическими показателями организма в разные периоды года. Тез. докл Всес. Семина. «Пути улучшения профилактики и ликвидации болезней рыб в рыбоводных хозяйствах и бассейнах зимовальных комплексов». М. ВАСХНИЛ. 1978. с. 54-55.
12. Силкин Н.Ф. Сезонная динамика иммуно-физиологических показателей некоторых карповых рыб. Автореф. канд. дисс. М. ИЭМЭЖ. 1984. 24 с.
13. Силкина Н.И. Сезонная динамика липидов сыворотки крови и ее связь с иммунологической реактивностью рыб. Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: ИМЭЖ РАН, 1988. 17 С.
14. Современное состояние рыбных запасов Рыбинского водохранилища. Ярославль, 1997. 214 с.
15. Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М.: Пищевая промышленность, 1972. 368 с.
16. Экологические проблемы Верхней Волги: Коллективная монография. Ярославль, Изд-во ЯГТУ, 2001, 427 с.
17. Lloret J., Shulman G., Love M.R. Condition and Health Indicators of Exploited marine fishes. Wiley Blackwell, 2014. 247 p.

## FUNCTIONING OF IMMUNE SYSTEM AT THE VARIOUS ON ECOLOGY OF KINDS OF FISHES

Mikryakov D.V., Mikryakov V.R., Gerasimov Yu.V., Silkina N.I., Suvorova T.A.

Features of a functional condition humoral factors of congenital immunity according to the analysis of antimicrobial properties of blood serum at various on ecology of kinds of fishes are analyzed: pike, bream, roach, carp, crucian, burbot, perch and a pikeperch. Communication of antimicrobial indicators from a kind, a floor, fishes, a season of year, and their biological features is shown.

## К ОЦЕНКЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ДЕЛЬФИНОВ АФАЛИН

Т.В. Минзюк, Н.Н. Кавцевич

*Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН,  
Мурманск, Россия, E-mail: [minzyuk@mail.ru](mailto:minzyuk@mail.ru)*

Фагоцитирующие лейкоциты являются центральным звеном врожденного клеточного иммунитета. Они играют роль

медиаторов воспаления, обладают цитотоксическим, противоопухолевым действием, но их основная функция – антимикробная защита (Пигаревский, 1978; Зайчик, Чурилов, 2002). Функциональные возможности гранулоцитов связаны с наличием большого количества ферментов и основных белков (щелочная фосфатаза, неферментные катионные белки, миелопероксидаза, неспецифическая эстераза, НАДФН-оксидаза), содержащихся в цитоплазме клеток.

Катионные белки (КБ) являются важной составной частью антимикробной защиты организма, а их дефицит в гранулоцитах приводит к резкому снижению неспецифической резистентности (Пигаревский, 1978). Уровень естественной резистентности организма имеет большое значение в процессах адаптации животных к условиям окружающей среды, особенно в раннем постнатальном онтогенезе животных, когда формируется система специфического иммунитета. КБ проявляют бактерицидную активность в анаэробных условиях, что существенно для животных, подвергающихся воздействию гипоксии при нырянии.

Щелочная фосфатаза принимает активное участие в обменных процессах нуклеиновых кислот, белков и липидов (Шубич, Нагоев, 1980). Активность этого фермента в плазме крови у гренландского тюленя и тюленя-хохлача, по сравнению с наземными млекопитающими, выше во все возрастные периоды (Voily et al., 2006). Показатели ферментативной активности щелочной фосфатазы отражают состояние окислительной системы клеток крови, уровень катаболических процессов в лейкоцитах. В то же время сведения о внутриклеточном содержании щелочной фосфатазы лейкоцитов у морских млекопитающих в литературе отсутствуют.

В настоящей работе мы определяли содержание бактерицидных катионных белков (КБ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) в лейкоцитах дельфинов афалин разного возраста.

Объект исследования – черноморские афалины (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) в возрасте от 1 года до 20 лет. Материал от дельфинов получен в океанариуме г. Севастополя. Кровь брали из вен хвостового плавника иглой для подкожных инъекций длиной 30 и диаметром 1.2 мм в пробирку с гепарином, мазки

изготавливали общепринятым способом. Катионный белок окрашивали прочным зеленым по методике М. Олфорта и И. Гешвинда (Бутенко и др., 1974), щелочную фосфатазу выявляли по Л.С. Кэплову (Karlow, 1955).

Окрашенные препараты изучали, используя масляную иммерсию (объектив  $\times 100$ , окуляр  $\times 10$ ), с помощью микроскопа Axio Imager M1, оснащенного цифровой видеокамерой AxioCam и программным обеспечением AxioVision фирмы Zeiss. При определении содержания КБ и ЩФ в гранулоцитах крови вычисляли средний цитохимический коэффициент (СЦК).

Катионный белок лейкоцитов дельфинов локализован в цитоплазматических гранулах. Средняя площадь одной гранулы у афалин составляет  $0.29 \text{ мкм}^2$  (у человека –  $0.30 \text{ мкм}^2$ ). Во всех возрастных группах афалин преобладают гранулоциты с яркоокрашенными и интенсивно заполняющими цитоплазму гранулами, в которых содержится катионный белок.

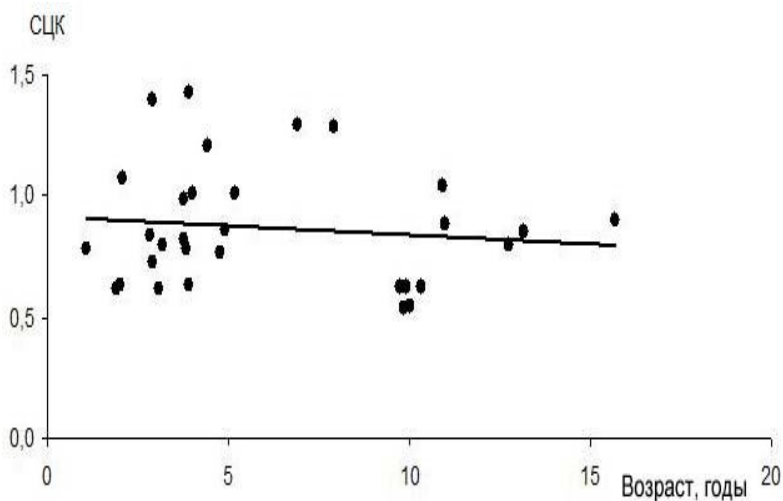


Рис. 1 Содержание катионного белка в лейкоцитах афалин

Относительное число  $\text{КБ}^+$  лейкоцитов у афалин в среднем составляет 35%. У неполовозрелых дельфинов содержание КБ в 2-3 раза выше, чем у тюленей в данный возрастной период (Минзюк, 2011). У половозрелых дельфинов (7-16 лет) средний

уровень КБ существенно не отличается от такового более молодых животных ( $p < 0.01$ ), наблюдается лишь некоторое снижение вариабельности исследуемого показателя (рис. 1), коэффициент вариации снижается с 33% у неполовозрелых до 24% у половозрелых афалин.

У всех исследованных нами представителей морских млекопитающих содержание КБ значительно ниже, чем у человека и наземных животных других видов. Так, содержание КБ (в условных единицах, СЦК) составило:  $0.29 \pm 0.01$  – серый тюлень,  $0.45 \pm 0.06$  – гренландский тюлень (Минзюк, 2011);  $0.63 \pm 0.18$  – морской заяц (Минзюк и др., 2015);  $1.50 \pm 0.02$  – человек (Стойко, Ермаков, 2004);  $1.60 \pm 0.03$  – мышь (Будыка и др., 2009);  $1.36 \pm 0.01$  – курица (Клетикова, 2010) и  $0.77 \pm 0.07$  – афалина.

Таким образом, наибольшие колебания количества бактерицидных белков отмечены у неполовозрелых афалин, на последующих возрастных этапах оно остается относительно постоянным.

В фосфатазоположительных лейкоцитах периферической крови афалин наблюдается диффузно-гранулярное распределение фермента. Гранулы мелкие, но интенсивность их окрашивания высока у афалин всех исследованных возрастных групп. У афалин старше семи лет в 42% случаев встречаются лейкоциты, содержащие на клеточной мембране крупные фосфатазоположительные гранулы неправильной формы. Щелочная фосфатаза является мембранным гликопротеидом, располагается вблизи мембраны клеток или встроена в нее. Установлено, что 70% ЩФ содержится в секреторных пузырьках, которые перемещаются к плазматической мембране после стимуляции нейтрофилов (Morgan et al., 1997) и у больных острыми бактериальными инфекциями (Karlsson et al., 1995).

У исследуемых дельфинов в возрасте от 2 до 20 лет среднее количество фосфатазоположительных клеток составляет 78%, значение СЦК –  $2.23 \pm 0.03$  (рис. 2). Это заметно выше показателей взрослых клинически здоровых наземных животных: корова –  $2.09 \pm 0.23$  (Лукашик, интернет-ресурс), мышь –  $1.59 \pm 0.16$  (Тимченко и др., 2010), крыса –  $1.89 \pm 0.04$  (Овсянников и др.,



2012) и человек –  $0.29 \pm 0.03$  (Стойко, Ермаков, 2004). Повышение активности щелочной фосфатазы в лейкоцитах наблюдается у детей в период быстрого роста, у женщин в последнем триместре беременности. Согласно полученным нами результатам, активность щелочной фосфатазы лейкоцитов афалин репродуктивного возраста и неполовозрелых животных одинакова.

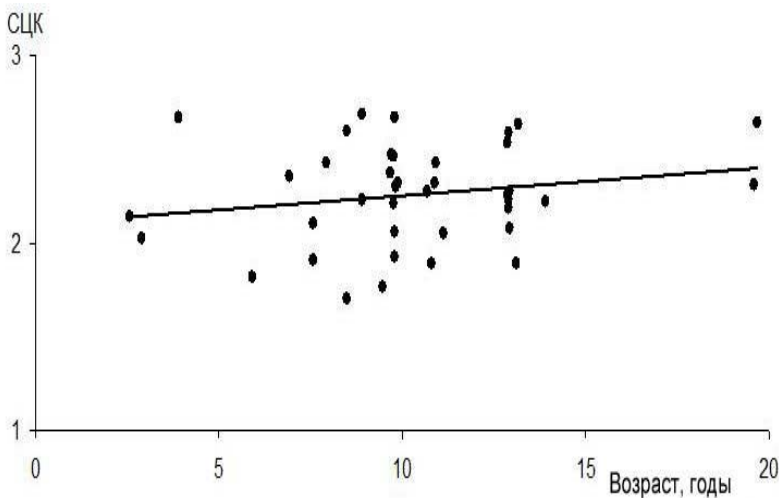


Рис. 2. Содержание щелочной фосфатазы в лейкоцитах афалин

Исследование 4-х беременных самок афалин показало, что среднее количество лейкоцитов, содержащих щелочную фосфатазу, высоко на всем протяжении беременности – 84,3%. У одной особи в последнем триместре беременности число ЩФ-положительных клеток составляло 100%. У женщин во время беременности активность ЩФ повышена, а при угрозе прерывания беременности – на 18% выше, чем при физиологическом её течении. Сама беременность рассматривается как вариант воспалительного процесса, протекающего на фоне повышенной готовности циркулирующих нейтрофилов к выполнению всех присущих им защитных функций (Колесник и др, 2009).

Активность щелочной фосфатазы нейтрофилов крови высокопродуктивных коров в течение 2-3 месяцев в период лактации очень низкая:  $СЦК=0.25-0.27$ , а у завершивших лактацию –  $2.09\pm 0.23$  (Лукашик, интернет ресурс). У одной из самок афалин после родов, завершившихся рождением доношенного детеныша, содержание щелочной фосфатазы ниже ( $СЦК=1.97$ ), чем у небеременных и беременных самок. Таким образом, у беременных афалин наблюдается повышенный уровень щелочной фосфатазы в гранулоцитах в сравнении с небеременными самками репродуктивного возраста. В то же время,  $СЦК$  щелочной фосфатазы в данной группе животных лишь на 9% выше ( $СЦК=2.51\pm 0.03$ ), чем в среднем у половозрелых самок.

Проведенный анализ функционального состояния лейкоцитов крови на основе цитохимических параметров клеток показал, что содержание КБ и ЩФ у афалин в разные возрастные периоды высокое. Пребывание дельфинов в однородной водной среде, по-видимому, обеспечивает в среднем одинаковый уровень содержания белков и ферментов в циркулирующих гранулоцитах афалин независимо от их возраста. Высокая плотность заполнения цитоплазмы и интенсивность окрашивания гранул, содержащих КБ и ЩФ, свидетельствует об их важной роли в выполнении гранулоцитами клеточных защитных функций. Полученные нами результаты могут быть использованы в сравнительных эколого-физиологических исследованиях морских и наземных млекопитающих.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Будыка Д.А., Абзаева Н.А., Руднев С.М. и др. Бактерицидная активность полиморфно-ядерных лейкоцитов крови белых мышей, привитых против чумы, и в различных схемах инфицирования чумной инфекцией // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. Т. 100. С. 50–56.
2. Бутенко З.А., Глузман Д.Ф., Зак К.П. и др. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов. Киев: Наукова думка, 1974. 248 с.
3. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Механизмы развития болезней и синдромов. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2002. 507 с.
4. Клетикова Л.В. Содержание катионных белков в гранулоцитах птиц // Естествознание и гуманизм. 2010. Т. 6, № 1. С. 51–52.
5. Колесник Н.В., Качанова Ж.С., Кузьменко В.А. Функциональное состояние циркулирующих нейтрофилов крови женщин с физиологическим

течением беременности и при угрозе её невынашивания (Запорожский промышленный регион) // Вісник Запорізького національного університету. 2009. №2. С. 104–110.

6. Лукашик Г.В. Способ определения кетоза у высокопродуктивных коров // Инновации в животноводстве. ЮФ НУБиП Украины "КАТУ". Интернет ресурс [http://www.csau.crimea-ua.com/ru/innovacionnie\\_proekti.html](http://www.csau.crimea-ua.com/ru/innovacionnie_proekti.html)

7. Минзюк Т.В. Возрастные изменения бактерицидной активности зернистых лейкоцитов серых тюленей // Вестник ЮНЦ. 2011. Т.7, №4. С. 70–73.

8. Минзюк Т.В., Кавцевич Н.Н., Светочев В.Н. Новые данные о клеточном составе крови морского зайца // Доклады АН. 2015. Т.462, № 6. С. 727-729.

9. Овсянников В.Г., Бойченко А.Е., Николаев В.Е. и др. Онтогенетические особенности изменения фагоцитарной активности лейкоцитов при острой боли // Современные проблемы науки и образования. 2012. №2 (Электронный журнал).

10. Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. М.: Медицина, 1978. 128 с.

11. Стойко Ю.М., Ермаков Н.А. Клинические и фармакоэкономические аспекты консервативного лечения хронической венозной недостаточности нижних конечностей // Хирургия, приложение к Consilium Medicum. 2004. Т. 6, № 2. С. 23–26.

12. Тимченко Л.Д., Затона Е.Г., Походенко М.В. Ферментативная активность нейтрофилов лабораторных крыс в репродуктивном периоде онтогенеза при повреждении покровных тканей под влиянием нового биологически активного препарата на основе эмбрионально-яичной массы // Вестник МГОУ. Серия Естественные науки. 2010. №1. С. 71-75.

13. Шубич М.Г., Нагоев Б.С. Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии. М.: Медицина, 1980. 224 с.

14. Boily F., Beaudoin S., Measures L.N. Hematology and serum chemistry of harp (*Phoca groenlandica*) and hooded seals (*Cystophora cristata*) during the breeding season, in the Gulf of St. Lawrence, Canada // J. Wildlife Diseases. 2006. V. 42, N 1. P. 115-132.

15. Kaplow L.S. A histochemical procedure for locating and evaluating leucocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and bone marrow // Blood. 1955. V. 10. P. 1023-1029.

16. Karlsson A., Khalfan L., Dahlgren C. et al. Neutrophil alkaline phosphatase activity increase in bacterial infections is not associated with a general increase in secretory vesicle membrane components // Infect. Immun. 1995. V. 63, N 3. P. 911-916.

17. Morgan C.P., Sengelov H., Whatmore J. et al. ADP-ribosylation-factor-regulated phospholipase D activity localizes to secretory vesicles and mobilizes to the plasma membrane following N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine stimulation of human neutrophils // Biochem. J. 1997. V. 325, N 3. P. 581-585.

## **ON ESTIMATION OF BOTTLE-NOSED DOLPHINS BLOOD LEUCOCYTES FUNCTIONAL STATE**

T.V. Minzyuk, N.N. Kavtsevich

Level of bactericidal cationic protein (CP) and alkaline phosphatase (AP) in blood leucocytes of bottle-nosed dolphins are revealed. CP contents in investigated marine mammals is lower, than in terrestrial animals. Number of AP positive leucocytes is significantly higher in pregnant then in non-pregnant dolphins. Significant differences between young and adult animals are not found. Obtained results may be used in comparative environmental physiology studies of marine and terrestrial mammals.

## **ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ РЫБ ПО КЛИНИЧЕСКИМ ПРИЗНАКАМ**

А.М. Наумова, А.Ю. Наумова, Л.С. Логинов

*ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт  
урригационного рыбоводства, E-mail: [fish-vniir@mail.ru](mailto:fish-vniir@mail.ru)*

Эффективное развитие рыбного хозяйства в агропромышленном комплексе предусматривает получение высококачественной экологически безопасной здоровой рыбной продукции. В этой связи актуальным является изучение методов оценки состояния здоровья рыб в условиях технологии их выращивания в интеграции с другой сельскохозяйственной продукцией. Вопросы дифференциальной диагностики патологий рыб, выращиваемых в рыбоводных хозяйствах, рассматриваются в специальных руководствах для проведения комплекса ветеринарно-санитарных лабораторных исследований. Однако руководства, позволяющие рыбоводам непосредственно в рыбоводных хозяйствах в условиях интеграции технологий поставить предварительный дифференциальный диагноз по клиническим признакам выявленных у рыб патологий, отсутствуют. В связи с указанным представленные ниже материалы имеют новизну и актуальность.

На основе анализа и обобщения материалов по оценке состояния здоровья рыб при изучении клинических признаков патологий рыб в интегрированных технологиях визуальная оценка отклонений определяется по изменениям в поведении, при внешнем осмотре, а также в органах и тканях при вскрытии рыб.

При внешнем осмотре эти отклонения у рыб проявляются в поведении, а также на теле рыб. Отклонения в поведении включают изменения в движениях рыб, её активности и координации (рыба держится у поверхности воды, заглатывая воздух, угнетена, отбивается от стаи, собирается у водоподачи или подходит к берегу, малоподвижна. Слабо реагирует на внешние раздражения, координация движений нарушена, слабеет, худеет, отказывается от корма. Отмечена гибель рыб).

Внешние отклонения отмечают на коже и в плавниках. Кожа может быть сухой - шершавой или отмечают обилие слизи в виде серо-голубого налёта. Могут быть многочисленные белые пятна - цисты на теле при ихтиофтириозе либо чёрные пятна и бугорки при постодиплостомозе карповых рыб. Под чешуёй карповых рыб могут локализоваться личинки гельминтов - нематод - филометры, нарушающие целостность покрова и вызывающие гиперемию, воспаление, отёк, ерошение чешуи. По всему телу возможно обнаружение кольчатых червей - пиявок, вызывающих воспаление, отёк, гиперемию, образование язв в местах внедрения паразитов. Изменение окраски тела - потемнение наблюдается при миксозомозе - вертеже лососевых. Возможно наличие эпителиом - при оспе карпа. Кровоизлияния на поверхности тела, ерошение чешуи, образование подкожных пузырей, вздутие брюшка, язвы отмечают у карпа при весенней виремии - ВВК, аэромозе, псевдомозе. Ватообразный налёт сопровождает грибковое заболевание - сапролегниоз разных видов рыб. Воспаление вокруг анального отверстия, выпячивание кишечника из ануса наблюдают при инфекциях. Плавники: растрёпанные, некроз с разрушением межлучевых перепонок, кровоизлияния у основания, воспаление выявлены при инфекциях разных видов рыб. Патологии в жабрах включают их бледность, обильное слизиотделение, ослизнённость с участками некроза серого цвета (при ихтиободозе, криптобиозе, дактилогирозе, диплозоозе, а также незаразных болезнях: бронхионекрозе) или ярко-красного цвета (при метгемоглобинемии) разных видов рыб. В глазах визуально выявляется помутнение хрусталика (при диплостомозе), пучеглазие, серповидные кровоизлияния в склере

глаз, западение глаз (при инфекциях – ВВК и аэромоноз карповых рыб).

Показаны отклонения во внутренних органах рыб (печень, желчный пузырь, почки, кишечник, полость тела, плавательный пузырь, селезёнка), выявленные при вскрытии. Печень: бледная, рыхлая консистенция, наличие некротических участков, желтоватая, тёмно-серая или зеленоватая окраски желчью с очагами некроза – при инфекциях (аэромоноз и ВВК). Желчный пузырь: переполнен жидкостью зелёного цвета, отток в печень при инфекции. Почки: рыхлые, обводнённые, увеличенные при аэромонозе, псевдомонозе и ВВК. Кишечник: воспаление отдельных участков, гиперемия слизистой кишечника, истончённые стенки кишечника при цестодозах, кокцидиозе, инфекционном энтерите. Полость тела: большое количество прозрачной, желтоватой или кровянистой жидкости указывает на аэромоноз или ВВК. Перитонит, спайки между внутренними органами при инфекции. Атрофия внутренних органов, разрыв брюшной стенки - при лигулёзе, диграммозе. Плавательный пузырь: кровеносные сосуды переполнены, воспаление плавательного пузыря при ВПП (воспаление плавательного пузыря) - сфероспорозе, осложненном инфекцией - аэромоноз. Селезёнка: увеличена в 1,5-2 раза, тёмно-вишнёвого цвета - при аэромонозе и ВВК карповых рыб.

Представленные материалы позволяют непосредственно в рыбоводном хозяйстве провести визуальный контроль за состоянием здоровья рыб при наблюдении за их поведением, а также осмотре за внешними изменениями и внутренними патологиями у рыб при вскрытии. По результатам проведённой работы можно выявить основные отклонения, позволяющие поставить предварительный дифференциальный диагноз при необходимости постановки окончательного диагноза ветеринарными специалистами направить соответствующие пробы в ветеринарную лабораторию, а также принять первичные меры для сохранения здоровья рыб и сокращения потерь рыбной продукции.

Список литературы:

Наумова А.М., Серветник Г.Е., Наумова А.Ю., Логинов Л.С. «Методическое пособие по оценке состояния здоровья рыб в условиях

интегрированных технологий для повышения экологической безопасности и уменьшения потерь рыбной продукции.» - М.: РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, 2015, 23 с.

Наумова А.М., Серветник Г.Е., Наумова А.Ю., Логинов Л.С. «Использование поликультуры для профилактики болезней рыб в фермерских рыбоводных хозяйствах» - журнал, утверждённый ВАК-ом «Рыбное хозяйство». 7 с.

Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб - М. Изд.: АМБ-Агро. Часть 1,2 1998 г. 310 с., 1999г. 235 с.

## **ASSESSMENT OF FISH HEALTH BY CLINICAL SIGNS**

Naumova A.M., Naumova A.Y., Loginov L.S.

Demonstrated the possibility controlling the state of health fish and the initial diagnosis of identified pathologies on appearance of clinical features into the fish farms in the integrated technology.

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ИММУНО- БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКИ РАЗЛИЧНЫХ ПОРОД И КРОССОВ РЫБ, ВЫРАЩИВАЕМЫХ В РЫБОВОДНЫХ ХОЗЯЙСТВАХ**

Г.И. Пронина<sup>1</sup>, Д.В. Микряков<sup>2</sup>, Н.И. Силкина<sup>2</sup>, А.Б. Петрушин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Федеральное Государственное Бюджетное Научное  
Учреждение (ФГБНУ) Всероссийский НИИ ирригационного  
рыбоводства, пос. Воровского Московской обл., Россия, e-mail:  
gidrobiont4@yandex.ru*

<sup>2</sup>*Институт биологии внутренних вод РАН, Борок Ярославской  
обл., Россия, e-mail: daniil@ibiw.yaroslavl.ru*

Как в естественных, так и в искусственных условиях обитания, рыбы неоднократно подвергаются воздействию различных по природе и происхождению стрессирующих факторов: физических, химических, биологических, технологических (при индустриальных способах выращивания), техногенных и т.д. У рыб под влиянием неблагоприятных факторов снижаются темпы роста и развития и повышаются зараженность паразитами и естественная смертность. Это свидетельствует о нарушении функционирования иммунологических и биохимических механизмов гомеостаза и как

следствие снижении резистентности к возбудителям различных заболеваний (Решетников и др., 1999; Моисеенко, Лукин, 1999; Кашулин и др., 1999; Валедская, 2005).

В связи с этим, актуальной задачей становится усиление иммунитета культивируемых рыб и первым шагом на этом пути – оценка их иммунного статуса. В рамках данных исследований мы изучали ряд показателей, информативно отражающих состояние метаболизма и гуморального иммунитета рыб.

Исследования проводили на различных породах и кроссах карпа (*Cyprinus carpio* L.) и сома обыкновенного (*Silurus glanis* L.) на разных стадиях онтогенеза. Работа выполнялась в рыбоводных хозяйствах: «Киря» Чувашской республики (2-я зона рыбоводства), «Ергенинский» и «Флора» Волгоградской области (5-я зона рыбоводства).

Все исследуемые рыбы содержались в рыбоводных прудах. Гидрохимический режим прудов соответствовал нормативам каждой рыбоводной зоны. Имуно-биохимическое состояние организма исследуемых рыб оценивали в пробах сыворотки крови и (или) в паренхиматозных органах: печени и туловищной почке. Отбор проб проводили весной и осенью после облова рыбоводных прудов. Кровь отбирали у рыб из хвостовой вены прижизненно с соблюдением правил асептики. Пробы замораживали в морозильной камере (при температуре минус 15-20°C) и транспортировали в специальных термоконтейнерах со льдом в лабораторию для исследования.

В отобранных пробах исследовали бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК), содержание неспецифических иммунных комплексов (ИК), продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровню антиоксидантной защиты (АЗ).

БАСК определяли нефелометрическим методом в модификации Микрякова (1991). Неспецифические иммунные комплексы (ИК) изучали методом селективной преципитации полиэтиленгликолем по Ю.А. Гриневич и А.Н. Алферову (1981), адаптированным для рыб.

Об интенсивности ПОЛ в тканях 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). Расчет содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, проводили с учетом 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 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха по общепринятой методике (Семенов, Ярош, 1985), адаптированной нами для рыб. Сущность метода заключается в том, что чем выше скорость окисления субстрата в присутствии биологического материала, тем ниже содержание антиоксидантов в тканях. Гомогенат получали путем растирания тканей с физиологическим раствором в соотношении 1:1. Константу ингибирования окисления субстрата (КОС), являющуюся показателем антиокислительной активности ткани, определяли относительно контроля по формуле:  $K_i = K_{\text{кон}} - K_{\text{оп}}/C$ , где  $K_{\text{кон}}$  и  $K_{\text{оп}}$  – 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,  $p \leq 0.05$ .

Сравнительный анализ полученных результатов показал отличия исследуемых показателей у карпов (43 особи) разных пород (таблица 1). Все породы, кроме ангелинской прошли селекцию на интенсивность роста. Ангелинская порода карпа получена путем селекции на иммунную устойчивость к краснухе на провокационном фоне. Краснуха карпа – наиболее распространенное заболевание одного из основных объектов аквакультуры. Под термином «краснуха» карпа понимается симптомокомплекс, который могут вызывать аэромонады, псевдомонады или вирус весенней виремии карпа (Головина и др., 2003).

Таблица 1. Биохимическая и иммунологическая характеристика пород карпа

Показатели	двухгодовики			четырёхгодовики		
	Ангелинские краснухостойчивые		Чешуйча- тые южный зональный тип	Рамчатые	Чувашские чешуйча- тые	Анишские зеркаль- ные
	чешуйчатые	зеркальные				
	а	б	в	г	д	е
БАСК, %	16,2±6,6	13,8±5,9	7,0±3,0 <sup>о</sup>	18,3±5,0 <sup>о</sup>	26,6±3,33 <sup>о</sup>	35,7±4,2 <sup>аб</sup>
ИК, усл. ед.	12,80±0,40	12,66±0,31	13,20±0,35	13,13±0,14	13,43±0,29	13,17±0,11
МДА, Нмоль/г	2,86±0,03	2,92±0,03	3,04±0,16	2,96±0,06	2,97±0,01	3,02±0,02
КОС, л/мл × мин	1,59±0,02	1,64±0,05	1,62±0,08	1,62±0,04	1,91±0,01 <sup>а-с</sup>	1,66±0,01 <sup>аб</sup>

Примечание: а,б, и т.д. – различия достоверны

Достоверно более значимые показатели БАСК четырехгодовиков и волжских рамчатых карпов по сравнению с рыбами других пород свидетельствуют о высоком функциональном состоянии гуморальных факторов иммунной системы, что вероятно связано с качеством содержания и кормления. Однако, КОС ангелинской породы, чешуйчатого южного зонального типа и волжского рамчатого карпа было ниже по сравнению с чувашской чешуйчатой и анишской зеркальной породами, что свидетельствует о высокой антиоксидантной активности крови этих рыб. Возможно, более низкое содержание антиоксидантов в крови четырехгодовиков чувашских пород связано с созреванием рыб.

Высокий уровень БАСК, отражающий функциональное состояние гуморальных факторов естественного иммунитета (системы комплемента, лизоцима, b-лизина, пропердина и др.) (Микряков, 1991) и низкие показатели ИК – комплексов, состоящих из антигена – антитела, избыточное образование которых, как правило, происходит при насыщении организма чужеродными телами (Гриневиц Ю.А., Алферов, 1981) свидетельствуют о хорошем функциональном состоянии иммунной системы карпов. На благоприятные условия содержания рыб во всех хозяйствах также указывают невысокие количественные характеристики МДА.

Изучались также двухлетки различных кроссов (40 особей) из рыбоводных хозяйств 2-й («Кирия» Чувашской республики) и 5-й («Ергенинский» и «Флора» Волгоградской области) рыбоводных зон. Кросс «Петровский» (селекционное достижение, патент № 4805 от 22.06.2009 г.) – гибрид чувашской чешуйчатой и анишской зеркальной пород. Кросс «Зеркальный» – результат скрещивания самцов Молдавской зеркальной линии и самок Волжского рамчатого карпа. Кросс «Ергенинский» получен путем реципрокного скрещивания Чешуйчатой местной и Молдавской зеркальной форм.

Анализ содержания циркулирующих ИК показал, что их уровень колеблется в разных кроссах и зависит от вида исследуемой ткани (табл. 2).

Таблица 2. Биохимические и иммунологические показатели кроссов карпа

Показатели	Кросс Петровский чешуйчатая группа (n=7)	Кросс Петровский зеркальная группа (n=7)	Кросс Ергенинский чешуйчатая группа (n=8)	Кросс Ергенинский зеркальная группа (n=8)	Кросс Зеркальный (n=10)
	а	б	в	г	д
Масса тела, г	1348±61	1366±71	863±78	1040±94	1559±69
Длина тела, см	36,9±0,9	37,0±0,4	33,0±1,0	33,1±1,1	37,2±0,
Сыворотка крови					
МДА, нмоль/г	5,02±0,03	4,70±0,03 <sup>а</sup>	4,71±0,04 <sup>а</sup>	4,35±0,06 <sup>абв</sup>	6,31±0,01 <sup>абвг</sup>
КОС, л/мл × мин	2,80±0,04	2,85±0,03	2,85±0,02	2,15±0,02 <sup>абв</sup>	2,82±0,01 <sup>г</sup>
ИК, усл. ед.	19,06±0,05	18,59±0,03 <sup>а</sup>	18,53±0,03 <sup>а</sup>	14,39±0,52 <sup>абв</sup>	20,82±0,02 <sup>абвг</sup>
Печень					
МДА, нмоль/г	3,48±0,04	3,42±0,02	6,47±0,07 <sup>аб</sup>	4,93±0,22 <sup>абв</sup>	3,23±0,04 <sup>абвг</sup>
КОС, л/мл × мин	2,01±0,02	2,02±0,03	3,19±0,03 <sup>аб</sup>	2,17±0,03 <sup>абв</sup>	1,84±0,02 <sup>абвг</sup>
ИК, усл. ед.	13,78±0,06	13,53±0,06 <sup>а</sup>	16,60±0,09 <sup>аб</sup>	12,88±0,06 <sup>абв</sup>	13,52±0,19 <sup>бг</sup>
Почки					
МДА, нмоль/г	5,11±0,02	5,00±0,02 <sup>а</sup>	7,57±0,08 <sup>б</sup>	5,08±0,04 <sup>б</sup>	5,27±0,02 <sup>абвг</sup>
КОС, л/мл × мин	2,81±0,02	2,67±0,02 <sup>а</sup>	3,58±0,06 <sup>аб</sup>	2,43±0,07 <sup>абв</sup>	3,01±0,04 <sup>абвг</sup>
ИК, усл. ед.	15,02±0,04	14,94±0,13	17,60±0,11 <sup>аб</sup>	14,50±0,03 <sup>абв</sup>	15,19±0,12 <sup>абвг</sup>

Примечание: <sup>абвг</sup> – различия достоверны при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Минимальный показатель ИК отмечен у особей кросса «Ергенинский» зеркальная группа, а максимальный в сыворотке

крови кросса «Зеркальный», печени и почках чешуйчатой группы кросса «Ергенинский». Уровень ИК у разных видов рыб может колебаться в зависимости от возраста, сезона года, физиологического состояния (Микряков и др., 2001). Известно, что ИК состоят из антигена, антител и связанных с ними компонентов системы комплемента. Данные комплексы выполняют важную роль в процессах регуляции иммунных реакций, элиминации ксенобиотиков из организма и поддержании иммунофизиологического гомеостаза.

Избыточное содержание ИК наблюдается при насыщении организма чужеродными компонентами, в том числе инфекционными и токсическими агентами, и обусловлено снижением клиринговой функции фагоцитов (Микряков, 1991; Логинов и др., 1999; Ройт и др., 2000). Более низкие характеристики показателя ИК у кросса «Ергенинский» зеркальной группы рыб отражают более интенсивную клиринговую функцию фагоцитарной системы по нейтрализации и элиминации иммунных комплексов из циркулирующей крови. Эффективная работа фагоцитарной системы, как известно, препятствует возникновению и развитию неконтролируемых патологических процессов в организме рыб. Стабильное функционирование иммуно-физиологических механизмов гомеостаза сдерживает супрессию функций гуморальных факторов иммунитета.

Изучение состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса у разных кроссов не выявило дисрегуляции и дестабилизации липидного обмена в исследуемых тканях. Различия между показателями МДА и КОС зависели от вида ткани. Уровень МДА сыворотки крови двухлеток «Зеркального» кросса был наибольшим по сравнению с остальными одновозрастными кроссами. Тогда как в паренхиматозных органах (печени и почках) достоверно наибольшее значение МДА отмечается у 2-х летков кросса «Ергенинский» (особенно у чешуйчатой группы) по сравнению с другими изучаемыми кроссами: «Зеркальным» и «Петровским». Значение показателя КОС у двухлеток также зависело от вида исследуемой ткани. Минимальный показатель КОС зафиксирован в сыворотке крови

и почках кросса «Ергенинский» зеркальной группы, в печени – у кросса «Зеркальный». Полученные данные свидетельствуют о зависимости происходящих окислительно-восстановительных процессов от особенностей структурно-функциональной организации исследуемых тканей и органов и вероятно зависят от уровня содержания клеток, интенсивно образующих активные формы кислорода (супероксидный и гидроксильный радикалы, синглетный кислород, пероксиды и многие другие соединения). В почках, богатых гранулоцитами, которые превосходят все другие типы лейкоцитов по способности нарабатывать активные формы кислорода, процессы ПОЛ происходят более интенсивно, чем в периферической крови и печени с низкой долей содержания миелобластов, нейтрофилов и промиелоцитов. Аналогичные результаты установлены нами ранее у леща (Силкина и др., 2010).

Известно, что избыток активных форм кислорода становится причиной активации ПОЛ клеточных мембран, разрушения нуклеиновых кислот, белков, повреждения ДНК, митохондрий, разрушения полиненасыщенных жирных кислот клеточных мембран, перекисидации липидов и инактивации структур АЗ (Барабой и др., 1992; Грубинко и др., 2001; Меньшикова и др., 2008; Силкина и др., 2010; Микряков и др., 2011, Winston, 1991; Fiho, 1996; Rudneva, Kuzminova, 2011). Неконтролируемому нарастанию продуктов перекисидации липидов при воздействии стресс-факторов, препятствует многоуровневая система АЗ, состоящая из антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза) и низкомолекулярных антиоксидантных соединений (восстановленный глутатион в-токоферол, фенольная форма коэнзима Q<sub>10</sub>, в-каротин, аскорбиновая кислота и др.) (Меньшикова и др., 2008; Winston, 1991). Антиоксидантной системе принадлежит важная роль в реализации адаптивных компенсаторных реакций в организме, поскольку компоненты этой системы участвуют в регуляции процессов метаболизма (Winston, 1991). Известно, что в каждом биологическом организме существует баланс окислительно-восстановительных процессов, а изменение соотношения между ПОЛ и активностью АЗ тканей считается одним из чувствительных индикаторов, отражающим

влияние неблагоприятных стресс-факторов на метаболические процессы и состояние здоровья рыб. Важный механизм регуляции метаболических процессов в любом организме – динамическое равновесие окислительно-восстановительного баланса, обеспечиваемое прооксидант-антиоксидантной системой (Барабой и др., 1992). При оптимальных условиях соотношение этих систем жизнеобеспечения поддерживается на стационарном минимальном уровне (Меньшикова и др., 2008; Fiho, 1996; Winston, 1991). При действии негативных стресс-факторов происходит активация процессов окислительного стресса, которая связана с избыточным накоплением АФК и снижением активности ферментных и неферментных антиоксидантов. Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высоком уровне липидопереокислительных и антиокислительных процессов, происходящих в организме исследуемых рыб.

Анализ изучаемых показателей молодежи сома обыкновенного выявил некоторые различия гуморального иммунитета и метаболизма рыб в зависимости от возрастной группы и рыбоводного хозяйства, в котором они выращивались (табл. 3).  
Таблица 3. Размерно-весовая, иммунологическая и биохимическая характеристика сома обыкновенного

Показатели	Сеголетки «Кирия» n=5	Сеголетки «Ергенински й» n=5	Двухлетки «Кирия» n=9	Двухлетки «Флора» n=5
	а	б	в	г
Масса тела, г	32±1,3	119,9±13,3	691±35	1059,0±8,46
Длина тела, см	16,0±0,2	23,8±0,39	42,4±1,1	51,2±1,19
МДА, Нмоль/г	5,23±0,09	4,74±0,14 <sup>а</sup>	5,73±0,15 <sup>аб</sup>	6,51±0,07 <sup>абв</sup>
КОС, л/мл × мин	2,86±0,06	2,61±0,11	3,01±0,05 <sup>б</sup>	3,15±0,03 <sup>абв</sup>
ЦИК, усл. ед.	30,49±0,04	30,30±0,01 <sup>а</sup>	30,89±0,13 <sup>аб</sup>	33,60±0,06 <sup>абв</sup>

Примечание: <sup>а,б, и т.д.</sup> – различия достоверны

Двухлетки имели более высокие не только морфометрические, но иммуно-биохимические показатели по сравнению с сеголетками. Избыточное образование ИК, комплексов антиген-антитело, как правило, происходит при насыщении организма чужеродными агентами (Гриневиц, Алферов, 1981), а по показателям МДА и КОС судят об

интенсивности пероксидных процессов и содержании антиоксидантов в тканях и органах. Более высокие уровни ИК, МДА и КОС у двухлеток, вероятно, обусловлены особенностями метаболизма у рыб старшего возраста.

По размерно-массовым показателям сеголетки из рыбоводного хозяйства «Ергенинский» и двухлетки из «Флоры» значительно превышали одновозрастных рыб из «Кири». Это закономерно, так как хозяйства находятся в разных рыбоводных зонах. При исследовании иммуно-биохимических показателей можно отметить интересную особенность: показатели ИК, ПОЛ и КОС у двухлеток из «Кири» выше, чем у особей из 5-й рыбоводной зоны, тогда как у сеголетков они заметно выше. Вероятно, высокие значения исследуемых показателей у двухлеток из «Флоры» связаны с более крупными размерами и физиологическими особенностями организма рыб. С другой стороны, более низкие значения МДА, ИК и КОС у сеголетков сома из рыбоводного хозяйства «Ергенинский» указывают на комфортные условия содержания и хорошее функциональное состояние организма рыб. Также это свидетельствует о низком содержании в воде патогенной микрофлоры.

Таким образом, анализ полученных данных показал сходства и некоторые отличия в уровнях исследуемых показателей у рыб. Зафиксированные отличия пород карпа по некоторым из исследуемых показателей указывают на возрастные и физиологические особенности разных пород, а также могут зависеть от зоны рыбоводства и уровня кормления.

Определено, что среди кроссов кросс «Ергенинский» (зеркальная группа) отличается наиболее стабильным иммуно-биохимическим статусом во всех исследованных тканях, кросс «Петровский» также обладает оптимальным сочетанием показателей в сыворотке крови и паренхиматозных органах, что позволяет считать эти группы наиболее устойчивыми к возможному заражению инфекционными и инвазионными заболеваниями и нарушению условий выращивания.

Выявленные различия по ряду иммуно-биохимических показателей между сомами разного возраста и между особями из разных рыбоводных зон обусловлены физиологическими

особенностями рыб и условиями среды. Пониженные значения показателей МДА, ИК и КОС у сеголеток сома указывают на комфортные условия содержания, низкое содержание в воде патогенной микрофлоры и хорошее функциональное состояние организма рыб.

Полученные данные могут служить основой для осуществления мониторинга состояния здоровья рыб при индустриальных способах выращивания, получения жизнестойких особей и увеличения рыбопродуктивности.

#### Список литературы

1. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г. и др. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука, 1992. 148 с.
2. Валедская, О.М. Состояние иммунитета волжских рыб и его динамика в различных условиях обитания // Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2005. 112с.
3. Головина Н.А., Стрелков Ю.А., Воронин В.Н., Головин П.П., Евдокимова Е.Б., Юхименко Л.Н. Ихтиопатология (ред. Н.А. Головина, О.Н. Бауэр). М.: Мир, 2003, 448 с.
4. Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных. Лабораторное дело, 1981, 8: 493-496.
5. Грубинко В.В., Леус Ю.В, Арсан О.М. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у рыб (обзор) // Гидробиол. журн. 2001. Т.37, № 1. С. 64-78.
6. Кашулин Н.А., Лукин А.А., Амонтсен П.А. Рыбы пресных вод Субарктики как биоиндикаторы техногенного загрязнения. Апатиты, 1999. 142 с.
7. Логинов С.И., Смирнов П.Н., Трунов А.Н. Иммунные комплексы у животных и человека: норма и патология. РАСХН. Сиб. Отд-ние. ИЭВСиДВ.: Новосибирск. 1999. 144 с.
8. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА. 2008. 284 с.
9. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН. 1991. 154 с.
10. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. и др. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука. 2001. 126 с.
11. Микряков В.Р., Силкина Н.И., Микряков Д.В. Влияние антропогенного загрязнения на иммунологические и биохимические механизмы поддержания гомеостаза у рыб Черного моря // Биология моря. 2011. Т. 37. № 2. С. 142-148.
12. Моисеенко Т.Н., Лукин А.А. Патологии рыб в загрязняемых водоемах Субарктики и их диагностика // Вопросы ихтиологии, 1999. Т. 39, №4. С. 535-547.



13. Решетников Ю.С., Попова О.А., Кашулин Н.А., Лукин А.А., Амондсен П.А., Сталдвик Ф. Оценка благополучия рыбной части водного сообщества по результатам морфопатологического анализа рыб // Успехи современной биологии, 1999. Т.119, №2. С. 165-177.

14. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. 2000. М.: Мир. 592 с.

15. Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала. // Укр. биохим. журн., 1985, 57(3). С. 50-52.

16. Силкина Н.И., Микряков В.Р., Микряков Д.В. Особенности липидного обмена леща *Abramis brama*, обитающего в реках Южного Урала // Экология. 2010. № 6. С. 472-474.

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

18. Rudneva I.I., Kuzminova N.S. Effect of chronic pollution on hepatic antioxidant system of Black Sea fish species // Int. J. Sci. and Nature. 2011. Т. 2. № 2. P. 279–286.

19. Winston G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Compar. biochem. and Physiol. 1991. V. 100, № 1–2. P. 173–176.

#### **USE OF SOME IMMUNOLOGICAL BIOCHEMICAL INDICATORS FOR COMPARISON PURPOSES VARIOUS BREEDS AND CROSS- COUNTRIES OF THE FISHES WHO ARE GROWN UP IN FISH- BREEDING FARMS**

G. I. Pronina, D.V. Mikryakov, N.I. Silkina, A.B. Petrushin

At intensive cultivation and unilateral selection of fishes on efficiency they decrease resistance to diseases. One of solutions of a problem is increase of immune stability. The first step on this way – an assessment of a condition of immunity of productive fishes. The real work is devoted to research of different types and breeds of the fishes who are grown up in karp fish-breeding farms on biochemical and immunological indicators. Were defined: bacterial activity of serum of blood, maintenance of nonspecific immune complexes, low-new диальдегид, constant of inhibition of oxidation of a substratum. It is defined that among cross-countries of a carp the infectious and invasive diseases, steadiest against possible infection, and violation of conditions of cultivation are hybrid "Petrovsky" and "Ergeninsky". The revealed distinctions on a number of immuno-biochemical indicators between individuals *Silurus glanis* of different age and fish-breeding zones are caused by physiological features of fishes and conditions of the environment. The obtained data can form a basis for implementation of monitoring of a state of health of fishes at industrial ways of cultivation, receiving durable individuals and increases in a fish products.

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ В ВОДОЕМАХ ЕВРОПЕЙСКОГО СЕВЕРО-ВОСТОКА

Ю.С. Решетников, О.А. Попова

*Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова  
РАН, Москва, E-mail: ysreshetnikov@gmail.com*

Европейский Северо-Восток России охватывает бассейны рек от Онеги на западе до Кары на востоке и по зоогеографическому районированию относится к Ледовитоморской провинции Циркумпольярной подобласти. Размежевание с сопредельными территориями западной части Североевропейского округа, Балтийским, Каспийским и Сибирским округами проходит по западному контуру бассейна р.Онеги, по линии водораздела Северной Двины и Волги и продолжается далее по Уральскому Печоро-Обскому водоразделу, восточному контуру р. Кары. Северное простираение окаймлено морской береговой линией Новой Земли, Вайгача, Колгуева и более мелких арктических островов региона.

Современная ихтиофауна региона состоит из 52 видов круглоротых и рыб, из которых 44 вида являются аборигенными. Из лососевых рыб здесь встречается 6 видов, из сиговых 8 и из хариусовых – 2 вида. Основу рыбного населения по биомассе и по уловам составляют лососевые и сиговые рыбы, которые являются доминантными видами в большинстве водоемов.

Ихтиофауна европейского Северо-Востока представляет собой яркий пример взаимного проникновения фаун, а в реках самой восточной части этого региона происходит встреча фаун Европы и Сибири. С одной стороны, европейские виды проходили в Сибирь, а, с другой, чисто сибирские виды проникали в Европу; это было или в момент последнего оледенения через систему приледниковых озер, или после таяния ледника по системе опресненных прибрежных водоемов. При продвижении европейских видов на восток далее Северной Двины уже не встречается голавль, лишь до Мезени доходит уклейка, дальше Волонги не распространяются кумжа и трехиглая колюшка; на Печоре кончаются ареалы европейской ряпушки, европейской

корюшки, многих карповых рыб, усатого гольца, речного угря. С другой стороны, с востока на запад дальше всех проникает азиатская зубатая корюшка, сибирская минога и пелядь; дальше Печоры не проходят чир, муксун, сибирская ряпушка, сибирский хариус, проходной арктический голец и даже омуль (до Мезени) (рис. 1).

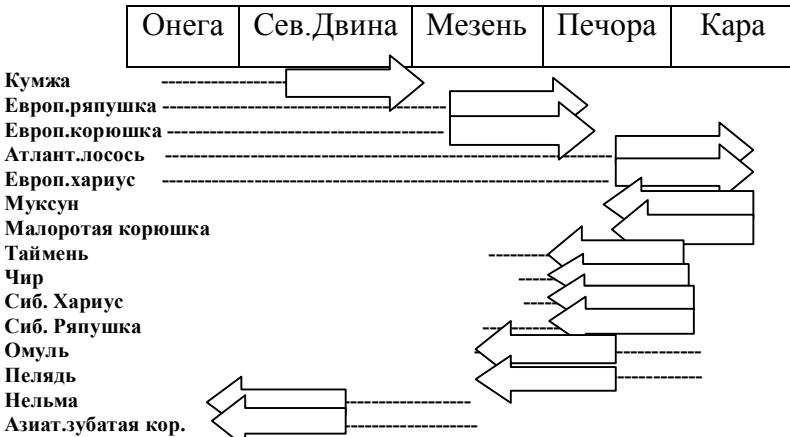


Рис. 1 Проникновение европейских видов рыб на восток и сибирских видов в водоемы Европы.

В последние столетия и десятилетия в регион проникли новые виды рыб в связи с постройкой каналов, работами по акклиматизации в 1960-е годы (судак, стерлядь, сибирский осетр) и частично с потеплением климата и саморасселением (жерех, голавль, белоглазка). Появление в регионе ротана – скорее всего занос аквариумистами-любителями. Таким образом процесс изменения ихтиофауны идет постоянно, причем в разные периоды с разной скоростью. Отметим, что во времена неолита в бассейне Белого моря водились такие южные теплолюбивые виды как синец *Abramis ballerus*, краснопёрка *Scardinius erythrophthalmus*, жерех *Aspius aspius* и сом *Silurus glanis*, что было обусловлено более теплым климатом в конце суббореального времени (2-3 тысячелетие до н.э.) (Никольский, 1935; Лебедев, 1960; Цепкин, 1999).

Затем в связи с похолоданием в субатлантическое время эти виды исчезли из бассейнов Онеги и Северной Двины. Но вполне вероятно, что отдельные популяции краснопёрки сохранились в

отдельных озерах-рефугиях и существуют в них до настоящего времени. В последнее время все больше находок таких якобы вымерших видов регистрируется в водоемах европейского Северо-Востока (Соловкина, 1969; Новоселов, 2000, 2010; Бознак, 2004, 2008; Дворянкин, 2014). Изменения в составе ихтиофауны региона идут постоянно и будут продолжаться и в будущем. Иногда они имеют длительный период и происходят медленно (смена климатических условий). Однако в последние годы в связи с изменением общей экологической ситуации в водоемах изменения в составе и структуре рыбного населения резко возросли.

Таким образом, рыбное население европейского Северо-Востока находится под влиянием разных антропогенных факторов. Следует иметь в виду, что общая экологическая ситуация в водоемах региона постоянно ухудшается за счет результатов хозяйственной деятельности человека. Отметим основные причины ухудшения экологической ситуации: 1) стоки промышленных (ЦКБ) и хозяйственных предприятий; 2) нефтяные загрязнения и разработка полезных ископаемых; 3) чрезмерный вылов рыбы (промысел плюс неучтенный вылов); 4) акклиматизация, интродукция и саморасселение рыб. Главными из них являются чрезмерный промысел и загрязнение водоемов.

Самое крупное нерестовое стадо сёмги имеется в Печоре, численность которого ранее оценивалась в 80-90 тыс. производителей, Самая высокая численность нерестового стада сёмги Печоры была в 1955-1965 гг. на уровне 140 тыс. экз; в эти годы зафиксирован максимальный вылов в 750 т. С началом «перестройки» (1990-е годы) резко возрос так называемый «неучтенный лов» (браконьерство), который по современным оценкам в 3-4 раза выше официального вылова. Резкое снижение улова на усилии также свидетельствует о подрыве запасов сёмги. Вызывает опасение и соотношение «остатка» и «пополнения» в нерестовом стаде семги: если раньше доля рыб, повторно пришедших на нерест, составляла до 50% нерестового стада («остаток»), то теперь в Печоре доля повторно нерестующих рыб колеблется от 4 до 11%. Основу нерестового стада теперь составляют рыбы, впервые пришедшие на нерест («пополнение»);

сёмга превращается в вид с одноразовым нерестом в течение жизни по типу тихоокеанских лососей. В последнее десятилетие численность печорского стада упала до 40 тыс. экз, а общий промысловый вылов сёмги во всех реках европейском Северо-Востоке составляет всего 50-100 т.

Известно, что осенью 1994 г. на р. Харьяге (бассейн р. Колвы) произошла крупная авария. В этот год в воды Усы попало по разным подсчетам от 100 до 160 тыс. т сырой нефти. По системе Колва-Уса огромное количество нефти поступило в Печору, что было расценено как крупная экологическая катастрофа. Мелкие локальные аварии встречаются на нефтепроводах постоянно, на Печоре нефтяные загрязнения проявляются в постоянном ухудшении качества вод и сказываются на численности нерестовых стад сиговых рыб, которые заходят на нерест в реки Уса и Колва. Крупная авария 1994 г. сразу привела к обвальному падению численности стад сиговых рыб на местах их преднерестовых скоплений (Лукин и др., 2000).

Как результат влияния загрязнений Усы можно рассматривать резкое снижение численности производителей сиговых на нерестилищах в послеаварийный период: сига – в 22 раза, пеляди – в 30 раз, ряпушки – в 33 раза. При этом каждый вид сиговых рыб по-своему реагировал на нефтяное загрязнение согласно особенностям его биологии. Наши работы на Усе проводились осенью 2008 г., даже в этот год, спустя 24 года после аварии, были видны её последствия, когда по маленьким ручейкам нефть поступала в русло Усы (череда локальных аварийных разливов). Это еще раз подтверждает наше мнение, что оценить величины загрязнения только по единым для всех регионов страны ПДК невозможно; они должны иметь региональный характер и для водоемов Крайнего Севера они должны отличаться на 3-7 порядков в зависимости от совокупности «условий среды». Отметим, что после годов наибольшей депрессии (1995-1996) численность производителей сиговых рыб начала медленно возрастать, но и к 2007-2008 гг. (наши последние ихтиологические сборы) полного восстановления нерестовых стад так и не произошло.

Отметим наиболее тревожные факты в изменении общей экологической ситуации региона и среди популяций рыб:

1. Общая тенденция развития региона направлена на наращивание объемов добычи и усиление транспортной сети минерального сырья, что катастрофически усиливает ухудшение экологической ситуации.

2. Многие стада сиговых рыб в водоемах европейского Северо-Востока часто представлены впервые нерестующими рыбами (доля «остатка» катастрофически падает). Это прежде всего относится к семге и полупроходным сиговым рыбам, которые по типу нереста становятся подобными тихоокеанским лососям с одноразовым икрометанием.

3. Ослабленный организм рыб стал более восприимчив к паразитам. Число зараженных особей сиговых рыб в 1980-е годы составило 8%, в 1990-е – уже 33% и в 2000-е оно возросло до 47%. Увеличилась встречаемость рыб с эндопаразитами (заболевания дифиллоботриозом и тетракотилезом) у ряпушки, сига и чира. Дифиллоботриоз в виде личинок малого лентеца локализуется на внутренних органах, в первую очередь на желудке. Тетракотилез вызывается личинками (метацеркариями) трематод, которые локализуются на наружных стенках сердца.

4. Загрязнение воды приводит к серьезным аномалиям в развитии гонад и снижению репродуктивного потенциала сиговых рыб. Так, аномалии в 1960-е годы прошлого столетия отмечались лишь у единичных особей; в 1970-е – у 5%; в 1980-е – у 64%; в 1990-2000-е – снизилось до 20%. Отмечены отклонения в развитии внутренних органов, чаще в воспроизводительной системе и преимущественно у короткоцикловых рыб. Так, в начале 1960 гг. у ряпушки отмечались единичные особи с нарушениями в системе воспроизводства (асимметрия гонад и перетяжки в гонадах). В 1970-е годы таких рыб стало 5% от нерестового стада, в 1980 – 64%, что превысило уровень 1960-х годов в 10-15 раз. В начале 1990-х годов число таких рыб снизилось до 20%, и сейчас число пораженных рыб держится на этом уровне (Новоселов, Студенов 2014; Решетников, 2014; Сидоров, Решетников, 2014).

Патолого-морфологический анализ выявил многочисленные аномалии в жабрах, почках, печени и в гонадах рыб. В жабрах сиговых рыб отмечались такие явления как гиперплазия, отслоение эпителия жаберных тычинок, гиперемия, слияние жаберных лепестков нарушение их структуры, дегенерация и некроз хрящевой ткани, разрыв кровеносных сосудов и кровоизлияния; у пеляди отмечены опухолевые разрастания. В печени рыб отмечались вакуолизация и зернистость цитоплазмы гепатоцитов, отек и некроз паренхимы, разрастание соединительной ткани, многочисленные кровоизлияния, токсическая жировая дистрофия и другие явления; у сига и пеляди диагностированы опухоли в печени. В почках выявлены обширные кровоизлияния и очаги некроза, чрезмерное разрастание соединительной ткани, дегенеративная пролиферация эпителия и очаги опухолевой ткани вокруг крупных выводящих протоков. В гонадах отмечены усиление асимметрии гонад, разрастания соединительной ткани и наличие перетяжек.

Общими патологиями органов и тканей рыб данного региона были отеки, экссудаты, кровоизлияния. В печени сигов были установлены белково-жировая дистрофия и раковые опухоли. Полученные данные свидетельствуют о том, что в органах рыб преобладали новообразовательные процессы- от гиперплазии до образования опухолей. Большие нарушения в системе кровообращения и в форме эритроцитов дают основания предполагать, что на рыб постоянно воздействовали химические агенты.

Всё это свидетельствует о нестабильной экологической ситуации в регионе в последние десятилетия. Поскольку главной экономической политикой страны является наращивание добычи нефти и минерального сырья, несмотря на неблагоприятную экологическую ситуацию на европейском Северо-Востоке, то, скорее всего в ближайшем будущем не следует ожидать успешного естественного восстановления запасов сиговых и лососевых рыб. Возможные пути изменения сложившейся ситуации видятся в восстановлении действенной рыбоохраны и снижении несанкционированного (браконьерского) лова. И особо актуальным является дополнение естественного воспроизводства

ценных промысловых видов искусственным посредством выращивания на рыбоводных предприятиях их молоди с последующим выпуском в водоемы.

Список литературы

Бознак Э.И. 2004. Головешка-ротан *Perccottus glenii* (Eleotridae) из бассейна реки Вычегда // Вопр. ихтиологии. Т. 44, № 5. С. 712–713.

Бознак Э.И. 2008. Красноперка *Scardinius erythrophthalmus* притоков реки Северная Двина // Вопр. ихтиологии. Т. 48, № 3. С. 427–429.

Лебедев В.Д. 1960. Пресноводная четвертичная ихтиофауна европейской части СССР. М.: МГУ. 404 с.

Лукин А.А., Даувальтер В.А., Новоселов А.П. 2000. Экосистема реки Печоры в современных условиях. Апатиты: РАН. 192 с.

Никольский Г.В. 1935. Список рыб из неолита р. Онеги // Бюлл. Моск. об-ва испыт. природы. Отд. биологии. Т. XLIV, № 3. С. 113–118.

Новоселов А.П. 2010. Ихтиофауна рек Европейского Северо-востока России // Вестник Архангельского отделения ПАНИ. Выпуск 2, Архангельск, С. 22-38.

Новоселов А.П., Студенов И.И. 2014. О состоянии промысловой ихтиофауны крупных речных бассейнов европейского Северо-Востока России // Биологические ресурсы внутренних водоемов и их рациональное использование. Мат-лы докладов II Всерос. Конференции с междуна. участием 6-9 ноября 2014. Борок. М.: ПОЛИГРАФ-ПЛУС. Т. 2. С. 414-420.

Решетников Ю.С. 2014. Лососеобразные рыбы европейского Северо-Востока // Биологические ресурсы внутренних водоемов и их рациональное использование. Мат-лы докладов II Всерос. Конференции с междуна. участием 6-9 ноября 2014. В двух томах. М.: ПОЛИГРАФ-ПЛУС. Том 2. С. 479-492.

Сидоров Г.П., Решетников Ю.С. 2014. Лососеобразные рыбы водоемов европейского Северо-Востока. М.: Тов-во научных изданий КМК. 342 с.

Цепкин Е.А. 1999. Ихтиофауна бассейна реки Онеги – четкий индикатор изменений климата в Голоцене // Вопросы ихтиологии. Т. 39. № 1. С. 117-119.

## THE MODERN STATE OF SALMONID FISHES IN THE NORTH-EAST OF EUROPE

Yu.S. Reshetnikov, O.A. Popova

The present ichthyofauna of European North-East waterbodies consist of 52 species, including 44 native species. There are 6 species from family Salmonidae, 8 – from Coregonidae, 2 – from Thymallydae and 3 – from Osmeridae. Dominant species among all fishes are Salmonidae and Coregonidae. Anthropogenic factors bring to decreasing of common ecological situation in region. The main causes are following: 1) industrial flowings and conditions of life; 2) oil pollutions and exploitation of minerals; 3) extensive fishing (including the illegal fishing); 4) introduction and self-settling of fish. There are morpho-pathological anomalies in the organs and tissues of fish (gill, liver, kidney and gonad).



## **К ПРОБЛЕМЕ РАЗРАБОТКИ СИСТЕМНЫХ НАУЧНО ОБОСНОВАННЫХ МЕР ПО ОБЕСПЕЧЕНИЮ ИХТИОПАТОЛОГИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ ОБЪЕКТОВ И ХОЗЯЙСТВ АКВАКУЛЬТУРЫ РОССИИ**

С.Л. Рудакова

*Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (КамчатНИРО), Петропавловск-Камчатский, Россия, e-mail: rudakova@kamniro.ru*

Одними из приоритетных направлений государственной политики в сфере развития рыбохозяйственного комплекса является развитие искусственного воспроизводства водных биологических ресурсов, аква- и марикультуры, а также обеспечение системы мониторинга качества и безопасности водных биологических ресурсов, среды их обитания, продуктов их переработки, ведения технологических процессов рыболовства и рыбоводства (государственная программа Российской Федерации "Развитие рыбохозяйственного комплекса", утверждена постановлением Правительства Российской Федерации от 15 апреля 2014 г. N 314).

В этой связи, начиная с 2015 года, возобновлено целевое финансирование исследований в области аквакультуры по приоритетным направлениям, в том числе по теме «Разработка комплексной системы научно обоснованных мер по обеспечению ихтиопатологического благополучия объектов и хозяйств аквакультуры в Российской Федерации». На этой основе предполагается объединить потенциал отраслевых НИИ для проведения совместных исследований в рамках общих проектов. Подобный подход позволит скоординировать работы, исключить их дублирование и фрагментарность, рационализировать использование выделенных федеральных денежных средств и направить их на решение общероссийских целей и задач.

Актуальность данной проблемы обусловлена:

увеличением количества предприятий аквакультуры всех форм собственности, интенсификацией производства продукции

аквакультуры, внедрением новых технологий и объектов разведения гидробионтов;

перевозками посадочного материала и оплодотворенной икры между регионами и из зарубежных стран, что неизбежно приводит к повышению риска возникновения и распространения заболеваний в аквакультуре;

возможностью распространения заболеваний от объектов аквакультуры гидробионтам естественных популяций;

отсутствием актуальных ветеринарно-санитарных правил в аквакультуре;

отсутствием оптимизированной системы эпизоотического мониторинга хозяйств аквакультуры и естественных водоемов;

отсутствием скоординированных действий специалистов ихтиопатологов рыбохозяйственных НИИ между собой, а также со специалистами Россельхознадзора и Департамента Ветеринарии субъектов Федерации.

**Цель работы** – разработка предложений для формирования комплексной системы научно обоснованных мер по обеспечению ихтиопатологического благополучия объектов и хозяйств аквакультуры в Российской Федерации.

До 1960 г. государственного контроля за эпизоотическим состоянием рыб, обитающих в естественных водоемах и выращиваемых в рыбоводных хозяйствах, не существовало. Вопросами оценки эпизоотического состояния водоемов и организации борьбы с обнаруженными заболеваниями занимались специалисты рыбохозяйственных организаций и различных научных подразделений в рыбохозяйственных научно-исследовательских институтах. Первыми изучать болезни рыб стали ихтиопатологи Всесоюзного научно-исследовательского института озерного и рыбного хозяйства (ныне ГосНИОРХ) в Ленинграде, где в 1929 г. была создана лаборатория по изучению болезней рыб под руководством чл.-кор. АН СССР В.А. Догеля. Всероссийский научно-исследовательский институт прудового рыбного хозяйства (ВНИИПРХ), расположенный в пос. Рыбное Московской области, стал вторым научным учреждением, в котором создана ихтиопатологическая лаборатория.

В конце 1960 г. был установлен государственный ветеринарный надзор за рыбохозяйственными водоемами России. В настоящее время в Российской Федерации задачи эпизоотического контроля ситуации с водными животными возложены на Департамент Ветеринарии и Россельхознадзор. Однако, на сегодняшний день системный подход к профилактике и контролю распространения заболеваний рыб отсутствует. Ветеринарные службы, в силу высокой загруженности в животноводстве и птицеводстве, не могут уделять достаточного внимания этой проблеме. Подведомственные Россельхознадзору ФГБУ, а также лаборатории Ветеринарных управлений субъектов РФ проводят лабораторные исследования в рамках эпизоотического мониторинга, государственной работы «Лабораторные исследования по диагностике и профилактике болезней животных, направленные на обеспечение охраны территории РФ от заноса из иностранных государств и распространения болезней животных». Однако эти работы проводятся без учета особенностей биологии объектов аквакультуры, патогенов и биотехнологии культивирования гидробионтов. Поэтому зачастую средства федерального бюджета расходуются впустую, полученные результаты не отражают реальной картины распространения особо опасных патогенов в водоемах и на рыбоводных хозяйствах России.

Рыбохозяйственные НИИ проводят ихтиопатологические исследования объектов аквакультуры, но согласованная программа этих работ также отсутствует. Кроме того, подчас отсутствует понимание общей цели проведения таких исследований.

На сегодняшний день нормативная база по обеспечению ихтиопатологического благополучия объектов и хозяйств аквакультуры не соответствует мировым стандартам. Правила, устанавливающие ветеринарно-санитарные требования к аквакультуре (рыбоводству), ветеринарно-санитарной экспертизе и другие требования в области ветеринарии отражены в документах бывшего СССР и касаются, в основном, прудовых хозяйств и рыбоводных заводов. А в современных условиях развитие аквакультуры идет по нескольким направлениям, существенно отличающимся друг от друга – пастбищная

аквакультура; прудовая аквакультура; индустриальная аквакультура (в бассейнах, на установках с замкнутой системой водоснабжения, а также на рыбоводных участках с использованием садков); искусственное воспроизводство (ОРЗ, ЛРЗ, НВХ); марикультура.

В Российской Федерации действуют только около 2,5 тысяч товарных рыбоводных организаций. Это, как правило, небольшие хозяйства, производящие от нескольких до 1,5-2,0 тыс. тонн в год. В последнее время наблюдается тенденция к увеличению, как количества самих рыбоводных хозяйств, так и объемов производимой ими продукции. Определенное развитие получило фермерское рыбоводство, однако учет выращиваемой рыбы в этом секторе аквакультуры в настоящее время затруднен и оценивается экспертным путем.

Прежде всего, необходимо понимать, что продукцию аквакультуры нужно контролировать в двух направлениях. Первое – это с точки зрения опасности патогенов для самих гидробионтов в процессе выращивания. Это те патогены, которые способны привести к гибели значительное количество объектов аквакультуры, ухудшить их качество, тем самым повлияв на экономическую эффективность производства. Эти патогены в свою очередь делятся на эпизоотически значимые (особо опасные, карантинные) и прочие. Такой мониторинг должен проводиться в процессе всего воспроизводства специально обученным сотрудником-ихтиопатологом хозяйства, а в критические моменты (с точки зрения биотехнологии воспроизводства, биологии выращиваемого вида и предполагаемого патогена), например, процесс нереста, поднятия на плав личинок и т.д., ветеринарные специалисты должны провести отбор проб для выявления особо опасных (карантинных) патогенов.

Второе – это патогены, опасные для здоровья людей и теплокровных животных. Такие исследования должны проводиться перед отправкой продукции в торговые сети или на переработку. По большому счету в этом случае хозяйство должно получить ветеринарное свидетельство, позволяющее реализацию продукции на основе ветеринарно-санитарной экспертизы в соответствии с СанПин.

Предприятия аквакультуры подвержены большому количеству рисков, в том числе и внешних, к которым относятся болезни гидробионтов. В каждом регионе существует специфика в распространении тех или иных патогенов, их сезонная и годовая динамика. Некоторые патогены имеют широкое распространение, но низкую интенсивность поражения хозяина и не причиняют ему заметного вреда или с ними можно бороться тем или иным способом, таких большинство. Другие распространены в отдельных регионах, но благодаря высокой степени патогенности могут стать серьезной проблемой, особенно для хозяйств аквакультуры.

Предварительный ретроспективный анализ данных научных исследований и эпизоотического мониторинга ветеринарных лабораторий показал, что на их основании невозможно дать полной картины распространения заболеваний гидробионтов в целом по России, поскольку данные отрывочны и бессистемны.

Однако, проанализировав результаты работы лаборатории здоровья гидробионтов КамчатНИРО начиная с 2000 года, показали, что было обнаружено более 40 видов патогенов (паразитов, бактерий и вирусов), но только один вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани при попадании на рыбоводные заводы приводит к масштабной гибели и не поддается лечению. Таким образом, в целом, болезни гидробионтов в аквакультуре можно условно поделить на два типа.

**I тип** – особо опасные, которые при попадании в хозяйства или на рыбоводные заводы приводят к гибели значительного количества выращиваемых гидробионтов, поскольку методы лечения для них не разработаны. Не допустить возникновения эпизоотий (вспышек заболеваний) возможно только при соблюдении соответствующих мер профилактики и контроля, которые препятствуют попаданию патогенов на предприятие. Эти болезни включены в перечень Международного эпизоотического бюро (ОIE, 2011) и Приказы Минсельхоза (Приказ Минсельхоза N 62..., 2011; Приказ Минсельхоза N 476..., 2011). При их попадании в новые ареалы (например, с посадочным материалом) может произойти гибель значительной части чувствительных

гидробионтов в естественной среде обитания. Показательным примером таких «пандемий» является гиродактилез в реках Норвегии (в 42 реках погибла вся молодь атлантического лосося), распространение вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани в США и далее по всему миру. Научно-исследовательские работы должны быть направлены на минимизацию этого риска для хозяйств аквакультуры и рыбохозяйственных водоемов, на разработку инновационных методов их профилактики/контроля и лечения. Заболевания, вызываемые этими патогенами в хозяйствах аквакультуры должны контролироваться ветеринарами при поддержке специалистов рыбохозяйственных НИИ, и эпизоотический мониторинг по ним должен финансироваться из средств Федерального бюджета.

**II тип** – это болезни, которые возникают в хозяйствах при нарушении технологии воспроизводства и/или выращивания гидробионтов. Как правило, возбудители их вызывающие являются условно-патогенными, они могут сожительствовать с хозяином и не вызывать серьезных проблем в нормальных условиях. При своевременной диагностике и правильном лечении и/или при проведении специальных профилактических мероприятий, гибели выращиваемых объектов можно избежать или сократить ее до минимума. Научно-исследовательские работы, финансируемые предприятиями аквакультуры, должны быть направлены на выявление риска заноса таких патогенов на рыбоводные хозяйства и разработку передовых методов борьбы с ними.

Таким образом, в целях экономии бюджетных средств, затрачиваемых на проведение тотальных ветеринарных проверок, необходимо для каждого региона и каждого типа хозяйства с учетом объектов выращивания и международной эпизоотической обстановки, составить перечень патогенов, которые должны контролировать ветеринарные службы. Остальные патогены не опасны для здоровья человека и животных и не имеют эпизоотического значения. При попадании с заводов в естественную среду они не нанесут вреда водоемам, поскольку они там уже есть и нормально сосуществуют с популяциями своих хозяев при обычных условиях. Их (патогенов) рыбоводные

хозяйства должны контролировать самостоятельно, поскольку в этом будет их прямая заинтересованность если они хотят увеличить рыбопродуктивность своего хозяйства. Для этой цели следует составить план профилактических мероприятий для хозяйства, который должен быть утвержден департаментом ветеринарии субъекта федерации.

В рамках выполнения государственной работы: «Разработка комплексной системы научно обоснованных мер по обеспечению ихтиопатологического благополучия объектов и хозяйств аквакультуры в Российской Федерации» специалистам ихтиопатологам рыбохозяйственных НИИ необходимо:

1. запросить в территориальных управлениях Росрыболовства перечень рыбоводных хозяйств с разбивкой по типам (прудовое, садковое, бассейновое, УЗВ, пастбищное и т.д.) и объектам выращивания с привязкой к водным объектам. провести ревизию патогенов на хозяйствах аквакультуры, оценить степень их опасности для выращиваемых гидробионтов;

2. привести в соответствие перечни патогенов, по которым необходимо проводить эпизоотический мониторинг рыбоводных хозяйств, оценив степень их опасности для выращиваемых гидробионтов и для окружающей среды, указав напротив каждого патогена чувствительные виды гидробионтов, пути заражения, оптимальное время отбора проб для выявления патогена.

3. изучить эпизоотическую обстановку в сопредельных регионах, откуда осуществляют завоз посадочного материала для товарной аквакультуры, оценить риск заноса в Российскую Федерацию;

4. проработать алгоритм качественного мониторинга рыбоводных предприятий с учетом особенностей существующих технологий и биологии выращиваемых видов гидробионтов, а также с учетом риска возникновения тех или иных заболеваний;

5. совместно со специалистами Россельхознадзора и Департаментом ветеринарии разработать план проведения эпизоотического мониторинга рыбоводных хозяйств Российской Федерации;

6. принять активное участие в разработке ветеринарных правил для хозяйств аквакультуры;

7. представить материалы к отраслевому банку данных ихтиопатологических обследований хозяйств аквакультуры, выполненных в 2015 г.

8. представить предложения по обновлению отраслевого сборника документации по профилактике и борьбе с болезнями объектов аквакультуры.

#### Список литературы

Ветеринарно-санитарный кодекс водных животных. Всемирная организация охраны здоровья животных (OIE). 12-е издание. 2009. <http://www.oie.int>. 328 с.

Приказ Минсельхоза N 62 от 9 марта 2011 г. «Об утверждении перечня заразных и других болезней животных».

Приказ Минсельхоза N 476 от 19 декабря 2011 г. «Об утверждении перечня заразных, в том числе особо опасных, болезней животных, по которым могут устанавливаться ограничительные мероприятия (карантин).

### **TO A PROBLEM OF DEVELOPMENT OF SYSTEMS SCIENCE-BASED APPROACH FOR MAINTENANCE OF AQUATIC ANIMAL HEALTH SECURITY OF RUSSIAN AQUACULTURE**

S.L. Rudakova

Beginning in 2015, resumed targeted funding of research in the field of aquaculture in priority areas, including on the theme "Development of systems science-based approach for maintenance of aquatic animal health security of Russian aquaculture". It is supposed to combine the potential of industrial research institutes to conduct joint research in the framework of joint projects. This approach would coordinate the work to eliminate duplication and fragmentation, rationalize the use of federal funds and send them to the solution nationwide goals and objectives.

### **ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО НЕКРОЗА ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ (IHNV) В БАССЕЙНЕ РЕКИ БОЛЬШАЯ (КАМЧАТКА)**

С.Л. Рудакова, Г. Кюраф<sup>\*</sup>, Е.В. Бочкова

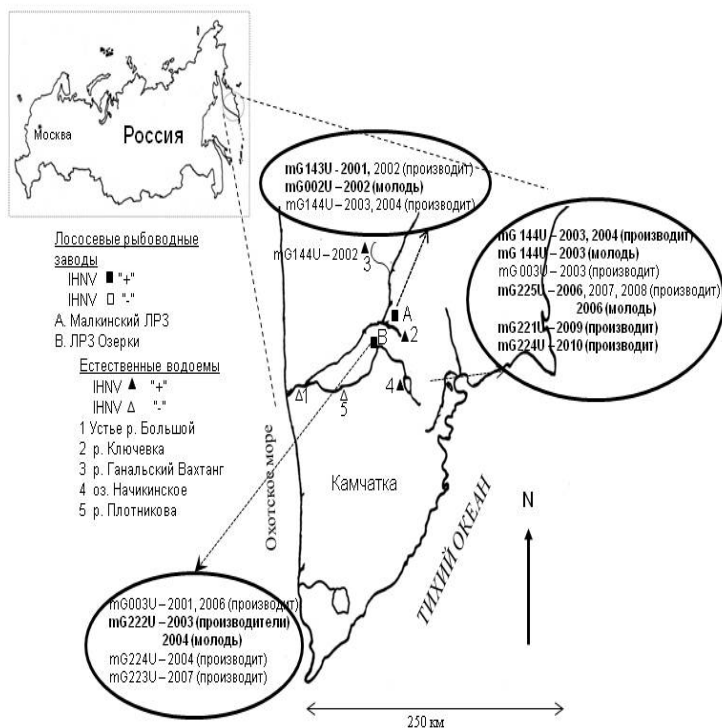
*Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (КамчатНИРО), Петропавловск-Камчатский, Россия*

*\* U.S.G.S. Western Fisheries Research Center, Суэгл, США, e-mail: [rudakova@kamniro.ru](mailto:rudakova@kamniro.ru)*



Вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) это рабдовирус, который вызывает экономически значимую болезнь лососевых рыб, распространенную по всему миру. Вирусологические исследования популяций нерки в бассейне р. Большой (Камчатка) начались в 2000 г. В бассейне этой реки расположены два лососевых рыбодоводных завода (ЛРЗ) – Малкинский ЛРЗ и ЛРЗ Озерки, на которых в 2002 и 2004 г. произошли эпизоотии инфекционного некроза гемопоэтической ткани у выращиваемой молоди нерки (Рудакова, 2003). В результате многолетних вирусологических исследований установлено, что бассейн р. Большой является естественным резервуаром IHNV, но изоляты вируса из разных водоемов бассейна показали их филогенетическую неоднородность (рис.).

Рисунок – Карта-схема распространения IHNV в бассейне р. Большая (Камчатка) и филогенетические различия выделенных изолятов



Мы сравнили филогенетические различия изолятов IHNV, полученных от потомков и родителей с ЛРЗ и получили интересные результаты. Во-первых, мы показали, что ИHN эпизоотия на ЛРЗ Озерки, наиболее вероятно, произошла в результате передачи вируса от производителей вирусоносителей молоди, поскольку нуклеотидные последовательности изолятов IHNV от производителей, используемых для воспроизводства и зараженной молоди были идентичны. Другая картина наблюдалась на Малкинском ЛРЗ, где нуклеотидные последовательности изолятов IHNV зараженной молоди и производителей были различными.

В этом случае, мы предположили, что источником заражения молоди была вода, которая через водозабор поступала из верховьев р. Ключевка, где расположены нерестилища диких рыб (Рудакова, 2004). Стоит отметить, что нуклеотидная последовательность, обнаруженная у зараженной молоди нерки на МЛРЗ является уникальной, она не была обнаружена у изолятов, выделенных ни у половозрелых рыб, ни у молоди из бассейна р. Большой, несмотря на большое количество исследованных проб. Отобрать пробы от рыб в районе водозабора МЛРЗ в период эпизоотии не представлялось возможным, поскольку нерест уже закончился и вероятнее всего вирус сохранялся длительное время в иловых отложениях. А перед началом эпизоотии была авария на водозаборе и в бассейны с молодью нерки поступала вода с большим количеством ила. Две естественных вспышки ИHN были зафиксированы у молоди нерки в оз. Начикинское в 2003 и 2006 гг. Филогенетическое типирование изолятов IHNV из оз. Начикинское показало, что у инфицированной молоди и половозрелой нерки, выловленных в одном месте и в один год нуклеотидные последовательности были идентичными. Это подтверждает ранее выдвинутую нами гипотезу, что естественные эпизоотии в оз. Начикинском были результатом передачи вируса от половозрелых рыб вирусоносителей молоди предыдущей генерации. Это обусловлено тем, что во время нереста половозрелых рыб в литорали этого озера нагуливаются сеголетки нерки, чувствительные к данному вирусу (Рудакова, 2010). Другой интересный результат нашей работы заключается в том,

что была обнаружена неоднородность в нуклеотидных последовательностях у изолятов IHNV, полученных от половозрелых рыб из оз. Начикинское в разные годы исследований. Кроме того, генетическое типирование показало, что IHNV изоляты Камчатки и Северной Америки идентичны или очень близки генетически и находятся в U-геногруппе (Rudakova et al., 2007). Эта работа является предварительным результатом российско-американского сотрудничества и будет продолжена для того, чтобы понять региональные и межконтинентальные особенности эпидемиологии и эволюции IHNV.

#### Список литературы

Рудакова С.Л. Некроз гемопоэтической ткани у производителей нерки и предполагаемые источники инфекции // Вопросы рыболовства, том.4, №1(13). 2003. с. 93-102.

Рудакова С.Л. Анализ развития эпизоотий, вызванной вирусом инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) у мальков нерки *Oncorhynchus nerka* при искусственном выращивании (Камчатка) // Вопросы рыболовства, том 5, № 2 (18). 2004. С. 362-374.

Рудакова С.Л. Влияние вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани на популяцию нерки *Oncorhynchus nerka* Walbaum (Salmoniformes, Salmonidae) озера Начикинского // Вопросы ихтиологии т. 50. № 3. 2010. С. 411-416.

Rudakova S.L., Kurath G., Bochkova E.V. Occurrence and Genetic Typing of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Kamchatka Russia. //J. Dis. Aquat. Org. Vol.75. 2007. P. 1-11.

### **PHYLOGENETIC HETEROGENITY OF IHNV ISOLATES FROM WATERSHED OF BOLSHAYA RIVER (КАМЧАТКА)**

S.L. Rudakova, G. Kurath\*, E.V. Bochkova

Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) is a rhabdovirus that causes an economically significant disease in salmonid fish all over the world. A virologic examination of the sockeye salmon populations from the watershed of the Bolshaya River (Kamchatka) has been carried out since 2000. Two salmon hatcheries (Malkinskii (MH) and Ozerki (OH)) are situated in this watershed, and both have had problems with IHN epizootics among sockeye fry. This watershed is a natural reservoir for IHNV but the virus isolates from different rivers have phylogenetic heterogeneity (Fig.1 Scheme of sampling places in watershed of Bolshaya River and results of typing of IHNV isolates). We compared phylogenetic diversity of IHNV isolates from infected fry and their parents and got interesting results. First we showed that the IHN epidemic in 2004 in OH was most likely the result of transmission of virus from parents to progeny because sequences of IHNV isolates from them were identical. Another situation was observed in MH where the sequences of IHNV isolates from parents and progeny were different. We can

suppose that the source of the virus was supply water, but sequences of IHNV isolate from infected fry were unique and we did not find the same virus type in wild adult sockeye from this watershed despite a large quantity of samples. Two natural IHNV outbreaks occurred in sockeye fry in Lake Nachikinskoe in 2003 and 2006. The typing of IHNV isolates from the Lake showed that isolates from infected fry and adult sockeye caught in the same area in same year were identical. This suggests a hypothesis that the outbreaks were result of transmission from adult fish IHNV-carriers to fry (progeny from previous generation of adult sockeye). Another interesting result was the heterogeneity found within and among individual isolates from wild sockeye in Lake Nachikinskoe. Genetic typing shown that IHNV isolates from Kamchatka and North America are identical or very similar and all are in the U genogroup. This work is previous results of Russia-USA collaborative work and will be continue to understand regional and intercontinental epidemiology and evolution of IHNV.

## **ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ПАТОЛОГИИ РЫБ**

И.И. Руднева

*Институт морских биологических исследований  
им. А.О. Ковалевского, Севастополь, пр. Нахимова, 2, Россия,  
E-mail: [svg-41@mail.ru](mailto:svg-41@mail.ru)*

Исследование патологий рыб, механизмов их возникновения и развития, а также защитных реакций имеет важное эволюционное значение, так как позволяет проследить причины заболеваний, их проявление у разных таксономических групп и запуск процессов, обеспечивающих восстановление и поддержание гомеостаза. Развитие патологических состояний часто связывают с биологической функцией эндоэкологии, которая в физиологических условиях способствует поддержанию нормальной межклеточной среды. При этом одной из реакций, обеспечивающей реализацию биологической функции эндоэкологии, является активация окисления белков активными формами кислорода (АФК) и их денатурация, в которой принимают участие циркулирующие нейтрофилы в физико-химической реакции «респираторного взрыва», секретирующих в межклеточную среду активные формы кислорода (Титов, 2012). В связи с этим очевидно, что многие патологические состояния организма сопровождаются развитием окислительного стресса, в результате которого происходит сдвиг соотношения окислительных и антиокислительных процессов и накопление в

тканях избыточного содержания свободных радикалов и поврежденных ими биомолекул. Нарушение этого физиологического баланса приобретает существенное значение для рыб, которые также подвержены различным заболеваниям. Выявление и анализ маркеров окислительного стресса, сопровождающего различные патологии рыб, важно как для диких популяций, так и для организмов, выращиваемых в искусственных условиях аквакультуры, так как ухудшение состояния организма увеличивает смертность, сокращает производство рыбной продукции или делает ее непригодной к употреблению (Martinez-Alvarez et al., 2005; Quioga et al., 2006). В связи с этим исследование ответных реакций гидробионтов на действие различных патогенов важно для составления прогноза статуса популяций рыб, оценки вреда, нанесенного организму, особенно в условиях аквакультуры.

Процессы возникновения и развития окислительного стресса у водных организмов достаточно полно изучены при действии химического загрязнения среды обитания, но информация о влиянии патологических состояний весьма ограничена. Важнейшим органом детоксикации патогенов, попадающих в организм, является печень, и ее патологические поражения коррелируют с развитием окислительного стресса в организме. Об этом свидетельствуют исследования, проведенные на эндемичном виде карпа *Chalcaburnus tarichi* из озера Ван (Турция): у рыб с поражениями печени различной этиологии содержание ТБК-реактивных продуктов и активность каталазы (КАТ) было существенно выше по сравнению с здоровыми особями (Kaptaner et al., 2014).

Наиболее полно изучены отклики антиоксидантной системы рыб, *зараженных паразитами*. Но и в этом случае число работ, посвященных изучению влияния паразитов на антиоксидантную систему рыб, крайне ограничено. В них рассматриваются разные типы откликов антиоксидантных ферментов и/или содержания антиоксидантов у инвазированных рыб, но сведения весьма противоречивы. Заражение трематодой *Clinostomum detrunctum* не вызывало сколько либо значительной индукции СОД и каталазы в мышцах серебряного карася, но перекисное окисление

в тканях резко возрастало. Это свидетельствовало о том, что инвазия стимулировала развитие окислительного стресса у рыб и повреждение мембран мышечных клеток (Bello et al., 2000). Инфицирование карпа цестодой *Ptychobothrium sp.* привело к значительному увеличению активности антиоксидантных ферментов в печени и в головной почке (Dautremepuits et al., 2003). В жабрах золотой рыбки, зараженной моногенеей *Dactylogyrus spp.*, отмечено возрастание содержания ТБК-реактивных продуктов, но снижение концентрации свободных SH-групп, способных связывать пероксиды, что свидетельствовало не только о наличии повышенного уровня свободных радикалов, но и о воспалительных процессах в тканях (Mozhdeganloo, Heidarpour, 2013).

Исследования активности антиоксидантных ферментов в мышечной ткани черноморского шпрота, инвазированного личинками нематоды *Hysterothylacium aduncum* показали, что активность каталазы была достоверно снижена у зараженных рыб по сравнению со здоровыми. При этом минимальные значения активности фермента установлены у особей, содержащих наибольшее количество паразитов. Активность пероксидазы достоверно падала с увеличением степени инвазии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при высокой зараженности личинками нематод происходит ингибирование активности ферментов защитной антиоксидантной системы, что еще раз подтверждает подавляющее влияние паразитов на защитные молекулярные системы хозяина (Скуратовская, Завьялов, 2006).

Сходные результаты были получены при исследовании лещей, пораженных *L. intestinalis*. У них значительно увеличились показатели ПОЛ в сыворотке крови и в печени (на 50-90% и на 43-92% соответственно) по сравнению с интактными рыбами. Общая антиоксидантная активность снижалась, но в меньшей степени, чем ПОЛ (на 12-22% и 9-17% соответственно). Отмеченные эффекты были выражены в большей степени у рыб, инвазированных более крупными червями (Микряков, Силкина, 2006). Предполагают, что усиление негативного воздействия паразита в этом случае связано с усилением его стрессирующего

влияния на хозяина и подавлением его защитных систем, включая антиоксидантную.

Однако, при исследовании активности антиоксидантных ферментов крови мерланга, пораженного нематодой *H. aduncum*, были выявлены иные закономерности. Активность каталазы и супероксиддисмутазы оказалась в 1,5 раза выше у зараженных особей. Для пероксидазы и глутатионредуктазы достоверных отличий в эритроцитах крови не установлено, тогда как активность глутатионтрансферазы у инвазированных рыб более, чем в 4 раза превосходила этот показатель у здоровых особей ( $p < 0,01$ ) (Скуратовская, Завьялов, 2008). Совершенно очевидно, что приведенные данные свидетельствуют о влиянии степени инвазии на отклики антиоксидантной системы рыб, которая обладает выраженной тканевой специфичностью. Данный вывод подтверждают наши исследования, проведенные при изучении паразитарной системы цестода *Botriocephalus gregarius* – черноморская камбала-калкан *Psetta maxima maeotica* (Руднева и др., 2004), которые показали, что активность большинства антиоксидантных ферментов существенно возростала в печени и мышцах зараженных рыб по сравнению с показателями незараженных. При этом отклик антиоксидантной системы в печени был выражен в большей степени, чем в мышцах и зависел от количества паразитов в рыбе ( $r > 0,6$ ). Вместе с тем, существует мнение, что антиоксидантная активность тканей хозяина может быть модифицирована в период жизненного цикла паразита в зависимости от его стадии развития (Buchmann, Lindenstrom, 2002).

В последнее время исследователи стараются использовать обобщенные характеристики (показатели) состояния организма, подвергающегося различным неблагоприятным воздействиям. С этой целью предлагаются различные интегральные величины, характеризующие общие тенденции изменения биохимического статуса живых систем. Интегральный показатель ферментной антиоксидантной активности (ИП ФАОА) оказался значительно выше у зараженных рыб по сравнению с незараженными, что позволило доказать влияние паразитарной инвазии на состояние ферментной антиоксидантной системы крови мерланга. Это

выразилось в повышении активности ключевых антиоксидантных ферментов и ИП ФАОА крови зараженных рыб. Совершенно очевидно, что внедрение паразита в стенки органов пищеварения, выделение метаболитов в организм хозяина, а также привносимая с ним инфекция усиливают процессы свободнорадикального окисления и являются мощными факторами, стимулирующими активность антиоксидантных ферментов (Скуратовская, Завьялов, 2008).

Другой важнейший аспект проблемы заключается в том, что у рыб, обитающих в загрязненной среде, усиливается риск заражения паразитами в комплексе с аккумуляцией химических загрязнителей в тканях. Так, накопление селена в тканях радужной форели, инвазированной нематодой *Raphidascaris acus*, происходило медленнее, чем у здоровых рыб, а активность антиоксидантных ферментов глутатионтрансферазы и супероксиддисмутазы в мышцах зараженных рыб, получающих селен с кормом, было существенно ниже, чем у незараженных рыб, в рацион которых также был добавлен селен (Hursky, Pietrock, 2015). Авторы пришли к выводу, что паразиты способны аккумулировать токсиканты и снижать их негативное действие на рыб.

Многие АФК – продукты окислительного стресса, образуются в иммунных клетках хозяина: в макрофагах, нейтрофилах и эозинофилах. Они локализуются на поверхностной кутикуле паразита и секретируют во внешнюю среду АФК, где радикалы повреждают клетки, подвергнутые воспалению при внедрении паразитов. При этом паразиты выделяют секреты, содержащие антиоксидантные ферменты с целью снижения токсичных эффектов АФК. Так, кишечный паразит нематода *Necator americanus* секретирует в межклеточное пространство супероксиддисмутазу, но не каталазу. В результате осуществляемой ферментом реакции дисмутации образуется активная перекись водорода, которая в отсутствии каталазы не разлагается и является высокотоксичным агентом для иммунных клеток хозяина (Chiumiento, Bruschi, 2009). Многие гельминты вызывают аллергические реакции у хозяина и его аутоиммунные отклики (McKay, 2006).



Таким образом, исследование откликов антиоксидантной системы организма, инвазированного паразитами, позволяет понять механизмы взаимодействия хозяина и паразита на молекулярном уровне в процессе их коэволюции. При этом иммунная и антиоксидантная системы хозяев и паразитов являются не только барьером, но и фундаментальным фактором реализации паразито-хозяинных отношений. Множественное проявление и неоднозначные реакции хозяина на внедрение паразита заслуживают самого пристального внимания и активного изучения, что может способствовать созданию новых антипаразитарных иммунотерапевтических средств или вакцин.

Инфекционные заболевания особенно опасны для рыб, выращиваемых в условиях аквакультуры, когда высокая плотность организмов создает дополнительный гормональный стресс. Более того, в некоторых случаях даже бактерии, не относящиеся к патогенным, но присутствующие в среде в больших количествах, могут быть опасны для рыб и вызывать у них окислительный стресс. Так, например, было показано, что бактерии *Escherichia coli* и *Vibrio fischeri*, выделенные из среды культивирования африканского сома *Clarias gariepinus* и инокулированные рыбам через ротовое отверстие, привели к существенному увеличению содержания ТБК-реактивных продуктов, окисленных форм белков и активности глутатионтрансферазы в печени, мышцах и жабрах, причем отклик был выражен в большей степени в печени, чем в остальных тканях (Adeyemi, 2014). Однако, интенсивность окислительного стресса не зависела от вида инфицирующего агента, что свидетельствует о неспецифическом отклике организма на бактериальную инфекцию. Заражение африканского сома патогенным микробом *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающим кровоизлияния во внутренних органах рыб в результате разрушения сосудистых стенок, приводит к 40%-ной гибели заболевших особей (Magdy et al., 2014). Одновременно было отмечено существенное возрастание ТБК-реактивных продуктов и NO в тканях зараженных рыб, что свидетельствует о развитии у них окислительного стресса.

Не меньшую опасность для здоровья рыб, выращиваемых в искусственных условиях, представляют грибковые поражения, которые также сопровождаются развитием окислительного стресса. У нильской тиляпии и африканского сома, зараженных спорами оомицетов *Aphanomyces laevis* и *Phoma herbarum*, образующих наросты на коже и повреждающих плавники и чешую, отмечали существенное увеличение содержания в жабрах перекисей, ТБК-реактивных соединений и окислов азота (Ali et al., 2011). Одновременно происходило сокращение уровня антиоксидантов – витамина Е и глутатиона, а также снижение активности каталазы и супероксиддисмутазы. При этом на фоне одинаковой реакции рыб на действие обоих видов оомицетов, в случае заражения *A. laevis* наблюдали более интенсивное сокращение содержания антиоксидантов в тканях.

В настоящее время особое внимание уделяется патогенным микроводорослям, развивающимся в эвфтрофированных акваториях, которые способны существенно ухудшить состояние рыб (Sirakov et al., 2015). Накопление их токсинов (микоцистин) в тканях рыб также провоцирует развитие окислительного стресса, который усугубляется сокращением в среде содержания кислорода и образованием гипоксических зон.

Таким образом, изменение условий среды обитания, сопровождающихся повышенным уровнем химического и микробиологического загрязнения, приводит к сдвигу прооксидантно-антиоксидантного баланса в организме рыб, предшествующего развитию различных патологий, значительно сокращающего продолжительность жизни и ухудшающего состояние диких популяций рыб и выращиваемую на фермах продукцию. Для оценки резистентности рыб к различным патологиям в дальнейшем следует получить больше информации об откликах биомаркеров антиоксидантной системы, которые могут служить в качестве ранних предвестников неблагоприятных тенденций, происходящих в организме рыб.

Список литературы

Микряков В.Р., Силкина Н.И. Характеристика показателей перекисного окисления липидов в системе паразит-хозяин на примере *Ligula intestinalis* (Cestoda, Pseudophyllidae) – *Abramis brama* (L.) // Биология внутренних вод. 2006. Т. 4. С. 63-66.

Руднева И.И., Солонченко А.И., Мельникова Е.Б. Влияние паразитарной инвазии на активность некоторых антиоксидатных ферментов печени и мышц хозяина черноморского калкана *Psetta maxima maeotica* // Паразитология. 2004. Т. 38, № 6. С. 557-561.

Скуратовская Е.Н., Завьялов А.В. Влияние паразитарной инвазии на активность некоторых антиоксидантных ферментов тканей черноморского шпрота (*Sprattus sprattus phalericus* R.) // Рыбное хозяйство Украины. 2006. Т. 46, 47 (5-6). С. 54-55.

Скуратовская Е.Н., Завьялов А.В. Влияние паразитарной инвазии на состояние антиоксидантной ферментной системы крови мерланга (*Merlangus merlangus euxinus*) // Ветеринарная медицина. 2008. № 90. С. 394-398.

Титов В.Н. Филогенетическая теория становления болезни, теория патологии, патогенез «метаболических пандемий» и роль клинической биохимии // Клиническая лабораторная диагностика. 2012. № 10. С. 5-13.

Adeyemi, J.A. Oxidative stress and antioxidant enzymes activities in the African catfish, *Clarias gariepinus*, experimentally challenged with *Escherichia coli* and *Vibrio fischeri* // Fish Physiology and Biochemistry 2014. V. 40, Is. 2. P. 347-354.

Ali E.H., Hashem M., Al-Salahy M.B. Pathogenicity and oxidative stress in Nile tilapia caused by *Aphanomyces laevis* and *Phoma herbarum* isolated from farmed fish // Diseases of Aquatic Organisms. 2011. V. 94, Is. 1. P. 17-28.

Bello A. R. R., Fortes E., Bello-Klein A., Bello A. A., Lesuy S. F., Robaldo R. B. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen* // Dis. Aquat. Org. 2000. V. 42. P. 233-236.

Buchmann K., Lindenstrom T. Interaction between monogenean parasites and their fish hosts // Int. J. Parasitol. 2002. V. 32. P. 309-319.

Chiumiento L., & Bruschi F. Enzymatic antioxidant system in helminth parasites // Parasitol. Res. 2009. V. 105, № 3. P. 593-603.

Dautremepuits C., Betoulle S., Vernet G. Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio*) infected by *Ptychobothrium sp.* (Cestoda) // Fish. Shellfish Immunol. 2003. V. 15. P. 467-471.

Hursky O., Pietrock M. Intestinal nematodes affect selenium bioaccumulation, oxidative stress biomarkers, and health parameters in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Environmental Science and Technology. 2015. V. 49, Is. 4. P. 2469-2476.

Kaptaner B., Kankaya E., Doğan A., Çelik I. Histopathology and oxidative stress in the liver of *Chalcalburnus tarichi* living in Lake Van, Turkey. // Life Science Journal. 2014. V. 11, Is. 8, P. 66-77.

Martinez-Alvarez R. M., Morales A. E., Sanz A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors // Reviews in Fish Biology and fisheries. 2005. V. 15. P. 75-88.

Magdy I.H., El-Hady M.A., Ahmed H.A., Elmeadawy S.A., Kenwy A.M. A contribution on *Pseudomonas aeruginosa* infection in African catfish (*Clarias gariepinus*). // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 2014. V. 5, Is. 5. P. 575-588.

McKay D. M. The beneficial helminth parasite? // *Parasitology*. 2006. V.132. P. 1-12.

Mozhdeganloo Z., Heidarpour M. Oxidative stress in the gill tissues of goldfishes (*Carassius auratus*) parasitized by *Dactylogyrus spp* // *Journal of Parasitic Diseases*. 2014. V. 38, Issue 3. P. 269-272.

Quioga M.I., Redondo J., Sitja-Babadilla A., Palenzuela O., Rianza A., Macias A., Vazquez S., Perez A., Nieto M., Alvarez-Pellitero P. Risk factors associated with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) infection in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* // *Parasitology*. 2006. V. 132. P. 433-442.

Sirakov I., Velichkova K., Stoyanova S., Staykov Y. The importance of micro algae for aquaculture industry. Review // *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 2015. V. 2, № 4. P. 31-37.

## **OXIDATIVE STRESS AND FISH PATHOLOGIES**

I.I. Rudneva

Oxidative stress is associated with various pathologies and negative environmental or anthropogenic impacts. Increase of ROS generation and imbalance of prooxidant/antioxidant status in aquatic organisms are the consequences of chemical pollution or (and) the different infections and parasitic invasion. The role of oxidative stress, led different pathological agents and antioxidant defense system in fish health and their adaptation to unfavorable environmental conditions are discussed.

# СЕКЦИЯ I. ПРОБЛЕМЫ ОБЩЕЙ И ЧАСТНОЙ ИММУНОЛОГИИ

## EFFECT OF VACCINATION AGAINST FURUNCULOSIS ON LEVEL OF OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN MUSCLE TISSUE OF RAINBOW TROUT *ONCORHYNCHUS MYKISS*

Halyna Tkachenko<sup>1</sup>, Joanna Grudniewska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Department of Zoology and Animal Physiology,*

*Institute of Biology and Environmental Protection, Pomeranian*

*University, Slupsk, Poland, e-mail: [tkachenko@apsl.edu.pl](mailto:tkachenko@apsl.edu.pl)*

<sup>2</sup> *Department of Salmonid Research, Inland Fisheries Institute, 83-330*

*Żukowo, Poland, e-mail: [jgrudniewska@infish.com.pl](mailto:jgrudniewska@infish.com.pl)*

Throughout the development of modern aquaculture, furunculosis caused by infection with the bacterial pathogen *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*, has posed a major threat to the production of salmonid fish (Swain et al., 2010; Villumsen and Raida, 2013). For decades immunoprophylactic tools against *Aeromonas* spp. have been a focus of international research in fish immunology and vaccinology, resulting in the development of both oral, immersion and injectable vaccine strategies over time (Romstad et al., 2012; Villumsen and Raida, 2013). Vaccination of fish is the most promising concept to control diseases (Swain et al., 2010). Vaccination is the main preventive measure against furunculosis in salmonids in Europe and North America. The emergence of furunculosis vaccines has cut down the use of antibiotics in farming of salmonids dramatically (Gudmundsdóttir and Björnsdóttir, 2007).

Different kinds of vaccines have been investigated against *A. hydrophila* including whole cell, outer membrane proteins, extra-cellular proteins, lipopolysaccharides (LPS), biofilms and live aero A mutant attenuated vaccines (Swain et al., 2010). While each medicine probably are effective in the treatment of a particular disease, problems arise with the development of possible pathological side effects of immunization in fishes, as well as the emergence of antibiotic resistant

pathogenic strains. Immunization with vaccines may lead in a strong local reaction and side effects, such as granuloma formations and pigmentation, sometimes leading to reduced growth of vaccinated fish and may also be regarded as an animal welfare problem (Gudmundsdóttir and Björnsdóttir, 2007).

Despite the importance and success of vaccination, little is known about the mechanisms of oxidative stress and antioxidant defense in fish during vaccination. In the present study, we determined the influence of vaccination against furunculosis on level of oxidative stress biomarkers (lipid peroxidation and oxidatively modified protein levels, activities of the antioxidant enzymes – superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, total antioxidant capacity) in muscle tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum).

Experimental animals. Clinically healthy rainbow trout with a mean body mass of (135.5±1.5) g were used in the experiments. The study was carried out in a Department of Salmonid Research, Inland Fisheries Institute near the village of Żukowo (Poland). Experiments were performed at a water temperature of 14.5±0.5°C and the pH was 7.5. The dissolved oxygen level was about 12 ppm with additional oxygen supply with a water flow of 25 L/min, and a photoperiod of 7 hours per day. The fish were fed with commercial pelleted diet. All enzymatic assays were carried out at Department of Zoology and Animal Physiology, Institute of Biology and Environmental Protection, Pomeranian University (Słupsk, Poland).

Experimental design. The fish were divided into two groups and held in 250-L square tanks (70 fish per tank) supplied with the same water as during the acclimation period (2 days). Fish were vaccinated and grouped as follows: I) unhandled controls, II) vaccinated by vaccine against furunculosis. The vaccine against furunculosis is a vaccine containing an inactivated strain of *A. salmonicida* and *A. hydrofila* in concentration  $1 \times 10^{10}$  colony forming units (CFU). The vaccine was produced in Department of Epizootology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury (Olsztyn, Poland). Immersion solution contained 1 liter of vaccine per 10 liters of water. It was prepared immediately prior to vaccination. Immersion lasted

from 60 to 120 seconds. The fish were kept for 30 days at 14.5°C after vaccination at a water temperature of 14.5±0.5°C and the pH 7.5.

**Sampling.** The animals were quickly captured and killed on 31 days post vaccination (n=15 in each group). Muscle tissue was removed *in situ*. Tissue samples were homogenized in ice-cold buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.2) using a glass homogenizer immersed in an ice water bath to a yield a 10% homogenate. Homogenates were centrifuged at 3,000g for 15 min at 4°C. After centrifugation, the supernatant was collected and frozen at -20 °C until analyzed. Protein contents were determined using the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin as a standard. Absorbance was recorded at 595 nm.

**Oxidative stress biomarkers assays.** An aliquot of the homogenate was used to determine the lipid peroxidation status of the sample by measuring the concentration of 2-thiobarbituric-acid-reacting substances (TBARS), according to the method of Kamyshnikov (2004). TBARS values were reported as nmol malondialdehyde (MDA) per mg protein. Carbonyl groups of oxidatively modified proteins were measured as an indication of oxidative damage to proteins according to the method of Levine et al. (1990) in modification of Dubinina et al. (1995). The carbonyl content could be measured spectrophotometrically at 370 nm (aldehydic derivatives, OMP<sub>370</sub>) and at 430 nm (ketonic derivatives, OMP<sub>430</sub>) (molar extinction coefficient 22,000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>) and expressed as nmol per mg protein. Superoxide dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) activity was measured with the method by Kostiuk et al. (1990). Activity is expressed in units of SOD per mg of tissue protein. Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) activity was determined by measuring the decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the reaction mixture using a spectrophotometer at the wavelength of 410 nm by the method of Koroliuk et al. (1988). One unit of catalase activity is defined as the amount of enzyme required for decomposition of 1 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per min per mg of protein. Glutathione reductase (GR, E.C. 1.6.4.2) activity in homogenate was measured according to the method described by Glatzle et al. (1974). GR activity was expressed as μmol NADPH per min per mg tissue protein. Glutathione peroxidase (GPx, E.C. 1.11.1.9) activity in homogenate was measured spectrophotometrically as described by

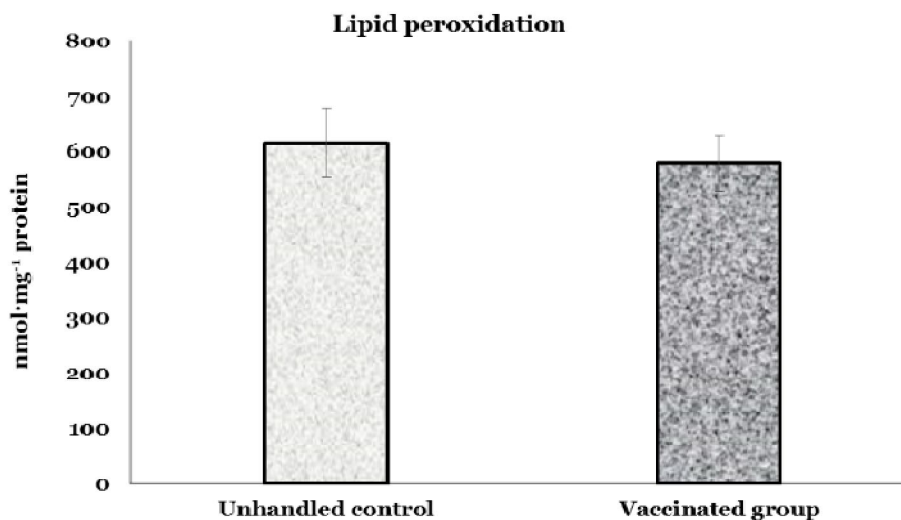
Moin (1986). GPx activity is expressed as  $\mu\text{mol GSH per min per mg}$  tissue protein. The total antioxidant capacity (TAC) level was estimated spectrophotometrically at 532 nm following the method with Tween 80 oxidation (Galaktionova et al., 1998). TAC was expressed in %.

Statistical analysis. Data were presented as the mean  $\pm$  S.E.M. and were checked for assumptions of normality using the Kolmogorov–Smirnov one-sample test and Lilliefors tests ( $p > 0.05$ ). Homogeneity of variance was checked using the Levene test. Significance of differences between oxidative stress biomarkers was examined using Mann-Whitney  $U$  test according to Zar (1999). In addition, the relationships between oxidative stress biomarkers of all individuals were evaluated using Spearman's correlation analysis. All statistical analysis was performed by STATISTICA 10.0 software (StatSoft, Poland).

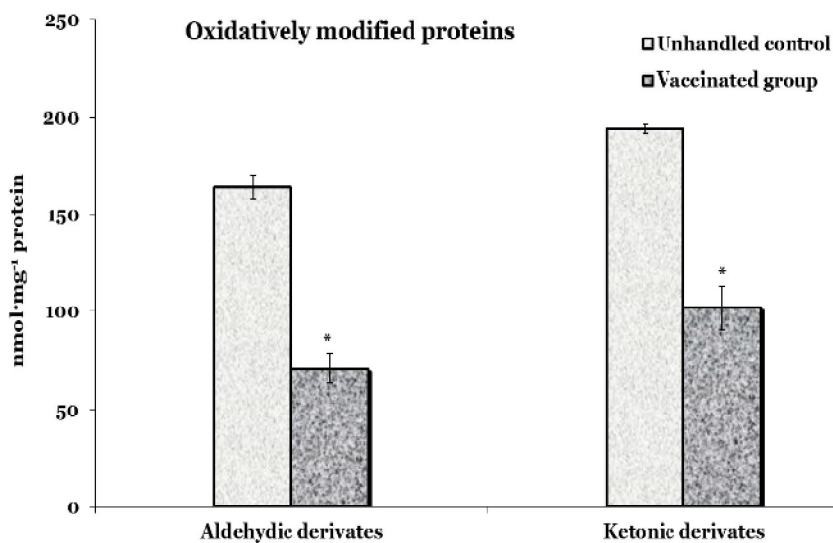
The levels of oxidative stress markers are an important indicator of the physiological state of the fish immunized by vaccine against *Aeromonas* spp. Among different markers of oxidative stress, 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) level, content of oxidative protein damage, and the natural antioxidants, metalloenzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and selenium dependent glutathione peroxidase (GPx), are currently considered to be the most important markers (Rahal et al., 2014). Malondialdehyde (MDA) is a three-carbon compound formed from peroxidized polyunsaturated fatty acids, mainly arachidonic acid. It is one of the end products of membrane lipid peroxidation. Since MDA levels are increased in various diseases with excess of reactive oxygen species (ROS), many relationships with free radical damage were observed (Rahal et al., 2014).

Vaccination caused a non-significant decrease of the TBARS level in the muscle tissue (by 5.9%,  $p > 0.05$ ) (Fig. 1A). Aldehydic and ketonic derivatives of protein damage in the muscle tissue of trout vaccinated against *Aeromonas* spp. were significantly reduced (by 57%,  $p = 0.000$  and by 47%,  $p = 0.000$ , respectively) compared to the levels in the control (Fig. 1B).





A



B

Fig. 1. The level of lipid peroxidation (nmol TBARS per mg protein), aldehydic and ketonic derivatives of oxidatively modified proteins in the muscle tissue of the trout vaccinated against *Aeromonas* spp. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M.

\* – the significant difference was shown as  $p < 0.05$  when compared vaccinated group and unhandled group values.

The enzymes CAT and SOD are the major defenses against ROS. SOD converts superoxide anions into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and CAT converts H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to molecular oxygen and water (Gemma et al., 2007). SOD exists in two forms: Cu,Zn-SOD is present primarily in the cytoplasm while Mn-SOD is present primarily in the mitochondria. Cu,Zn-SOD is an intracellular enzyme present in all oxygen-metabolizing cells, which dismutates the extremely toxic superoxide radical into potentially less toxic hydrogen peroxide. GPx, an intracellular enzyme, belongs to several proteins in cells that can metabolize H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and lipid hydroperoxides (Rahal et al., 2014).

SOD activity was significantly increased in vaccinated fish (by 3.5-fold, p=0.000). CAT, GR, and GPx activities in the muscle tissue were significantly inhibited in vaccinated fish (by 34%, p=0.033, by 6.5%, p=0.021, and by 62.5%, p=0.000, respectively) compared to control fish (Table 1). The TAC was also significantly decreased compared to those in the control (by 43%, p=0.002) (Table 1).

Table 1. Enzymatic antioxidant defenses in the muscle tissue of the rainbow trout vaccinated against furunculosis (M±m).

Antioxidant defense	Unhandled control(n=15)	Vaccinated group(n=15)
SOD, U·mg <sup>-1</sup> protein	292.30±6.34	1036.75±138.11*
CAT, μmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> protein	29.46±5.24	19.50±5.51*
GR, μmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> protein	1.486±0.091	1.390±0.219*
GPx, μmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> protein	1134.92±173.18	425.48±57.67*
TAC, %	46.24±3.95	26.45±3.54*

\* – the significant difference was shown as p<0.05 when compared vaccinated group and unhandled group values.

Several correlations between checked parameters were found (Fig. 3). In vaccinated group, OMP<sub>370</sub> and OMP<sub>430</sub> level correlated with TBARS (r=0.696, p=0.004 and r=0.691, p=0.004, respectively) and SOD activity (r=0.600, p=0.018 and r=0.567, p=0.028, respectively) (Fig. 3).

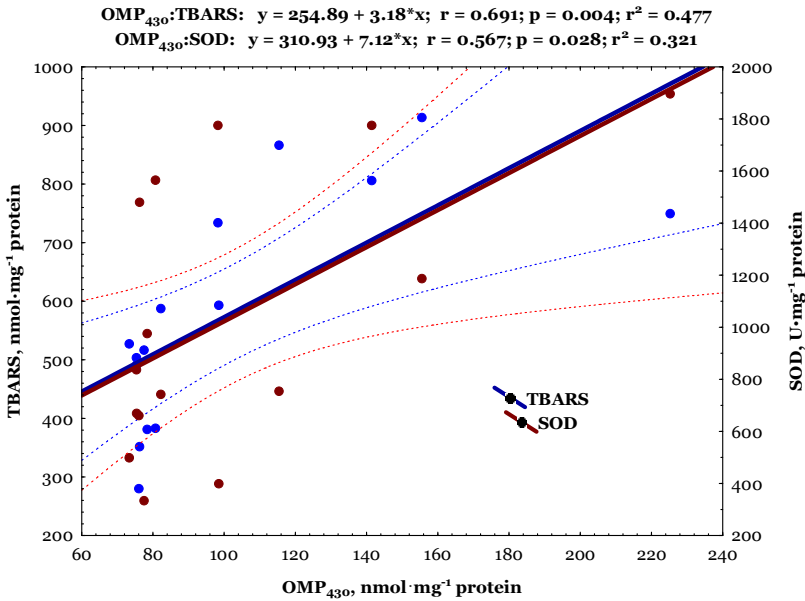
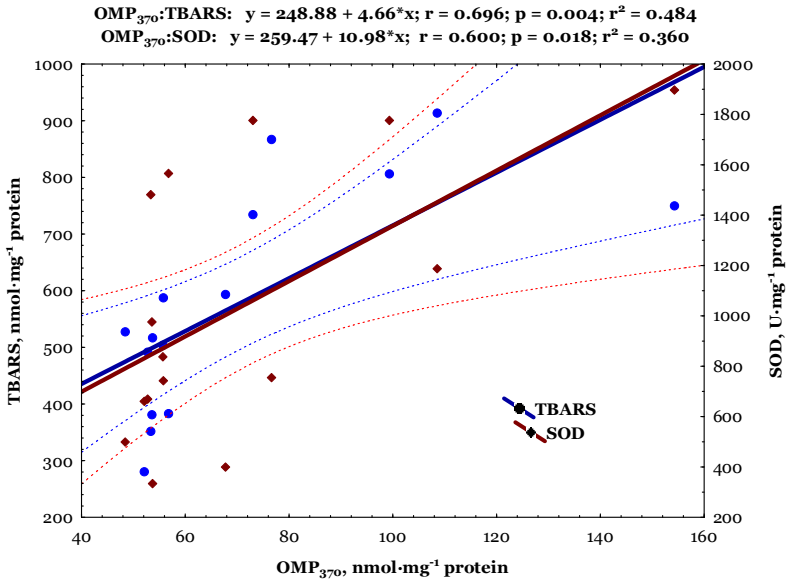


Fig. 3. Correlations between aldehydic and ketonic derivatives of OMP and SOD activity in the muscle tissue of rainbow trout vaccinated against furunculosis.

The study shows a post-treatment changes in oxidative stress profile in muscle tissue of rainbow trout treated by vaccine against furunculosis. Interestingly, the vaccination against furunculosis caused decrease of oxidative modification of protein in muscle tissue of vaccinated fish as compared with the control group. Decrease of protein damage markers results to inhibition of CAT GR, and GPx activity, as well as TAC level (Table 1, Fig. 1). The increase in the SOD activity observed in the muscle tissue could be due to the production of superoxide radicals during vaccination.

It well known that phagocytic cells, i.e. neutrophils, monocytes and macrophages, generate ROS during the respiratory burst by membrane-bound NADPH oxidase and play an important role in defense against microorganisms and various exogenous compounds (Pietarinen-Runtti et al., 2000). Therefore, increased SOD activity in muscle tissue of fish vaccinated against furunculosis could be also induced by respiratory burst through activation of phagocytic cells. On other hand, the GPx, GR and CAT activities were significantly decreased in the muscle tissue of vaccinated fish (Table 1). The significant increase of SOD activity in the muscle of vaccinated fish may indicate about decrease of oxidative stress biomarkers level and demonstrate the extent of prior antioxidant defense during vaccination against furunculosis. These results suggest that SOD play a pivotal role in intracellular antioxidant defense against vaccinate-induced lipid and protein oxidation in muscle (Fig. 3). Antioxidant defense reduces the effects of vaccinate-induced oxidative stress in the muscle tissue. Impairment in the synthesis of enzymatic and nonenzymatic antioxidant of vaccinated fish may be the most important factor in reducing level of total antioxidant capacity (Table 1).

In conclusion, oxidative stress biomarkers analyses revealed significant differences between vaccinated fish against furunculosis. Muscle of vaccinated trout had a lower levels of aldehydic and ketonic derivates of oxidatively modified protein, while catalase and glutathione-mediated antioxidant defense system became more susceptible to oxidative damage induced by vaccination. The total antioxidant capacity was decreased in vaccinated trout. Correlations between aldehydic and ketonic derivates of protein damage and SOD activity confirm the assumption that generation of carbonyl derivates

of oxidatively modified protein and lipid peroxidation biomarker could inhibit by the prior antioxidant defense activation.

*This study was funded by the Departmental Grant for Young Scientists of Pomeranian University in Slupsk.*

#### References

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A., Porotov I.G. 1995. Oxidative modification of human serum proteins. A method of determining it. *Vopr. Med. Khim.*, 41: 24-26 (In Russian).

Galaktionova L.P., Molchanov A.V., Elchaninova S.A., Varshavskiy B.Ya. 1998. The lipid peroxidation processes in patients with ulcerous illness of stomach and duodenum. *Clin. Lab. Diagnostics*, (6): 10-14 (In Russian).

Gemma C., Vila J., Bachstetter A., Bickford P.C. 2007. Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention. In: Riddle D.R., ed. *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*. Boca Raton (FL): CRC Press. Chapter 15.

Glatzle D., Vuilleumier J.P., Weber F., Decker K. 1974. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in human. *Experientia*, 30: 665-667.

Gudmundsdóttir B.K., Björnsdóttir B. 2007. Vaccination against atypical furunculosis and winter ulcer disease of fish. *Vaccine*, 25: 5512-5523.

Kamyshnikov V.S. 2004. Reference book on clinic and biochemical researches and laboratory diagnostics, MEDpress-inform, Moscow (In Russian).

Koroliuk M.A., Ivanova L.I., Majorova I.G., Tokarev V.E. 1988. A method of determining catalase activity. *Lab. Delo*, (1): 16-19 (In Russian).

Kostiu, V.A., Potapovich A.I., Kovaleva Zh.V. 1990. A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation. *Vopr. Med. Khim.*, 36 (2): 88-91. (In Russian).

Levine R. L., Garland D., Oliver C. N., Amici A., Climent I., Lenz A.-G., Ahn B.-W., Shaltiel S., Stadtman E. R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, 186: 465-478.

Moin V.M. 1986. A simple and specific method for determining glutathione peroxidase activity in erythrocytes. *Lab. Delo*, (12): 724-727 (In Russian).

Pietarinen-Runtti P., Lakari E., Raivio K.O., Kinnula V.L. 2000. Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 278(1): C118-125.

Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., Dhama K. 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 761264. doi: 10.1155/2014/761264.

Romstad A.B., Reitan L.J., Midtlyng P., Gravningen K., Evensen Ø. 2012. Development of an antibody ELISA for potency testing of furunculosis (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) vaccines in Atlantic salmon (*Salmosalar* L). *Biologicals*, 40(1): 67-71.

Swain P., Behera T., Mohopatra D., Nayak S.K., Meher P.K., Das B.K. 2010. Derivation of rough attenuated variants from smooth virulent *Aeromonas hydrophila* and their immunogenicity in fish. *Vaccine*, 28: 4626-4631.

Villumsen K.R., Raida M.K. 2013. Long-lasting protection induced by bath vaccination against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(5): 1649-1653.

Zar J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4<sup>th</sup> ed., Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

## **OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN THE LIVER OF RAINBOW TROUT *ONCORHYNCHUS MYKISS* AFTER VACCINATION AGAINST *YERSINIA RUCKERI***

Halyna Tkachenko<sup>1</sup>, Joanna Grudniewska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Department of Zoology and Animal Physiology,*

*Institute of Biology and Environmental Protection, Pomeranian*

*University, Slupsk, Poland, e-mail: [tkachenko@apsl.edu.pl](mailto:tkachenko@apsl.edu.pl)*

<sup>2</sup> *Department of Salmonid Research, Inland Fisheries Institute, 83-330*

*Żukowo, Poland, e-mail: [jgrudniewska@infish.com.pl](mailto:jgrudniewska@infish.com.pl)*

*Yersinia ruckeri*, a Gram-negative bacterium in the family *Enterobacteriaceae*, is the causative agent of Enteric Redmouth (ERM) disease or Yersiniosis, and causes acute or chronic infections in salmonids (Thompson and Adams, 2004). Infected fish and asymptomatic carriers are the main source of the infection, spreading bacteria with feces. Gills are regarded as the entry route of *Y. ruckeri* rods but the likelihood of the disease depends on the virulence of the given strain. Characteristic clinical signs of yersiniosis, such as hemorrhages around the oral cavity, are caused by extracellular products (ECPs) of *Y. ruckeri* (Pekala and Antychowicz, 2010).

Vaccination, or immunoprophylaxis, is based on the principle that when a foreign organism, such as a bacterium or virus, invades its host, the animal's immune response reacts against it in an attempt to remove it. If the fish is re-exposed to the same organism, the immune response is primed to respond against it. This is referred to as a memory response or adaptive immunity. Vaccination mimics the invasion of pathogens and primes the animals' immune system for re-encounter with the pathogen without causing disease (Thompson and Adams, 2004). Yersiniosis is successfully controlled with commercial

vaccines and in fact represents one of the first diseases to be controlled by vaccination. Most vaccines are bacterin preparations using whole cell preparations of serovar 1 (the Hagerman strain and the major cause of disease outbreaks). Bacteria are generally inactivated with formalin and sometimes pH lysed at pH 9.8 to expose internal cell components (Thompson and Adams, 2004). The success of the vaccine has been reported to be variable under field conditions, and often does not completely prevent disease outbreaks when the level of infection is high, as seen when fish are stressed (Horne and Barnes, 1999). Clearly, a greater understanding of the fish response against *Y. ruckeri* and during vaccination against Yersiniosis would help improve this situation.

Therefore, exploring the effects of vaccination against *Y. ruckeri* on health condition of trout in general, and oxidative stress biomarkers in different tissues specifically, would be valuable. The present study aims to clarify the effects of vaccination against *Y. ruckeri* on liver function, and the oxidative mechanism underlying those effects, by detecting relevant lipid peroxidation and protein oxidation biomarkers in trout immunized against *Y. ruckeri*.

**Experimental animals.** Clinically healthy rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) with a mean body mass of (107.9±3.1) g were used in the experiments. The study was carried out in a Department of Salmonid Research, Inland Fisheries Institute near the village of Żukowo (Poland). Experiments were performed at a water temperature of 14.5±0.5°C and the pH was 7.5. The dissolved oxygen level was about 12 ppm with additional oxygen supply with a water flow of 25 L/min, and a photoperiod of 7 hours per day. The fish were fed with commercial pelleted diet. All enzymatic assays were carried out at Department of Zoology and Animal Physiology, Institute of Biology and Environmental Protection, Pomeranian University (Słupsk, Poland).

**Experimental design.** The fish were divided into two groups: I) unhandled control, II) immunized by vaccine against *Y. ruckeri*. Fish were held in 250-l square tanks (70-75 fish per tank) with the same conditions. The vaccine against Yersiniosis is a vaccine containing an inactivated strain of *Y. ruckeri*. Vaccine contained three *Y. ruckeri* strains originated from rainbow trout cultured on the different farms,

where fish exhibiting clinical signs of Yersiniosis. The bacteria isolates belonged to O1 serotype and showed some differences in their biochemical properties. Concentrated vaccine was added to the fish food, and three times at intervals of one day was administered. One month after immunization the liver samples from rainbow trout were collected. The vaccine was produced in Department of Fish Diseases, National Veterinary Research Institute (Pulawy, Poland). The fish were kept for 30 and 60 days after vaccination at a water temperature  $14.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  and the pH 7.5.

**Sampling.** The animals were quickly captured and killed on 31 and 61 days post vaccination ( $n=15$  in each group). Liver was removed *in situ*. Tissue samples were homogenized in ice-cold buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.2) using a glass homogenizer immersed in an ice water bath to a yield a 10% homogenate. Homogenates were centrifuged at 3,000g for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . Protein contents were determined using the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin as a standard. Absorbance was recorded at 595 nm.

**Oxidative stress biomarkers assays.** An aliquot of the homogenate was used to determine the lipid peroxidation status of the sample by measuring the concentration of 2-thiobarbituric-acid-reacting substances (TBARS), according to the method of Kamyshnikov (2004). TBARS values were reported as nmol malondialdehyde (MDA) per mg protein. Carbonyl groups of oxidatively modified protein were measured as an indication of oxidative damage to proteins according to the method of Levine et al. (1990) in modification of Dubinina et al. (1995). The carbonyl content could be measured spectrophotometrically at 370 nm (aldehydic derivatives,  $\text{OMP}_{370}$ ) and at 430 nm (ketonic derivatives,  $\text{OMP}_{430}$ ) (molar extinction coefficient  $22,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) and expressed as nmol per mg protein. The total antioxidant capacity (TAC) level was estimated spectrophotometrically at 532 nm following the method with Tween 80 oxidation (Galaktionova et al., 1998). TAC level was expressed in %.

**Statistical analysis.** Data were presented as the mean  $\pm$  S.E.M. and were checked for assumptions of normality using the Kolmogorov–Smirnov one-sample test and Lilliefors tests ( $p > 0.05$ ). Homogeneity of variance was checked using the Levene test. Significance of differences between oxidative stress biomarkers was



examined using Mann-Whitney *U* test according to Zar (1999). In addition, the relationships between oxidative stress biomarkers of all individuals were evaluated using Spearman's correlation analysis. All statistical analysis was performed by STATISTICA 10.0 software (StatSoft, Poland).

The level of lipid peroxidation in the liver of trout treated by vaccine did not significantly differ from that in the controls (Fig. 1). TBARS level in the liver at second month in the both unhandled group and group vaccinated against *Y. ruckeri* were significantly reduced (by 67.3%,  $p=0.000$  and by 67.4%,  $p=0.000$ , respectively), compared to groups studied at first month after immunization (Fig. 1).

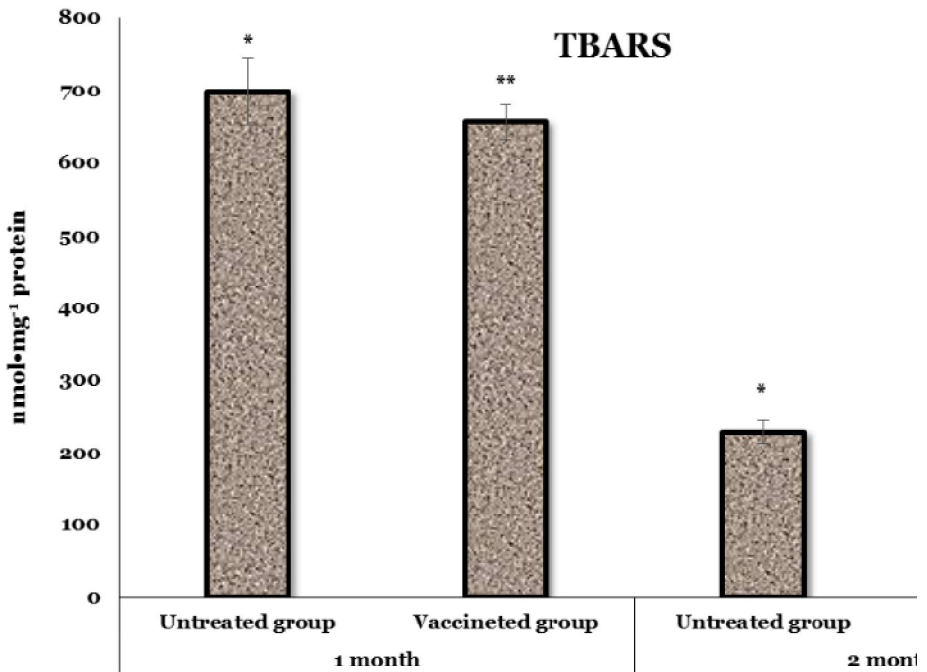
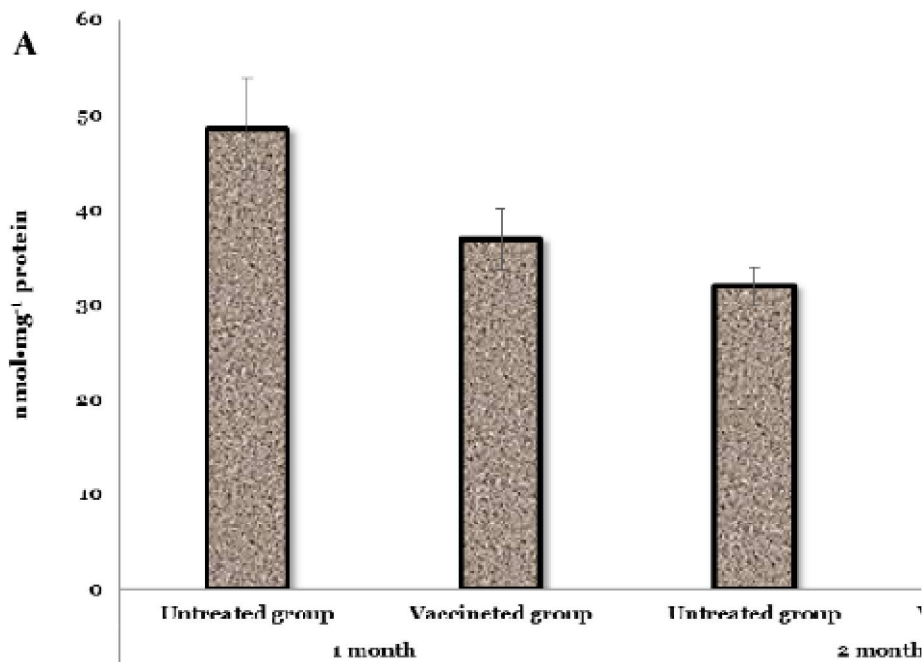


Fig. 1. The level of lipid peroxidation (nmol TBARS per mg protein) in the liver of the trout treated by vaccine against *Y. ruckeri* at first and second months after immunization. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M. (n=15).

\* – the significant difference was shown as  $p<0.05$  when compared unhandled group values at first and second months after immunization;

\*\* – the significant difference was shown as  $p<0.05$  when compared vaccinated group values at first and second months after immunization.

Because the generation of carbonyl derivatives occurs by many different mechanisms, the level of carbonyl groups in proteins is widely used as a marker of oxidative protein damage (Stadtman and Levine, 2000). Vaccination caused a significant decrease the ketonic derivates level in the liver at first month by 35% ( $p=0.000$ ) compared to control (Fig. 2B).



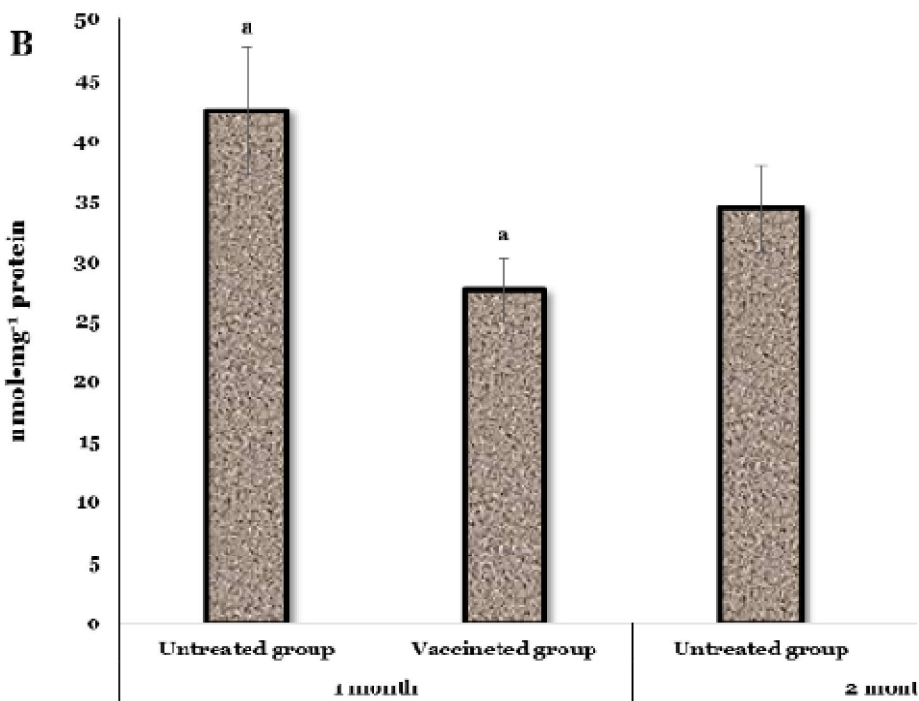


Fig. 2. Aldehydic (A) and ketonic derivatives (B) of oxidatively modified proteins in the liver of the trout vaccinated against *Y. ruckeri* at first and second months after immunization.

Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M. (n=15).

<sup>a</sup> – the significant difference was shown as  $p < 0.05$  when compared unhandled group and vaccinated group values at first month after immunization.

The total antioxidant capacity (TAC), which is another marker used for indirectly determining the levels of oxidative stress in tissue (Bisogni et al., 2012). TAC (Fig. 3) was significantly decreased in the liver of vaccinated group compared to those in the control at first month after immunization (by 26.1%,  $p=0.010$ ) (Fig. 3). TAC in the liver at second month in the both unhandled group and group vaccinated against *Y. ruckeri* were significantly increased (by 136.4%,  $p=0.019$  and by 253.3%,  $p=0.000$ , respectively), compared to groups studied at first month after immunization (Fig. 3).

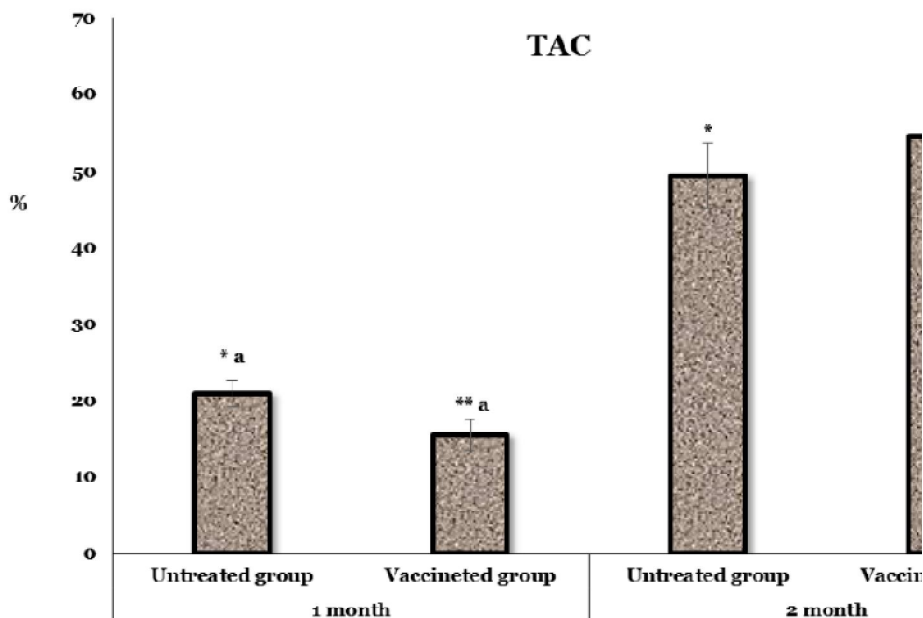


Fig. 3.Total antioxidant capacity (TAC, %) of the trout vaccinated against *Y. ruckeri* at first and second months after immunization. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M. (n=15). For legend \*, \*\* and <sup>a</sup>—see Figs 1 and 2.

Correlations between TBARS level and carbonyl content of oxidatively modified protein ( $r=0.637$ ,  $p=0.014$ ,  $r=0.837$ ,  $p=0.000$ , respectively) in the liver of anti-*Yersinia* vaccinated animals at first month confirm relation between lipid peroxidation and protein oxidation during the immunization (Fig. 4).

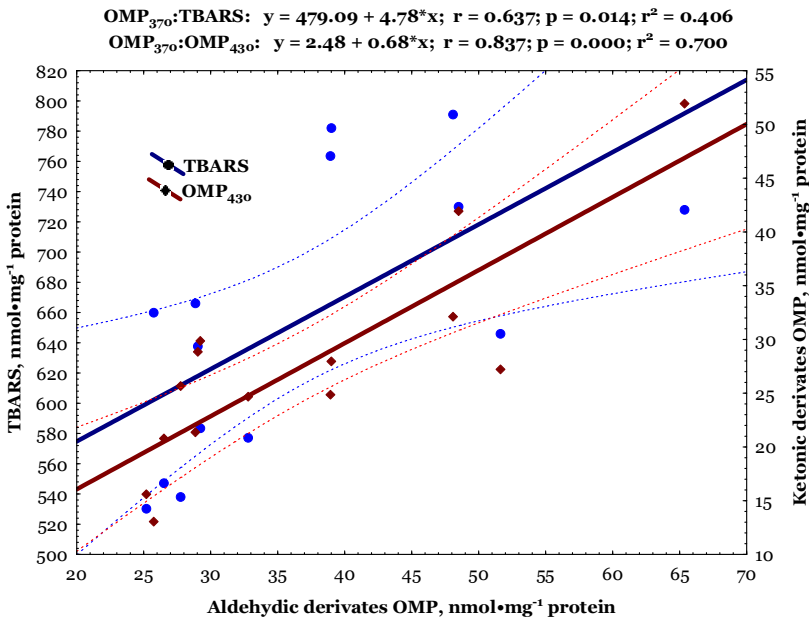


Fig. 4. Correlations between oxidative stress markers in the liver of trout vaccinated against *Y. ruckeri* at first month after immunization (n=15).

In the present study, three of the most widely used and accepted markers were utilized to demonstrate the existence of oxidative stress in the tissue (TBARS as marker of lipid peroxidation, aldehydic and ketonic derivates of OMP and the total antioxidant capacity). In this study our results clearly demonstrates that immunization by anti-*Yersinia* vaccine not alter the liver of rainbow trout. Oxidative stress parameters were examined in hepatic homogenate, and lipid peroxidation as measured by the amount of TBARS was non-significantly ( $p > 0.05$ ) in the liver of vaccine-treated fish. Moreover, at second month after vaccination TBARS level was decreased compared to value at first month (Fig. 1). The present work has showed that the ketonic derivates of OMP decrease significantly following vaccination against *Y. ruckeri* (Fig. 2B). All these culminated to an increase of total antioxidant capacity in liver at second month after vaccination.

In summary, the findings described in the present study allow the conclusion that immunization by anti-*Yersinia* vaccine not alter oxidative stress markers compared to a unhandled controls both at first and second months after immunization (instead ketonic derivates of OMP). Correlative analysis between oxidative stress biomarkers confirm our conclusions (Fig. 3). We also have shown that antioxidant defense makes it possible to avoid the cellular lesions that cause anti-*Yersinia* vaccine. From a broader perspective, it is suggested that immunization of fish by anti-*Yersinia* vaccine is associated with induced free radical formation and oxidative stress. Free radicals would therefore be at least partially responsible for immunity with humoral and cellular elements and increased protective immunity against *Y. ruckeri* infection.

Several studies have reported a relationship between *Y. ruckeri* O1 infection and immune system activation (the expression of IL-1 $\beta$ , IL-8 and IL-10 genes) in rainbow trout (Raida and Buchmann, 2008). Raida and Buchmann (2008) investigated development of adaptive immunity in rainbow trout surviving a primary infection with  $5 \times 10^5$  CFU *Y. ruckeri* O1 (LD<sub>50</sub> dose) by transcriptome analysis of spleen tissue. These fish surviving a primary infection showed also a significantly increased survival following a secondary infection (same dose) when compared to naive trout. The cytokines and chemokines comprised IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist (Ra), IL-6, IL-8, IL-10, IL-11 and IFN- $\gamma$ , IL-1 receptor I and II (IL-RI and IL-RII). Transcript levels of genes encoding cytokines and receptors were increased during the primary infection but not during the secondary infection. Changes of T cell occurrence or activity in the spleen during the infections were inferred from the transcript level of T cell receptor (TCR), CD4 and CD8 $\alpha$  genes. No alteration in the expression of MHC class II and immunoglobulins IgM and IgT was detected. The amount of *Y. ruckeri* O1 in the spleen was correlated to the expression of IL-1 $\beta$ , IL-8 and IL-10 genes with a peak expression (first infection). The low transcript levels of the bacterial gene and the hosts' immune genes during the re-infection can be interpreted as a result of development of adaptive immunity. This would explain the relatively fast elimination of the bacteria during the secondary infection whereby the activation of cytokines becomes less pronounced (Raida and Buchmann, 2008).

The oxidative stress biomarkers, i.e. content of oxidative protein damage, as well as total antioxidant capacity in the liver were sensitive to vaccination of trout against *Y. ruckeri* and may potentially be used as biomarkers in evaluating vaccine toxicity in rainbow trout.

*This study was funded by the Departmental Grant for Young Scientists of Pomeranian University in Slupsk.*

#### References

Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A., Porotov I.G. 1995. Oxidative modification of human serum proteins. A method of determining it. *Voprosy Meditsinskoĭ Khimii*, 41: 24-26 (Article in Russian, Abstract in English).

Galaktionova L.P., Molchanov A.V., El'chaninova S.A., VarshavskiĭBla. 1998. Lipid peroxidation in patients with gastric and duodenal ulcers. *Klinicheskaia Labaratornaia Diagnostika*, 6: 10-14 (Article in Russian, Abstract in English).

Horne M.T. and Barnes A.C. 1999. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: Woo P.T.K. and Bruno D.W. (eds.), *Fish Diseases and Disorders*, Vol. 3. CAB International, pp. 456-477.

Kamyshnikov V.S. 2004. Reference book on clinic and biochemical researches and laboratory diagnostics. MEDpress-inform, Moscow.

Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amic A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186: 464-478.

Pękala A., Antychowicz J. 2010. Yersiniosis of salmonids – epizootiology of the disease, methods of its elimination. *Medycyna Wet.*, 66 (6): 374-377 (Article in Polish, Abstract in English).

Raida M.K., Buchmann K. 2008. Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine*, 26(8): 1050-1062.

Stadtman E.R., Levine R.L. 2000. Protein oxidation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 899: 191-208.

Thompson K.D., Adams A. 2004. Current Trends in Immunotherapy and Vaccine Development for Bacterial Diseases of Fish. In: *Current trends in the study of bacterial and viral fish and shrimp diseases* / Ed. Ka Yin Leung. (Molecular aspects of fish and marine biology; V. 3), World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, pp. 313-362.

Zar J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*, 4<sup>th</sup> ed., Prentice Hall Inc., New Jersey.

# УЛЬТРАСТРУКТУРА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КЕФАЛИ *MUGIL AURATUS*

Л.В. Балабанова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,  
Борок, Россия, e-mail: [balab@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:balab@ibiw.yaroslavl.ru)*

Интерес к изучению иммунной системы рыб, в частности составляющих ее клеток, связан с развитием сравнительно-иммунологических исследований. Рыбы интересны в этом отношении потому, что они – одна из наиболее древних групп животных, у которых появляются дифференцированные структуры, ответственные за иммунитет, и иммуноглобулины с функцией антител.

К дифференцированным структурам, ответственным за иммунитет, у костистых рыб относятся почки, главным образом головной отдел, который, по мнению ряда авторов (Catton, 1951; Zapata, 1979), сходен функционально с костным мозгом млекопитающих, а также селезенка и тимус. Здесь происходит образование иммунокомпетентных клеток, выполняющих функцию распознавания и нейтрализации чужеродных веществ в организме. Поскольку головной отдел почек у костистых рыб – основной орган лимфо- и гранулопоэза, он был взят для исследования иммунокомпетентных клеток кефали.

Центральная фигура иммунной системы позвоночных – лимфоцит. У кефали, как и у других позвоночных животных, малые лимфоциты – клетки небольшого размера ( $3.2 \times 2.5$  мкм), большую их часть занимает ядро с конденсированным хроматином.

Имуноглобулины секретируют плазматические клетки, их морфологическое строение отражает их функцию. Плазматические клетки кефали имеют типичное для этого типа клеток ультратонкое строение. Ядро этих клеток расположено эксцентрично, почти вся цитоплазма заполнена гранулярным эндоплазматическим ретикуломом, на рибосомах которого происходит синтез иммуноглобулинов.

Рис. 1. Малый лимфоцит



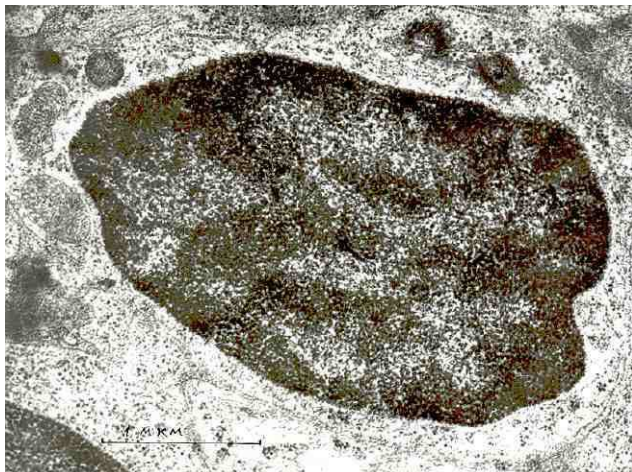
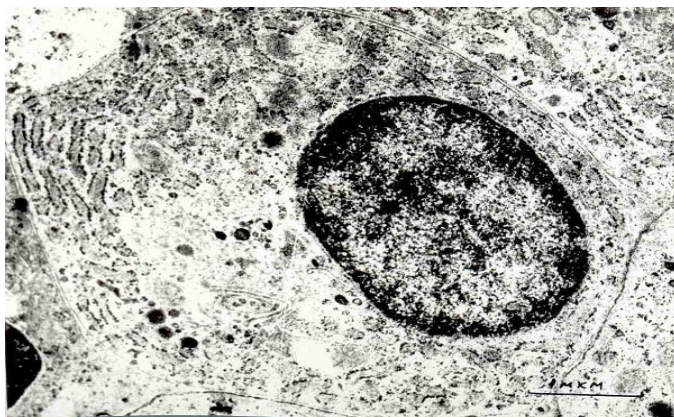


Рис. 2. Плазматическая клетка

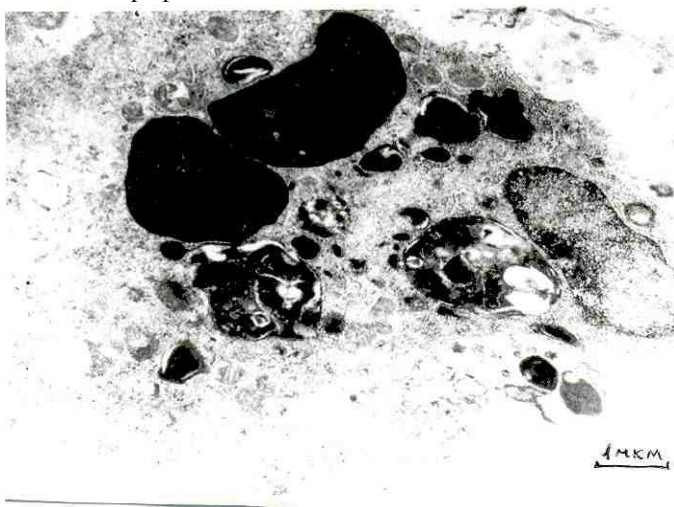


Макрофаги – крупные (до 10 мкм в диаметре) клетки, способные фагоцитировать, поэтому характерный признак этих клеток – наличие фагосом и лизосом в цитоплазме. Ядро расположено эксцентрично, гетерохроматин в нем слабо конденсирован.

Гранулоциты. Если лимфоциты, плазматические клетки и макрофаги имеют сходное ультратонкое строение у всех изученных видов рыб и других позвоночных животных, то полного соответствия гранулоцитов рыб гранулоцитам млекопитающих нет, поэтому некоторые авторы (Barber et al., 1981; Dogget, Harris, 1989) гранулоциты рыб называют

гранулоцитами 1, 2 и 3 типа, а не нейтрофилами, эозинофилами и базофилами.

Рис. 3. Макрофаг



У рыб отмечается различие в количестве типов гранулоцитов. У большинства видов рыб, в том числе и у кефали, 2 типа гранулоцитов – 1 и 2 типа. Наиболее многочисленны гранулоциты 1 типа. Это клетки с эксцентрично расположенным подковообразным ядром и многочисленными гранулами в цитоплазме. Гранулы удлиненные, структура их однородна по электронной плотности.

У гранулоцитов 2 типа ядро округлое, эксцентрично расположенное. Специфические гранулы этих клеток довольно крупные, округлые, содержимое гранул довольно однородно по электронной плотности.

Таким образом, изучение ультраструктуры иммунокомпетентных клеток кефали показало, что основные клетки иммунной системы – лимфоциты, плазматические клетки и макрофаги не имеют каких-либо видовых особенностей в ультратонком строении. Не отличаются они и от соответствующих клеток млекопитающих. Можно предположить, что это морфологически и функционально сложившиеся типы клеток. У рыб отмечается различие в количестве типов

гранулоцитов (1, 2 или 3). У кефали, как и у большинства видов рыб, 2 типа гранулоцитов. У разных видов

Рис. 4. Гранулоцит 1-го типа

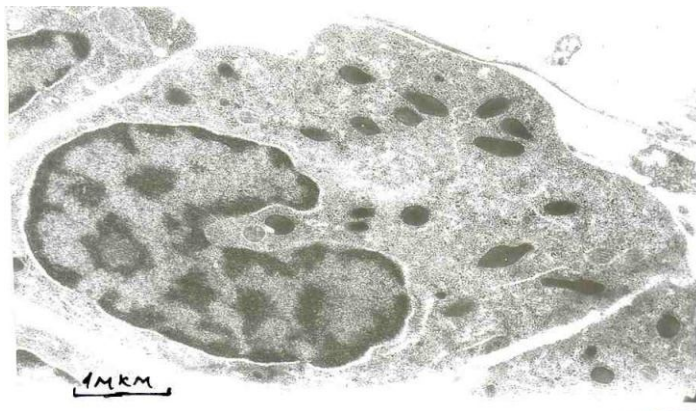
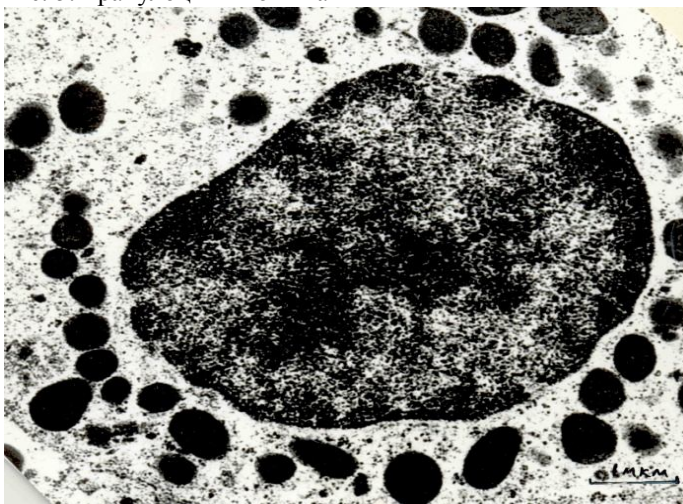


Рис. 5. Гранулоцит 2-го типа



рыб гранулоциты 1 типа различаются формой, размерами и структурой специфических гранул. Гранулоциты 2 типа имеют сходное тонкое строение у всех изученных видов рыб.

Список литературы

1. Barber D.L., Westerman J.E.M., White M.G. The blood cells of the Antarctic icefish *C. Chaenocephalus aceratus* Lonnberg: light and electron microscopic observation // J. Fish Biol. 1981. V. 19. № 1. P. 11-28.

2. Catton W.T. Blood formation in certain teleost fishes // Blood. 1951. V. 6. № 1. P. 39-60.
3. Dogget T.A., Harris J.E. Ultrastructure of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus* // J. Fish Biol. 1989. V. 33. № 5. P. 747-756.
4. Zapata A. Ultrastructural study of the teleost fish kidney // Devel. Comp. Immun. 1979. V. 3. № 1. P. 55-65.

## **НОВЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ЙЕРСИНИОЗА ЛОСОСЕВЫХ РЫБ НА ОСНОВЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА (ИФА)**

П.Д. Богданова, А.Е. Дрошнев, М.А. Карпова, Е.А. Завьялова  
*Всероссийский научно-исследовательский институт  
экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко (ФГБНУ  
ВИЭВ), Москва, Россия, e-mail: [asdf1961@yandex.ru](mailto:asdf1961@yandex.ru)*

*Yersinia ruckeri*, представитель семейства *Enterobacteriaceae*, возбудитель хронической системной инфекции радужной форели, выращиваемой в пресной воде, вызывает кишечную болезнь йерсиниоз - Enteric Red Mouth (ERM), также известную под названием «красный рот».

Впервые была открыта и изучена Рукером и Россом в Айдахо, США (Rucker, 1966). Позднее *Y. ruckeri* попала в другие страны, занимающиеся интенсивным рыбоводством, где сейчас считается опасной инфекцией. Возбудитель заболевания был выделен в Европе – Италии (Busch, 1978), Великобритании (Roberts, 1983), на юго-востоке Франции (Lesel, 1983), в Германии и Норвегии, на ближнем востоке (Timur, 1991), а так же на континентах – в Австралии (Rubsamen, 1983), Южной Америке. В России йерсиниоз не входит в список карантинных, несмотря на ежегодно увеличивающееся количество вспышек заболевания.

Заболеванию ERM наиболее подвержены мальки, у крупных особей болезнь протекает хронически. Переболевшая йерсиниозом рыба становится источником распространения возбудителя, бактерии *Y. ruckeri* не теряют способности инфицировать рыбу в течение нескольких месяцев (Coquet, 2002). Отсутствие правильно подобранной терапии при данном заболевании ведет к порче товарного вида рыб и её гибели. При

тяжелых случаях потери могут составить до 90% особей всех возрастных групп, что может нанести существенный урон рыбоводческому хозяйству.

На данный момент выявление йерсиниоза в лаборатории, основано на обнаружении бактерий в посевах на питательных средах с последующим изучением их биологических свойств (Временные методические указания по диагностике йерсиниоза лососевых рыб, 1999). Это длительный метод, результат анализа напрямую зависит от таких факторов, как опыт и компетенция специалиста, проводящего работу, качества используемой питательной среды и т.п. В тоже время только своевременно полученные результаты могут увеличить эффективность профилактики и лечения болезни.

В последнее время широкое распространение в медицине и ветеринарии получил иммуноферментный анализ (ИФА) – комбинация высокоспецифичной иммунологической реакции с чувствительным каталитическим действием ферментного маркера. Главные достоинства метода заключаются в высокой специфичности, скорости и простоте постановки реакции, сравнительно невысокой стоимости и универсальности применяемого оборудования, возможности автоматизации процедуры анализа.

В связи с этим, целью настоящего исследования является разработка быстрого и точного диагностического теста на основе современных методов, таких как ИФА.

В разработке тест-системы использовали антиген *Yersinia ruckeri*, наработанный на плотных питательных средах и очищенный методом высокоскоростного центрифугирования и фильтрацией. Для сенсibilизации планшетов использовали полученные ранее в нашей лаборатории специфические кроличьи антитела против *Yersinia ruckeri* двух серогрупп.

*IgG* из иммунных сывороток выделяли высаливанием раствором серноокислого аммония с последующей гельфильтрацией и ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе с измерением концентрации белка (Досон, 1991). Конъюгирование фермента с иммуноглобулинами проводили ковалентным способом, для введения фермента в молекулы



антител использовали периодат натрия по методике Wilson и др. (Wilson, 1978). В качестве ферментативной метки использовалась пероксидаза хрена (ПХ)  $RZ > 3,1$ .

Неспецифические компоненты: субстрат - ТМБ (тетраметилбензидин), «стоп-раствор» - 2 М серная кислота, отмывочный буфер ФСБ-Т (фосфатно-солевой буфер с твином pH 7.4-7.6).

Позитивный и негативный порог (ПНП) реакции рассчитывали по методу D.V. Snyder с коллегами (Van der Marel, 1990). Сумма среднего значения и двух стандартных отклонений являлась верхней границей отрицательных значений, а сумма среднего значения и трёх стандартных отклонений – нижней границей положительных значений.

При исследовании патологического материала в реакцию брали суспензию внутренних органов экспериментально зараженных рыб и чистые культуры бактерий, при этом идентификация бактерий проводилась одновременным выделением на плотных питательных средах и постановкой ИФА.

В качестве испытуемого материала использовали лабораторные штаммы из коллекции лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ и пробы от лососевых рыб полученные в некоторых рыбоводческих хозяйствах России. Отрицательным контролем служили другие виды микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, и рода *Pseudomonas*, образцы тканей лососевых и других видов рыб, свободные от *Y. ruckeri*.

Концентрацию специфических IgG и рабочее разведение конъюгата определяли методом «шахматного» титрования. Оптимальное рабочее разведение антител, наилучший диапазон оптической плотности подбирали для повышения точности и чувствительности реакции.

Для определения концентрации антител, сенсibilизированных на планшеты, их титровали с положительными и отрицательными контролями.

Оптимальное разведение антигена, обеспечивающее достоверное различие результатов с положительными и контрольными образцами составило 20 мкг/мл.

Для определения ПНП реакции в ИФА тестировали 120 заведомо отрицательных образцов. Значение стандартного отклонения не превышало 0,018 о.е., что свидетельствует о хорошей воспроизводимости результатов. Рассчитывали среднее значение оптической плотности образцов, которое составило - 0,360 о.е. и прибавляли удвоенное значение стандартного отклонения - 0,018 о.е. ПНП, представленный в виде прямой, отражал верхнюю границу отрицательных величин - 0,396 о.е., а оптическая плотность, соответствующая наименьшему положительному значению равнялась 0,590 о.е.

В тесте на воспроизводимость определяли статистические характеристики для положительных и отрицательных контрольных препаратов при исследовании их в пяти повторностях. Показано, что взаимодействие тест-системы с препаратами гетерологичных культур бактерий (*E. coli*; *Citrobacter sp.*; *Vibrio sp.*; *Salmonella sp.*; *Yersinia enterocolitica*), и неинфицированными тканями рыб было на уровне фона. При этом среди лунок на планшете коэффициент вариации составил 2-4%, между отдельными планшетами не превышал 3%, что свидетельствует о высокой чувствительности и специфичности данного метода, а также иммунологических компонентов.

Биоматериал, использованный в тестировании сконструированного диагностикума, контролировался методом ПЦР с помощью разработанных ранее методик (Богданова, 2014, Завьялова, 2014). При этом установлено, что специфические фрагменты определенного размера амплифицировались только в образцах *Y. ruckeri*, что полностью совпадало с результатами ИФА. В пробах отрицательных по результатам серологических реакций также отсутствовала гомологичность с искомой видовой нуклеотидной последовательностью при молекулярно-генетическом анализе. Полученные данные подтверждают специфичность и чувствительность разработанного метода и приготовленных иммунологических компонентов.

В результате проведенных исследований нами была разработана тест-система на основе твердофазного «сэндвич» - варианта ИФА не имеющая отечественных и зарубежных аналогов.

Диагностический набор позволяют определить присутствие антигена *Y. ruckeri* в инфицированных гомогенатах тканей рыб в течение четырёх часов с достоверностью не менее 98%. Показана возможность применения метода для быстрого выявления болезни при диагностических исследованиях.

Набор разработан таким образом, что считывание результатов можно проводить визуально, а инкубация происходит при комнатной температуре, следовательно, не требуется дополнительного оборудования и позволяет получать результаты даже на месте отбора проб.

Тест-система найдет применение в системе мониторинга, проводимого органами ветеринарной службы страны, что позволит контролировать заболеваемость йерсиниозом, а также в научных исследованиях для получения информации о закономерностях циркуляции йерсиний вида *Yersinia ruckeri* в аквакультуре.

Высокая чувствительность, специфичность, простота постановки реакции и возможность автоматизации процессов, позволят в короткие сроки проводить массовые обследования в рыбоводческих хозяйствах с целью определения распространения заболевания. Оперативность анализа при данной инфекции имеет принципиальное значение, так как ускоренная диагностика позволяет максимально быстро приступить к лечению, тем самым оздоравливая и сохраняя здоровье культивируемых рыб.

#### Список литературы

Богданова П.Д. Тест-система для дифференциальной диагностики йерсиниоза лососевых рыб / Богданова П.Д., Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А., Гулюкин М.И. // Сборник материалов 2-й международной конференции молодых ученых «Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности», Казахстан, п.г.т. Гвардейский, 2014, с. 61-64.

Временные методические указания по диагностике йерсиниоза лососевых рыб // Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб (часть 2), Москва, отдел маркетинга АМБ-агро, 1999; с. 66-68.

Досон, Р. Справочник биохимика / Досон, Р., Эллиот, Д., Эллиот, У., Джонс, К., М.: Изд-во «Мир», 1991. 545 с.

Завьялова Е.А. Использование метода ПЦР для дифференциальной диагностики йерсиниоза лососевых рыб / Завьялова Е.А., Богданова П.Д., Щепетов Д.М., Дрошнев А.Е., Гулюкин М.И. // Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2014», Том II, Москва, 2014, с. 476.



Busch, R.A. Enteric redmouth disease (Hagerman strain) // Mar. Fish. Rev. 1978; 40 (3): S. 42-51.

Coquet, L. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. / Coquet, L., Cosette, P., Junter, G. A., Beucher, E., Saiter, J. M., & Jouenne, T. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2002, 26, 373-378.

Lesel, R. Outbreak of enteric redmouth disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in France / Lesel, R., Lesel, M., Gavini F., Vuillaume, A. // Journal of Fish Diseases. 1983; 6: S. 385-387.

Roberts, M.S. A report of an epizootic in hatchery-reared rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at an English trout farm, caused by *Yersinia ruckeri* // J. Fish Dis. 1983; 6: S. 551-552.

Rubsamen, S. Nachweis von Enteric Redmouth bei Regenbogenforelen, *Salmo gairdneri* Richardson, in Sudbuden / Rubsamen, S., Weis, J. // Tierarztl. Umsch. 1983; Jg 40 (№12): S. 995-998.

Rucker, R.R. Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // Bull. Off. Int. des Epiz. 1966; 65: S. 825-830.

Timur, G. An outbreak of enteric redmouth disease in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey / Timur G, Timur M. // Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 1991; 11: S. 181-182.

Van der Marel P. Antigenic characterization of IBDV field isolates by their reactivity with a panel of monoclonal antibodies / Van der Marel P., Snyder D.B, Luticken D. // Dtsch.tierarztl. Wschr. 1990. Bd. 97. S. 81-83.

Wilson M.B. Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidases (HRPO) to antibodies. / Wilson M.B., Nakane P.K. // Biomedical press; 1978: S. 215-244.

### **THE NEW DETECTION METHOD FOR SALMONIDS YERSINIOSIS BASED ON ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)**

P.D. Bogdanova, A.E. Droshnev, M.A. Carpova, E.A. Zavyalova

The article presents a framework for the development of the test for detection of yersiniosis, a serious disease of salmonids damaging fish farms. Developed the ELISA diagnostic kit allows quickly identify the pathogen in samples of biological material and can be used for the monitoring of bacterial fish diseases.

# АССОЦИАТИВНОЕ ВЛИЯНИЕ ОПАСНЫХ ПАТОГЕНОВ РЫБ – ВИРУСА ИHN И БАКТЕРИЙ *AEROMONAS* *SALMONICIDA* SUBSP. *SALMONICIDA*

Е.В. Бочкова, Е.А. Устименко, Н.В. Сергеенко

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Камчатский научно-исследовательский институт рыбного  
хозяйства и океанографии», Петропавловск-Камчатский, Россия  
e-mail: Bochkova.e.v.@kamniro.ru

Условно-патогенная бактериальная микрофлора родов *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Vibrio*, *Achromobacter* и др. может влиять на инактивацию вирусов (Magnusson, 1967; Fujioka et al., 1980; Kamei et al., 1987a). Так, опытным путем было определено, что время наиболее быстрой потери вирусной активности совпадает с периодом пика бактериального роста в пробах воды (Toranzo, Hetrick, 1982; Yoshinaka et al., 2000). Из 6 исследованных видов бактерий, все адсорбировали вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV), но при этом два из них, *Pseudomonas fluorescens* и *Alteromonas* sp., продуцировали к нему антивирусное вещество. При проверке влияния морской и эстуарной воды на инфективность IHNV и вируса панкреатического некроза (IPNV) наблюдали сильное снижение значений титров изолятов вирусов уже на третий день инкубации (Kamei et al., 1987b). При этом потери инфективности в профильтрованной или автоклавированной воде были незначительными. Чистые бактериальные культуры *Pseudomonas* sp. и *Achromobacter* sp. быстро инактивировали вирусы. Фильтрат культуры *Pseudomonas* sp., выделенной из отработанной воды с лососевого завода, вызывал редукцию титра IHNV меньше определяемого уровня в течение 3-дневного инкубационного периода, а автоклавированный фильтрат не влиял на вирус (Yoshimizu et al., 1986). С другой стороны, имеется сообщение о том, что изоляция IHNV от чавычи была успешна только у рыб, которые были конкурентно инфицированы *Renibacterium salmoninarum* или *Piscirickettsia salmonis* (St-Hilaire et al., 2001).

С 2001 г. в камчатских популяциях нерки (*Oncorhynchus nerka*) проводится мониторинг за распространением и активностью регулярно выявляемых опасных для лососей патогенов - вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани (Infectious hematopoietic necrosis virus - IHNV) и бактерии *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, возбудителя фурункулеза лососевых. ИHN вызывает рабдовирус (сем. *Rabdoviridae*) из рода *Novirhabdovirus*. У молоди лососей заболевание сопровождается тяжелым поражением органов гемопоэза; при вспышке заболевания в заводских условиях смертность мальков нередко достигает 100% (Wolf, 1988). Вид *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* - возбудитель типичного фурункулеза, вызывает серьезную септицемию с последующей смертностью, особенно среди холодноводных рыб (Austin, Austin, 1993).

Никаких упоминаний о взаимодействии этих двух патогенов между собой и/или их ассоциативном влиянии на рыб в литературе мы не встречали. С целью проверки, оказывают ли они какое-либо влияние друг на друга, провели серию экспериментов *in vitro* с заражением линии клеток ЕРС чистыми культурами *A. salmonicida*, вируса ИHN, а также их ассоциацией этих патогенов.

Для экспериментов были отобраны изоляты ИHNV и штаммы *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, выделенные в 2012 - 2014 гг. у половозрелой нерки, отловленной на нерестилищах внутренних водоемов Камчатки. До исследований вирусные изоляты и бактериальные штаммы хранили в низкотемпературных холодильниках при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Сделали 7 десятикратных разведений инфекционного материала от  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ . Заражение проводили на клеточную линию ЕРС (эпидермальные новообразования больного оспой карпа) на 96-луночных микропанелях, которые инкубировали при  $15^{\circ}\text{C}$  в течение 10-14 дней. Клеточные линии культивировали по стандартным методикам (Сборник инструкций..., 1998). В опытах использовали суспензии бактерий в стерильном физиологическом растворе с мутностью от 0,3 до 0,6 единиц по стандарту МакФарланда (МСФ). Для получения нужной концентрации бактерий применяли прибор для определения оптической мутности Денсиламетр (Лахема, Чехия).

Вирусную и бактериальную активность количественно оценивали по оказываемому ими цитопатическому действию (ЦПД) на линию клеток ЕРС (рисунок 1 А) с помощью титрования по методу Рида и Менча (Лабораторный практикум..., 1983). Для определения значимости различий между полученными титрами изолятов вируса и штаммов бактерий использовали стандартный критерий - сравнение десятичных логарифмов тканевых цитопатических доз ( $\lg$  ТЦД<sub>50</sub>/мл): различия десятичных логарифмов меньше чем на 1 считались незначительными, от 1 до 1,6 сомнительно значимыми и от 1,7 и больше - существенно значимыми (Rovozzo, Burke, 1973).

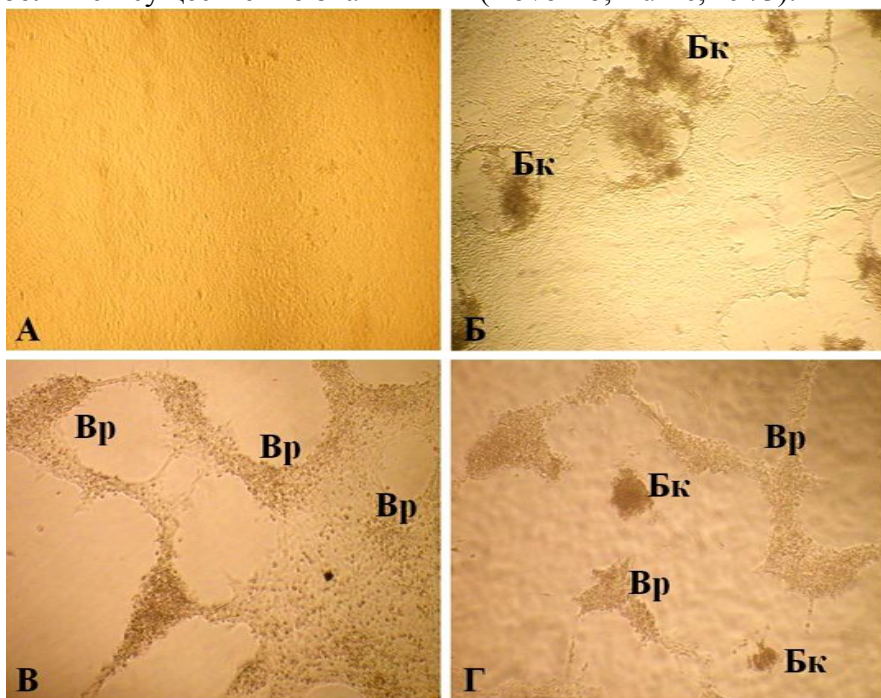


Рисунок 1 - Цитопатическое действие *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* и IHNV на линию клеток ЕРС: А - линия клеток ЕРС, контрольный клеточный монослой; Б - разрушение клеток под действием *A. salmonicida* (Бк); В - разрушение клеток под действием IHNV (Вр); Г - комплексное бактериально (Бк) – вирусное (Вр) воздействие.

В первые два дня после заражения отмечали цитопатическое действие на клетки бактериального инфекционного материала в лунках с разведением  $10^{-1}$  -  $10^{-2}$  (рисунок 1Б). На третий день к

ним добавились визуальные признаки ЦПД вируса (рисунок 1В), как при инокуляции чистой культурой IHNV, так и при смешанном заражении. Далее разрушение под действием двух патогенных агентов шло параллельно; при совместном заражении очажки двух инфекций сливались, постепенно приводя к гибели всех клеток в лунке (рисунок 1Г). На пятый день признаки смешанного ЦПД появились в  $10^{-4}$  –  $10^{-5}$  разведениях. Деструкция клеток в новых лунках и разведениях перестало появляться на 9 - 10 день после инокуляции. ЦПД вируса и бактерий хорошо идентифицировалось, отличаясь по типу разрушения клеток.

В результате экспериментов установили, что различия в исходных значениях титров и титров, полученных при совместном заражении как вирусных изолятов, так и бактериальных штаммов, были незначительными, т.е. существенно не изменялись при заражении линии клеток чистыми культурами патогенов и смешанными, и составили 0,1 – 0,7 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл (таблица 1).

Следовательно, в опытах *in vitro* *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* и IHNV не угнетали и не стимулировали друг друга: ЦПД бактерий и вирусов на клетки мы наблюдали одновременно в одних и тех же лунках (рисунок 1Г).

Таблица 1. Титры изолятов IHNV и штаммов *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, полученные в ходе экспериментов на линии клеток EPC

Значения титров IHNV (ТЦД <sub>50</sub> /мл)		Значения титров <i>A. salmonicida</i> (ТЦД <sub>50</sub> /мл)	
исходных	при заражении вирус+бактерии	исходных	при заражении вирус+бактерии
$0,4 \times 10^{7,6}$	$0,4 \times 10^{7,5}$	$0,4 \times 10^{7,5}$	$0,4 \times 10^{7,5}$
$0,4 \times 10^{7,6}$	$0,4 \times 10^{6,7}$	$0,4 \times 10^{6,2}$	$0,4 \times 10^{6,5}$
$0,4 \times 10^{8,2}$	$0,4 \times 10^{7,6}$	$0,4 \times 10^{7,5}$	$0,4 \times 10^{7,6}$
$0,4 \times 10^{8,2}$	$0,4 \times 10^{7,5}$	$0,4 \times 10^{6,2}$	$0,4 \times 10^{5,5}$
$0,4 \times 10^{8,2}$	$0,4 \times 10^{8,8}$	$0,4 \times 10^{7,6}$	$0,4 \times 10^{7,8}$
$0,4 \times 10^{8,2}$	$0,4 \times 10^{7,5}$	$0,4 \times 10^{7,0}$	$0,4 \times 10^{6,8}$

Фурункулез у проходных лососевых часто проявляется в период нерестовых миграций в пресноводные реки (Сборник инструкций..., 1998). У преднерестовых особей обычно встречается хроническая бессимптомная форма инфекции.

Подобное течение болезни часто наблюдают у половозрелых рыб, оно может продолжаться до нескольких недель и даже месяцев (Вялова, Шкурина, 2005). Перенос возбудителя происходит через инфицированные половые продукты, орудия лова, воду.

ИHNV начинает проявляться у рыб в период преднерестовой миграции при заходе в пресную воду, попытки выделить вирус у нерки во время морской фазы ее жизненного цикла были безуспешными (Traxler et al., 1997). Есть предположение, что активация вируса происходит из-за стресса, в результате которого иммунная система рыб перестает контролировать вирус (Mulcahy et al., 1984). Передача патогена осуществляется как вертикальным (от родителей потомству), так и горизонтальным путем с выделениями от больных рыб и носителей через воду.

По данным наших исследований, в независимых выборках нерки из внутренних водоемов Камчатки в разные годы бактериями *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* было заражено от 0 до 50% рыб. Преvalентность ИHNV была несколько выше - от 0 до 83,3%. В общей сложности, в 49% случаев выявления у половозрелой нерки *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* мы отмечали ассоциативное асимптоматическое носительство этих бактерий и ИHNV. Следовательно, преднерестовые и нерестовые зараженные особи нерки примерно в одно и то же время выделяют в воду на нерестилищах этих патогенных агентов, формируя естественные и, исходя из результатов наших экспериментов, не влияющие друг на друга (без учета факторов окружающей среды), независимые резервуары ИHNV и *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Таким образом, в водоемах длительное время сохраняются возбудители опасных инфекционных заболеваний, представляя реальную угрозу как для молоди лососей, нагуливающейся в тех же самых водоемах, так и для других чувствительных видов рыб. Инфицированные рыбы, в свою очередь, становятся носителями и распространителями патогенов, поддерживая и обеспечивая циркуляцию вирусов и бактерий в популяциях и водоемах.

#### Список литературы

Вялова Г.П., Шкурина З.К. Микрофлора и бактериальные болезни тихоокеанских лососей естественных популяций и в аквакультуре на Сахалине. Южно-Сахалинск: СахНИРО. 2005. 117 с.

Лабораторный практикум по болезням рыб. Под редакцией В.А. Мусселиус. М.: Лег. и пищ. пром-сть. 1983. 294 с.

Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. М.: Отдел маркетинга АМБаро. 1998. Ч. 1. 310 с.

Austin B., Austin D.A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. New York: Ellis Horwood Ltd. 1993. 384 p.

Fujioka R.S., Lox P.C., Lau L.S. Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment: evidence for virus-inactivating microorganisms // Appl. Environ. Microbiol. 1980. 39. P. 1105-1110.

Kamei Y., Yoshimizu M., Ezura Y., Kimura T. Screening of bacteria with antiviral activity against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) from estuarine and marine environments // Nippon Suisan Gakkaishi. 1987a. V. 53(12). P. 2179-2185.

Kamei Y., Yoshimizu M., Ezura Y., Kimura T. Effects of estuarine and marine waters on the infectivities of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) // Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ. 1987b. V. 38 / (3). P. 271-285.

Magnusson S., Gundersen K., Brandberg A., Lycke E. Marine bacteria and their possible relation to the virus inactivation capacity of sea water // Acta Path. Et Microbiol. Scandinav. 1967. V. 71. P. 274-280.

Mulcahy D., Jenes C.K., Pascho R.J. Appearance and quantification of infectious hematopoietic necrosis virus in female sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) during their spawning migration // Archives of virology. 1984. V. 80. P. 171-181.

Rovozzo G.G., Burke C.N. A manual of basic virological techniques // Prentice-Hall, Englewood Cliffs. New Jersey. 1973. P. 38-48.

St-Hilaire S., Ribble C., Traxler G., Davies T., Kent M. Evidence for a carrier state of infectious hematopoietic necrosis virus in Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* // J. Dis. Aquat. Org. 2001. V. 46. P. 173-179.

Toranzo A., Hetrick F. Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, estuarine and marine waters // J. Fish Dis. 1982. № 5. P. 223-231.

Traxler G.S., Roome J.R., Lauda K.A., LaPatra S. Appearance of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and neutralizing antibodies in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) during their migration and maturation period // J. Dis. Aquat. Org. 1997. V. 28. P. 31-38.

Wolf K. Fish viruses and fish viral diseases. – U.S. Fish and wildlife serv. Ithaca. London. 1988. 478 p.

Yoshimizu M., Takizava H., Kamei Y., Kimura T. Interaction between fish pathogenic viruses and microorganisms in fish rearing water: Survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus, infectious hematopoietic necrosis virus and *Oncorhynchus masou* virus in rearing water // Fish Pathol. 1986. V. 21. P. 223-231.

Yoshinaka T., Yoshimizu M., Ezura Y. Adsorption and infectivity of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) with various solids // J. Aquat. Anim. Health. 2000. № 12. P. 64-68.

**ASSOCIATIVE IMPACT OF DANGEROUS FISH PATHOGENS -  
IHNV AND BACTERIA *AEROMONAS SALMONICIDA* SUBSP.  
*SALMONICIDA***

E.V. Bochkova, E.A. Ustimenko, N.V. Sergeenko

Results of experiments on the infection of a cell line EPC by two particularly dangerous fish pathogens - infectious hematopoietic necrosis virus and bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* - presented in this communication. It is showed, that *in vitro* *A. salmonicida* and IHNV are not inactivated and promote each others. Destruction of cells by viruses and bacteria occur in the same wells.

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ПИРИМИДИНОВ НА ГУМОРАЛЬНЫЙ  
И КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ РЫБ**

К.В. Гаврилин<sup>1</sup>, Т.А. Суворова<sup>2</sup>, А.К. Пономарев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО МГУТУ (ПКУ) Институт «Биотехнологий и  
рыбного хозяйства», Москва, Россия, e-mail: [k.gavrilin@yandex.ru](mailto:k.gavrilin@yandex.ru),  
[ponomarev777@inbox.ru](mailto:ponomarev777@inbox.ru)

<sup>2</sup> Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,  
Борок, Россия, e-mail: [tanya@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:tanya@ibiw.yaroslavl.ru)

В последнее время значительное внимание уделяется разработке и исследованию химических соединений способных стимулировать или подавлять (моделировать) иммунные реакции организма человека. Стало очевидно, что терапевтическое действие ряда лекарственных средств связано с их способностью повышать общую сопротивляемость организма и влиять на специфические иммунные реакции (Машковский, 2011). Принципиальная возможность влиять на напряженность антипаразитарного иммунитета рыб при помощи иммуномодулирующих химических соединений показана зарубежными исследователями на примере *Oncorhynchus mykiss* (Wahli et al., 1995). Скармливание инвазированным *Ichthyophthirius sp.* гидробионтам различных препаративных форм аскорбиновой кислоты задерживало развитие болезни и снижало уровень гибели рыб.

Данное направление исследований может представлять определенный интерес и для отечественной аквакультуры. Речь может идти не только о иммунопрофилактике бактериальных



болезней, но и о коррекции различных иммунодефицитных состояний, снижении смертности при вирусных заболеваниях, усилении действия и снижении отрицательных последствий применения антибиотиков и т.д. Но учитывая различия в биологической организации теплокровных животных и рыб, для оценки перспективности данного направления исследований необходимо выяснить, будут ли «медицинские» иммуностимуляторы оказывать аналогичное действие на рыб. В связи с этим нами была проведена оценка влияния двух достаточно широко используемых в гуманной медицине иммуностимуляторов из группы пиримидинов на гуморальное и клеточное звено иммунитета карпа (*Cyprinus carpio*).

Объектом исследования служили клинически здоровые двухлетки карпа, среднештучной массой  $150 \pm 10$  г. Рыб содержали в аквариумах, где была обеспечена аэрация и фильтрация воды при температуре  $21^\circ\text{C}$ . Условия содержания соответствовали биологическим потребностям карпа. На базе полноценного экструдированного корма для декоративных прудовых рыб TetraPond (Tetra GmbH, Германия) были изготовлены корма с ксимедоном (гидроксиэтилдиметилдигидропиримидин) и метилурацилом (диоксометилтетрагидропиримидин). Концентрация субстанций в корме обеспечивала возможность введения этих препаратов рыбам в дозе  $40 \text{ мг/кг}$  в сутки, методом вольного группового скармливания. Длительность кормления составляла 10 суток. Контрольная группа карпов находилась в тех же условиях и получала тот же корм, но без каких либо добавок.

До начала кормления (карпы отобраны случайным образом до формирования контрольной и опытных групп), через сутки и спустя 7 дней после окончания скармливания препаратов проводили иммунологические исследования. Изучали бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК), которая является интегрированным выражением противомикробных свойств гуморального звена неспецифического иммунитета: лизоцима, комплемента, пропердина, протеаз, С-реактивного белка, агглютининов, преципитинов и т.д. БАСК определяли с помощью фотонепелометрического колориметрирования

согласно методике, описанной О.В. Смирновой и Т.А. Кузьминой (1966) и адаптированной для рыб (Микряков и др., 1991).

О состоянии клеточного иммунитета судили по лейкограммам периферической крови и индексу обилия лейкоцитов. Состав лейкоцитов определяли в мазках крови, полученной из хвостовой вены после каудэктомии, окрашенных по Романовскому–Гимза. В каждом мазке определяли относительное количество лимфоцитов, палочко- и сегментоядерных нейтрофилов (ПЯ и СЯ, соответственно), эозинофилов, базофилов, моноцитов и бластных форм клеток. Известно, что симптоматическим отражением патологий является изменение числа форм лейкоцитов и перераспределение их относительного количества. В ихтиопатологических исследованиях при оценке последствий влияния патологических антигенов на рыб используют среднестатистические показатели, основанные на данных анализа лейкоцитарной формулы. Чтобы понять, каким образом использованные в наших опытах препараты влияют на функциональное состояние гемопоэтической ткани, предложен тест, позволяющий регистрировать интенсивность лейкопоэза по данным анализа индекса обилия лейкоцитов, или частоты встречаемости клеток белой крови в одном поле зрения. Этот показатель, в отличие от лейкоцитарной формулы, дает представление об интенсивности процесса лейкопоэза и функциональном состоянии гемо- и иммунопоэтической ткани и косвенно позволяет судить также об уровне содержания лейкоцитов в единице объема крови.

Для определения индекса обилия лейкоцитов в мазках крови просматривали 100 полей зрения на различных участках препарата под световым микроскопом. В каждом поле зрения подсчитывали количество встреченных лейкоцитов, полученные данные суммировали и делили на 100, получая, таким образом, среднее число лейкоцитов в одном поле зрения.

Результаты исследований подвергали статистической обработке при помощи стандартного пакета программ (приложение Statistica) с использованием t-теста при уровне значимости 0,05.

Результаты изучения БАСК, характеризующей активность гуморального звена иммунитета рыб представлена в таблице 1.

Данные представленные в таблице 1 свидетельствуют об обеспечении в течение эксперимента стабильных условий содержания рыб, обеспечивших практически отсутствие спонтанные колебания уровня БАСК, которые составляют не более 3%.

Таблица 1. Динамика БАСК, % под влиянием ксимедона и метилурацила

Время отбора проб	БАСК, %		
	Контроль	Ксимедон	Метилурацил
До начала опыта	9,57±0,08	-	-
Через 1 сут. после кормления	9,80±0,10	9,84±0,04*	9,80±0,07
Через 7 сут. после кормления	9,77±0,00	9,73±0,05	9,78±0,04*

Примечание \* различие с контролем достоверно.

Оба испытанных препарата проявили, хоть достаточно слабо выраженный, но статистически значимый иммуностимулирующий эффект, который достигает пика на 11 сутки эксперимента (сразу после завершения кормления) с последующим снижением. По иммуностимулирующей активности в отношении гуморального звена иммунитета ксимедон не значительно превосходит метилурацил, но различия в их активности статистически не достоверны, т.е. могут быть обусловлены случайными факторами и погрешностями в измерениях.

У опытных рыб после кормления исследуемыми соединениями происходят изменения в лейкоцитарной формуле по сравнению с интактными особями: процентное содержание лимфоцитов снижается, а моноцитов, гранулоцитов и бластных форм клеток повышается. Однако аналогично изменяются показатели контрольных рыб. Если на 1 сутки наблюдения они практически не отличаются от интактных, то на 7 сутки различия больше, чем у опытных рыб. Эти изменения указывают на незначительную дестабилизацию в содержании лейкоцитов. Наибольшая дестабилизация в первые сутки наблюдения

зафиксирована у обеих опытных групп, а через неделю у контрольной группы и у особей которым давали метилурацил. Полученные данные указывают на незначительное преимущество ксимедона перед метилурацилом.

Таблица 2. Влияние ксимедона и метилурацила на клеточное звено иммунитета рыб (лейкограмма), %

№	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы		Эозинофилы	Базофилы	Бластные формы
			ПЯ	СЯ			
1	99,6±0,18	0,2±0,12	0	0	0	0,1±0,1	0,1±0,1
2	98,5±0,0*	0,75±0,75	0	0,25±0,25	0	0	0,75±0,75
3	94,9±2,6	1±0,52	0,1±0,1	0,3±0,3	0,4±0,29	0,8±0,51	2,3±1,21
4	94,1±1,5*	1,7±0,76	0,7±0,2*Б	0,6±0,24*	0,3±0,3	0,1±0,1	2,5±0,96*
5	85,5±0,5*	5±1*	1,5±1*	0	2,0±0,5*	0,25±0,25	5,75±0,5*
6	92,3±1,5*А	0,87±0,12*А	1,25±0,43*	0,37±0,37	0,37±0,12*А	0	4,87±1,73*
7	88,7±2,4*	3,5±0,61*Б	1±0,28*	0	0,37±0,23А	0,12±0,12	6,25±2,29*

Примечание \* - достоверно отличается от контроля до опыта, А - достоверно отличается от контроля, Б – различия между эффектами ксимедоном и метилурацила достоверны, Группа №1 – рыбы подвергнутые исследованию до начала формирования контрольных и опытных групп (интактные), №2 – контрольная группа рыб исследованная через сутки после завершения кормления, №3 – группа рыб подвергнутая введению ксимедона исследованная через 1 сутки после завершения кормления, №4 - группа рыб подвергнутая введению метилурацила исследованная через 1 сутки после завершения кормления, №5 - контрольная группа рыб исследованная через 7 суток после завершения кормления, №6 - группа рыб подвергнутая введению ксимедона исследованная через 7 суток после завершения кормления, №б - группа рыб подвергнутая введению метилурацила исследованная через 7 суток после завершения кормления.

Таблица 3. Влияние ксимедона и метилурацила на клеточное звено иммунитета рыб (индекс обилия лейкоцитов), ед/п.з.

Время отбора проб	Контроль	Ксимедон	Метилурацил
До начала кормления, интактные	6,16±1,09	-	-
Через 1 сут. после кормления	4,30±1,40	6,00±1,00	6,48±0,98
Через 7 сут. после кормления	5,25±0,05	5,72±0,88	3,97±0,59

Аналогичные выводы можно сделать по результатам индекса обилия лейкоцитов представленных в таблице 3. Во всех

группах этот показатель снижается по сравнению с интактными особями, исключение составляли показатели опытных рыб 2-й группы через сутки после кормления. У контрольных рыб через сутки после кормления индекс обилия лейкоцитов снижается, а к 7 суткам повышается, у карпов, которым давали ксимедон практически не изменяется и чуть ниже, чем у интактных, у особей которым давали метилурацил исследуемый показатель через 1 сут был самым высоким, а через неделю самым низким.

Снижение данного показателя указывает на подавление интенсивности процесса лейкопоэза и функционального состояния гемо- и иммунопоэтической ткани. Однако полученные результаты имеют незначительные и недостоверные отличия. О влиянии препаратов на клеточный иммунитет судить сложно. С одной стороны после кормления исследуемыми веществами изменяется процентное соотношение лейкоцитов (по сравнению с интактными особями): уменьшается количество лимфоцитов (основных клеток иммунной системы), увеличивается количество гранулоцитов, что может указывать на аллергическую реакцию на препараты. Одновременно повышается содержание бластов (молодых клеток), что может говорить об усилении лейкопоэза.

С другой стороны на 7-е сутки у контрольных рыб происходящие изменения более значительны, чем в опыте, а данные таблицы 3 не указывают на усиление лейкопоэза. С этой точки зрения можно говорить об отрицательном влиянии и ксимедона и метилурацила. Однако можно предположить, что пересадка рыб в аквариумы, вылов части рыб для взятия проб (особенно через сутки после кормления) повлияли как стресс-фактор, тем более, что аналогичные, но более существенные изменения в лейкограммах происходят под воздействием стрессоров. Тогда более незначительные изменения в лейкоцитарной формуле у опытных рыб, по сравнению с контрольными, указывают на положительное влияние исследуемых препаратов.

Наиболее важным представляется то, что полученные в ходе вышеописанного эксперимента данные свидетельствуют о том, что химические соединения, положительно влияющие на процессы иммунитета у человека, могут оказывать сходное

влияние и на пойкилотермных животных - рыб. Тем не менее уверенно говорить об иммуностимулирующем действии пиримидинов на рыб, на данный момент нельзя. Очевидно, что нужны дополнительные исследования, в частности необходимо изучить влияние рассматриваемых соединений на процессы иммунитета после заражения рыб бактериальным антигеном.

Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2011. 1216 с.
2. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. 153 с.
3. Смирнова О.В., Кузьмина Т.А. Определение бактерицидной активности сыворотки методом нефелометрии // Журн. микробиол. 1966. № 4. С. 8-11.
4. Wahli T., Frischknecht R., Schmit M., Gabaudan J., Verlhac V., Meier W. A comparison of the effect of silicone coated ascorbis acid and ascorbul phosphate on the course of ichthiophthiriosis in ranbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) // Fish Diseases. 1995. №4. P. 347-355.

#### **EFFECT PYRIMIDINS WITH HUMORAL AND CELLULER IMMUNITY OF FISHS**

K.V. Gavrilin, T.A. Suvorova, A.K. Ponomarev

The effect xymedon and methyluracil on humoral and cellular immunity of carp are investigated. Both compounds showed weak stimulatory effect on the humoral immunity. Significant effects on cell-mediated immunity have been not detected.

#### **СОСТАВ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ОРГАНОВ КРОВЕТВОРЕНИЯ АНТАРКТИЧЕСКОГО КЛЫКАЧА *DISSOSTICHUS MAWSONI***

И.И. Гордеев<sup>1</sup>, Л.В. Балабанова<sup>2</sup>, Д.В. Микряков<sup>2</sup>, В.Р. Микряков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии г. Москва, ул. Верхняя Красносельская, д.17, Россия, e-mail: [gordeev\\_ilya@bk.ru](mailto:gordeev_ilya@bk.ru)*

<sup>2</sup>*Институт биологии внутренних вод РАН, Борок Ярославской обл., Россия*

Лейкоциты – полиморфные и полифункциональные клетки крови – выполняют разнообразные физиологические и иммунологические функции (Заварзин, 1976; Микряков,

Балабанова, 1979; Флоренсов, Пестова, 1990; Галактионов, 2005). Они осуществляют защиту организма от чужеродных тел, обеспечивают адаптацию рыб к биотическим и абиотическим факторам и иммунитет к паразитам (Микряков, Балабанова, 1979; Микряков, 1991; Secombes, 1996; Van Muiswinkel, Vervoorn-Van Der Wal, 2006). Основными типами клеток белой крови рыб являются лимфоциты, моноциты, нейтро-, эозино- и базофилы (Калашникова, 1976; Ellis, 1977; Иванова, 1983; Parish et al., 1986; Yadov et al., 1986; Головина, Тромбицкий, 1989; Флоренсов, Пестова, 1990; Точилина, 1994; Серпунин, 2002; Грушко и др., 2009). Состав лейкоцитов отражает видовые и экологические особенности рыб, а соотношение отдельных типов клеток – функциональное состояние организма и характер влияния биотических и абиотических стресс-факторов (Ellis, 1977; Parish et al., 1986; Yadov et al., 1986; Головина, Тромбицкий, 1989; Житенева и др., 1989; Точилина, 1994; Балабанова, 1998; Микряков и др., 2001). В настоящее время состав лейкоцитов у рыб наиболее полно изучен у представителей различных систематических и экологических групп, обитающих в пресноводных, солоноватоводных, морских и океанических экосистемах, а также в искусственных условиях содержания (Иванова, 1983; Яхненко, 1984; Головина, Тромбицкий, 1989; Точилина, 1994; Ellis, 1997; Серпунин, 2002; Грушко и др., 2009).

Исследованиями показано, что лейкоциты рыб тонко реагируют изменением интенсивности лейкопоза, перестройкой состава и величины содержания отдельных типов клеток на изменение физико-химических характеристик воды, воздействие разных по природе и происхождению биотических и абиотических стресс факторов. Сведения о составе лейкоцитов рыб, которые способны обитать на глубинах свыше 500–1500 м, совершать вертикальные миграции и преодолевать сильное гидродинамическое и гидростатическое сопротивление, в доступной литературе отсутствуют. Между тем, это представляется важным для понимания направления морфофизиологических перестроек клеточного состава лейкоцитов в процессе адаптации рыб к глубоководным условиям обитания.

Цель данной работы – изучить состав лейкоцитов периферической крови и органов кроветворения глубоководного вида рыб на примере антарктического клыкача *Dissostichus mawsoni*.

Антарктический клыкач из семейства Нототениевые (*Nototheriidae*) – крупная хищная рыба, обитает в холодных антарктических и субантарктических водах на глубине от 100 до 2000 м, ценный промысловый объект (Петров, 2011). Его особи достигают возраста 30 лет и более, длины до 2 м и массы до 120 кг. Основные объекты питания – рыбы и кальмары; в желудках крупных особей встречаются кусочки кожи пингвинов и тюленей.

Рыб отлавливали в январе – феврале 2012 г. в море Росса (статистический подрайон 88.1) на глубине от 690 до 1183 м с борта российского ярусолова «Янтарь-31» в соответствии с разрешением, выданным Российской Федерацией на лов рыб рода *Dissostichus*, и Мерами по сохранению морских живых ресурсов Антарктики.

Кровь брали из хвостовой артерии у неполовозрелых особей (10 экз.) средней массой 21.4 кг и длиной 114 см. Состав лейкоцитов определяли в мазках периферической крови и мазках-отпечатках почек и селезенки, окрашенных по Романовскому-Гимза. В каждом мазке определяли относительное количество основных типов клеток под тринокулярным световым микроскопом «Биомед-6ПР1-ФК», просчитывая по 200 клеток в каждом препарате.

Результаты исследований обработаны статистически при помощи стандартного пакета программ (приложение Statistica) с использованием *t*-теста,  $p < 0.05$ .

Состав лейкоцитов антарктического клыкача представлен такими же типами лейкоцитов, за исключением базофилов, как и у пресноводных видов рыб (Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989). В лейкоцитарной формуле основную долю составляют лимфоциты ( $84.8 \pm 2.13$ ), далее в порядке убывания следуют эозинофилы ( $6.0 \pm 1.29$ ), нейтрофилы ( $4.8 \pm 0.92$ ), бластные формы клеток ( $2.7 \pm 0.42$ ) и моноциты ( $1.7 \pm 0.33\%$ ). Сходный состав лейкоцитов имеют антарктическая ледяная



белокровка *Chaenocephalus aceratus* (Barber et al., 1981) и сарган *Belone belone* (Точилина, 1994).

У клыкача, как и у большинства представителей Perciformes (Балабанова, 2002), выявлены 2 типа гранулоцитов: нейтро- и эозинофилы. Морфология и размеры лимфоцитов ( $5.4 \times 5.0$  мкм), моноцитов ( $12.7 \times 10.0$  мкм) и бластных клеток ( $11.2 \times 9.0$  мкм) клыкача аналогичны таковым других видов рыб (Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989). Нейтрофилы ( $11.8 \times 9.1$  мкм) характеризуются эксцентрично расположенным округлым или двулопастным ядром и большим количеством хорошо видимых гранул, а эозинофилы ( $12.7 \times 11.8$  мкм) – округлым ядром с более крупными и более тёмно окрашенными, чем у нейтрофилов, гранулами.

Белая кровь антарктического клыкача имеет лимфоидный характер, т.е. среди лейкоцитов в норме доминируют лимфоциты (84.8%), которые у позвоночных считаются центральной фигурой иммунной системы (Петров, 1987; Хаитов и др., 2002; Галактионов, 2005). По характеру выполняемых функций, содержанию мембранных иммуноглобулиновых рецепторов, продолжительности жизни и гистогенезу лимфоциты гетерогенны и подразделяются на две основные субпопуляции: Т- и В-лимфоциты (Микряков, 1991; Ройт и др., 2000; Van Muiswinkel, Vervoorn-Van Der Wal, 2006). Т- лимфоциты осуществляют функции распознавания чужеродных тел, разрушения антигена, формирования специфического иммунитета и адаптации рыб к паразитам и токсическим факторам (Микряков, 1991; Микряков и др., 2001). Популяция В-лимфоцитов выполняет функцию синтеза антител, образования предшественников антителообразующих клеток и формирования клеток памяти. Относительное содержание зернистых лейкоцитов – нейтрофилов и эозинофилов – не велико (соответственно 4.8 и 6.0%). Они участвуют в фагоцитозе микроорганизмов, синтезе медиаторов иммунного ответа, неспецифических факторов иммунитета (Manning, Nakanishi, 1996; Галактионов, 2005). Кроме того в лейкоцитарной формуле выявлены юные незрелые, или бластные формы клеток – бласт-клетки (2.7%), которые у пресноводных видов могут составлять до 10%; их доля в лейкограмме зависит от видовых и

экологических особенностей рыб (Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989).

Следует отметить, что лейкоцитарный состав клыкача не отличается от большинства видов морских рыб. Так, Точилина (1994) при изучении лейкограмм 29 видов черноморских костистых рыб из отрядов Clupeiformes, Beloniformes, Gadiformes, Perciformes, Pleuronectiformes выделила всего 3 типа клеток – лимфоциты, нейтрофилы и моноциты. И только у трёх видов – *Boops boops* (Serranidae), *Crenilabrus tinca* (Labridae) и *Myctophum affinis* (Myctophidae) – были обнаружены 3 типа гранулоцитов: нейтро-, эозино- и базофилы. У всех изученных видов морских рыб, как и у пресноводных, процентное содержание лейкоцитов зависит от сезона года, места обитания, типа питания и других факторов.

Основной орган кроветворения у костистых рыб – почки, лимфогранулопозз осуществляется также в селезенке (Остроумова, 1957; Иванова, 1983; Catton, 1951; Ellis, 1977; Zapata, 1979), поэтому в мазках-отпечатках этих органов довольно значительную часть форменных элементов составляют бластные формы клеток крови ( $20.11 \pm 1.58$  в почках и  $27.8 \pm 2.24$  в селезенке). В почках и селезенке большую часть клеток, как и в периферической крови составляют лимфоциты ( $73.05 \pm 2.0$  и  $68.6 \pm 2.11$  соответственно), небольшое количество нейтрофилов ( $2.22 \pm 0.42$  и  $1.2 \pm 0.2$ ) и эозинофилов ( $2.72 \pm 0.52$  и  $1.4 \pm 0.4$ ).

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что лейкоциты периферической крови антарктического клыкача по морфофункциональным характеристикам гетерогенны и представлены разными по структуре клетками: лимфоцитами, моноцитами, нейтро- и эозинофилами и бласт-клетками. Анализ относительного содержания отдельных пулов клеток в лейкограмме показал, что белая кровь данного вида имеет лимфоидный характер. Обнаруженная эозинофилия, вероятно, обусловлена заражённостью изученных особей клыкача трематодами *Helicometra antarcticae* и нематодами *Anisakis* sp. и *Pseudoterranova* sp. Согласно существующим представлениям, повышение доли содержания эозинофилов в периферической крови в основном связано либо с реакцией на паразитарную

инвазию, либо с содержанием в тканях рыб ксенобиотиков. Клыкач по соотношению форменных элементов в периферической крови и в органах гемопоэза не отличается от других костистых рыб – кровь клыкача имеет лимфоидный характер, в органах гемопоэза также преобладают лимфоциты. Гранулоциты у клыкача, как и у большинства рыб отряда окунеобразных, двух типов.

#### Список литературы

Балабанова Л.В. Влияние аммония и декальцинации среды на ультраструктуру гранулоцитов карпа *Cyprinus carpio* L. // Цитология. 1998. Т. 40. № 2/3. С. 144–146.

Балабанова Л.В. Ультраструктура гранулоцитов некоторых видов окунеобразных рыб // Биол. внутр. вод. 2002. № 1. С. 79–84.

Галактионов В.Г. Эволюционная иммунология: учебное пособие. М.: ИКЦ Академкнига, 2005. 408 с.

Головина Н.А., Тромбицкий И.Д. Гематология прудовых рыб. Кишинев: Штиинца, 1989. 156 с.

Грушко М.П., Ложниченко О.В., Федорова Н.Н. Гемопоэз у осетровых рыб. Астрахань: Триада, 2009. 190 с.

Житенева Л.Д., Полтавцева Т.Г., Рудницкая О.А. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб. Ростов н/Д.: Ростовск. книж. изд-во, 1989. 111 с.

Заварзин А.А. Основы частной цитологии и сравнительной гистологии многоклеточных животных. Л.: Наука, 1976. 411 с.

Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1983. 184 с.

Калашникова З.М. О классификации морфологических элементов крови рыб // Вопр. ихтиологии. 1976. Т. 16. Вып. 98. С. 510.

Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. 153 с.

Микряков В.Р., Балабанова Л.В. Клеточные основы иммунитета у рыб // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л.: Наука, 1979. С. 57–64.

Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. и др. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука, 2001. 126 с.

Остроумова И.Н. Показатели крови и кроветворение в онтогенезе рыб // Известия ГосНИОРХа. 1957. Т. 43. № 3. С. 69.

Петров А.Ф. Распределение и биологические характеристики двух видов клыкачей рода *Dissostichus* (сем. Nototheniidae) острова Бувэ // Вопр. ихтиологии. 2011. Т. 51. № 6. С. 848–853.

Петров Р.В. Иммунология. М.: Медицина, 1987. 416 с.

Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М.: Мир, 2000. 592 с.

- Серпунин Г.Г. Гематологические показатели адаптаций рыб: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Калининград: КГТУ, 2002. 49 с.
- Точилина Л.В. Лейкоцитарная формула морских рыб // Гидробиол. журн. 1994. Т. 30. № 3. С. 50–57.
- Флоренсов В.А., Пестова И.М. Очерки эволюционной иммуноморфологии. Иркутск: ИГУ, 1990. 244 с.
- Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. М.: Медицина, 2002. 536 с.
- Яхненко В.М. Морфологическая характеристика крови рыб озера Байкал. Новосибирск: Наука, 1984. 119 с.
- Barber D.L., Westermann J.E., White M.G. The blood cells of the Antarctic icefish *Chaenocephalus aceratus* Zönnberg: light and electron microscopic observations // J. Fish Biol. 1981. V. 19. № 1. P. 11–28.
- Catton W. Blood cell formation in certain teleost fishes // Blood. 1951. V.6. № 6.
- Ellis A.E. The leucocytes of fish: a review // Ibid. 1977. V. 11. № 5. P. 453–491.
- Manning M.J., Nakanishi T. The specific immune system: cellular defenses // The fish immune system: organism, pathogen and environment / Eds. Iwata G., Nakanishi T. London: Acad. Press. 1996. P. 160–206.
- Parish N., Wrathmell A., Hart S., Harris J. The leucocytes of the elasmobranch *Scyliorhinus vanicula* L. A morphological study // J. Fish. Biol. 1986. V. 28, № 5. P. 545–561.
- Secombes C.J. The nonspecific immune system: cellular defense // The fish immune system: organism, pathogen and environment / Eds. Iwama G., Nakanishi T. London: Acad. Press. 1996. P. 63–105.
- Van Muiswinkel W.B., Vervoorn-Van Der Wal B. The immune system of fish // Fish diseases and disorders. V. 1 / Ed. Woo P.T.K. U. K., Wallingford: CABI. 2006. P. 678–701.
- Yadov D.P., Banaijee V., Banaerjee M. Haematology of genus channa: leucocytes // Comp. Physiol. and Ecol. 1986. V. 11. № 4. P. 226–232.
- Zapata A. Ultrastructural study of the teleost fish kidney // Devel. And Comp. Immun. V/3. 1979. P. 55-65.

## НЕКОТОРЫЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И ИММУНОБИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ТРЕХ ВИДОВ ГОЛЬЦОВ ОЗЕРА КРОНОЦКОЕ (КАМЧАТКА)

И.И. Гордеев<sup>1</sup>, Д.В. Микряков<sup>2</sup>, Н.И. Силкина<sup>2</sup>, В.Р. Микряков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии г. Москва, ул. Верхняя Красносельская, д.17, Россия, e-mail: gordeev\_ilya@bk.ru

<sup>2</sup>Институт биологии внутренних вод РАН, Борок Ярославской обл., Россия, e-mail: daniil@ibiw.yaroslavl.ru

Озеро Кроноцкое – относительно молодой водоем, геологическая история которого насчитывает примерно 12-14 тысяч лет (Шанцер, Мелекесцев, 1967). Озеро расположено в юго-восточной части полуострова и изолировано от заходов проходных рыб системой порогов и водопадов в верхнем течении реки Кроноцкая. В водоеме обитают две формы жилой нерки (*Oncorhynchus nerka*) – кокани и представители как минимум трех видов (форм) гольцов – белый *Salvelinus albus* Glubokovsky, 1977, носатый *S. schmidtii* Viktorovsky, 1978 и длинноголовый *S. kronocius* Viktorovsky, 1978 (Атлас..., 2002). Согласно Сенчуковой с соавторами (2012) гольцы образуют в оз. Кроноцкое сложную популяционную структуру и представляют большой интерес для изучения процессов формообразования и механизмов микроэволюции. Данные проведенного генетического анализа свидетельствуют о том, что проходная форма мальмы является предковой по отношению к остальным озерным формам. При этом авторы делают заключение о том, что наиболее вероятно монофилетическое происхождение всех озерных форм от небольшой популяции, которая обитала в реке на момент образования озера. Данные формы отличаются друг от друга возрастной структурой, темпами роста и характером питания. (Атлас..., 2002). Наличие в одном озере нескольких близкородственных видов (форм) гольцов дает возможность провести сравнительные биологические исследования различных показателей.

Цель работы – сравнение некоторых морфометрических и иммунобиохимических показателей носатого, белого и длинноголового гольцов оз. Кроноцкое.

Материал для анализа отбирали у 45 половозрелых особей носатого, белого и длинноголового гольцов, отловленных в период с 27 июля по 15 августа 2011 года в центральной части оз. Кроноцкое и у истока реки Кроноцкая. Образцы периферической крови из хвостовой вены и иммунокомпетентных органов (почка, селезенка и печень) замораживались и до времени обработки хранились в жидком азоте.

Анализ иммунофизиологических и биохимических показателей осуществлялся по данным соматических индексов органов, содержанию неспецифических иммунных комплексов (ИК), интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и содержанию антиоксидантов в тканях.

Общий биологический анализ осуществляли общепринятыми методами (Правдин, 1966). Соматические индексы (печени, почки, селезенки) рассчитывали по процентному отношению исследуемого органа к массе рыбы по формуле:  $X = A/B \times 100$ , где  $X$  – индекс органа, %;  $A$  – масса органа, г;  $B$  – масса рыбы, г.

Содержание ИК устанавливали спектрофотометрически при длине волны 450 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 535 нм (Андреева и др., 1988). Содержание МДА вычисляли с учетом коэффициента молярной экстинкции МДА ( $1.56 \times 10^5 / \text{М см}$ ) и выражали в наномолях на 1 г ткани.

О состоянии процессов антиоксидантной защиты (АЗ) судили по кинетике окисления субстрата восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха по

общепринятой методике (Семенов, Ярош, 1985), адаптированной нами для рыб. Сущность метода заключается в том, что чем выше скорость окисления субстрата в присутствии биологического материала, тем ниже содержание антиоксидантов в тканях. Гомогенат получали путем растирания тканей с физиологическим раствором в соотношении 1:1. Константу ингибирования окисления субстрата (КОС), являющуюся показателем антиокислительной активности ткани, определяли относительно контроля по формуле:  $K_i = K_{\text{кон}} - K_{\text{оп}}/C$ , где  $K_{\text{кон}}$  и  $K_{\text{оп}}$  – константы скорости окисления субстрата соответственно в контроле и в опыте;  $C$  – концентрация биологического материала в кювете.

Статистическую обработку результатов исследования проводили по стандартным алгоритмам, реализованным в пакете программ (Statistica) с использованием t-теста ( $p < 0.05$ ).

Исследования показали, что гольцы, обитающие в оз. Кронцкое, различались по величине соматических индексов иммунокомпетентных органов, уровню ИК, МДА и содержанию антиоксидантов в тканях (табл. 1, 2).

Наибольший соматический индекс почек, богатых клетками лимфомиелоидной ткани, выполняющих смешанную функцию: лимфо- и миелопоэз, разрушение антигена, синтез антител и неспецифических факторов гуморального иммунитета (Кондратьева и др., 2001; Микряков и др., 2001; Zapata et al., 1996; Van Muiswinkel, Vervoorn-Van Der Wal, 2006), зафиксирован у белого гольца, а наименьший – у носатого. По показателю спеленосоматического индекса носатые и белые гольцы практически не отличались, но были достоверно ниже, чем у длинноголового. Известно, что селезенка по особенностям структурной организации и характеру выполняемой функции напоминает костный мозг высших позвоночных, состоит из красной пульпы, а имеющаяся белая пульпа, выполняющая функцию лимфопоэза, недостаточно развита и расположена в виде отдельных диффузных скоплений (Zapata et al., 1996; Микряков и др., 2001). Согласно современным представлениям, основной функцией данного органа является эритро- и тромбопоэз, затем – лимфопоэз, тогда как почки – лимфо- и миелопоэз (Zapata et al., 1996; Кондратьева и др., 2001; Микряков

и др., 2001). Показатель гепатосоматического индекса у белого гольца был достоверно выше, а у длинноголового – ниже в сравнении с другими видами.

Таблица 1. Морфометрические показатели

Вид	экз	средняя масса, г	средняя длина, мм	Индексы органов, %		
				почка	селезенка	печень
носатый	19	392,6±23,3	364,68±9,46	0,66±0,07	0,33±0,03	1,36±0,12
белый	16	656,2±78,7	402,18±22,29	1,02±0,13 <sup>a</sup>	0,30±0,03	1,73±0,12 <sup>a</sup>
длинно-головый	10	1511,0±123,5	563,50±13,10	0,75±0,43	0,82±0,35 <sup>ab</sup>	0,68±0,34 <sup>b</sup>

Примечание. Здесь и далее: <sup>a</sup> – данные, достоверно отличающиеся у длинноголового от носатого, <sup>b</sup> – достоверно отличающиеся у длинноголового от белого при  $p \geq 0.05$ .

Как известно, печень принимает активное участие в пищеварительных процессах, выработке ововителлина, обмене веществ, синтезе и деградации гликогена, белков, липидов, детоксикации и реализации иммунологических реакций в организме рыб (Балабанова, 1979; Микряков, 1991; Арцимович и др., 1992; Маянский, 1992; Новиков, 1999).

Анализ содержания ИК, МДА и КОС в плазме крови, почке, селезенке и печени гольцов выявил межтканевые и межвидовые различия данных показателей (табл. 2).

Исследуемые виды незначительно различались количественными характеристиками ИК в плазме крови и печени, однако этот показатель был достоверно выше в почке носатого и ниже в селезенке белого гольца. ИК – комплексы, состоящие из антигена, антител и связанных с ними компонентов системы комплемента, играют важную роль в процессах регуляции иммунных реакций, элиминации ксенобиотиков из организма и поддержании иммунофизиологического гомеостаза. Образование ИК, обусловленное снижением клиринговой функции клеток фагоцитирующей системы, происходит при насыщении организма чужеродными телами, в том числе аутоантигенами и инфекционными агентами (Микряков, 1991; Микряков и др., 2001; Логинов и др., 1999; Ройт и др., 2000). Избыток уровня ИК наблюдается при инфекционных, токсических и аутоиммунных болезнях, вызывая супрессию иммунных реакций, что является



причиной развития неконтролируемых патологических процессов (Ройт и др., 2000).

При исследовании содержания МДА наиболее высокие значения и существенные отклонения выявлены в почке, а в плазме крови этот показатель был наиболее низким и колебался в меньшей степени. Максимальные значения МДА в органах исследуемых рыб зафиксированы у белого гольца в почке и плазме крови и у длинноголового – в селезенке и печени.

Сравнение уровня КОС, характеризующего содержание антиоксидантов в исследуемых тканях, показало минимальные значения в плазме крови, а максимальные – в почке. У длинноголового гольца зафиксированы наиболее низкие значения данного показателя во всех исследуемых тканях.

Таблица 2. Иммуно-биохимические показатели.

показатель	вид	плазма крови	почка	селезенка	печень
ИК	нос.	4,12±0,03	8,23±0,09	3,47±0,01	6,11±0,02
	бел.	4,07±0,03	7,68±0,25 <sup>a</sup>	3,30±0,02 <sup>a</sup>	6,04±0,03
	длин.	4,07±0,02	6,61±0,22 <sup>a</sup>	3,55±0,30	6,22±0,00
МДА	нос.	5,03±0,08	12,05±0,06	5,34±0,06	8,17±0,02
	бел.	5,31±0,10	13,17±0,10 <sup>a</sup>	5,13±0,02 <sup>a</sup>	8,10±0,02
	длин.	5,14±0,28	10,65±0,38 <sup>ab</sup>	5,44±0,39	8,33±0,00 <sup>b</sup>
КОС	нос.	2,04±0,02	5,81±0,07	2,23±0,01	4,06±0,02
	бел.	1,97±0,02	6,02±0,17	2,13±0,01 <sup>a</sup>	3,96±0,02 <sup>a</sup>
	длин.	1,91±0,01 <sup>a</sup>	5,54±0,21	2,10±0,01 <sup>a</sup>	3,95±0,00

Анализ полученных данных выявил различия между показателями МДА и КОС в разных тканях и органах. Это говорит о зависимости происходящих окислительных процессов от особенностей структурно-функциональной организации исследуемых тканей и органов и, вероятно, зависят от уровня содержания клеток, интенсивно образующих активные формы кислорода (супероксидный и гидроксильный радикалы, синглетный кислород, пероксиды и многие другие соединения). В почках, богатых гранулоцитами, которые превосходят все другие типы лейкоцитов по способности нарабатывать активные формы кислорода, процессы ПОЛ происходят более интенсивно, чем в периферической крови, печени и селезенке с низкой долей содержания миелобластов, нейтрофилов и промиелоцитов.

Аналогичные результаты установлены на леще (Силкина и др., 2010).

Известно, что избыток активных форм кислорода становится причиной активации ПОЛ клеточных мембран, разрушения нуклеиновых кислот, белков, повреждения ДНК, митохондрий, разрушения полиненасыщенных жирных кислот клеточных мембран, пероксидации липидов и инактивации структур АЗ (Грубинко и др., 2001; Меньшикова и др., 2008; Winston, 1991; Rudneva, Kuzminova, 2011). Неконтролируемому нарастанию продуктов пероксидации липидов при воздействии стресс-факторов, препятствует многоуровневая система антиоксидантной защиты, состоящая из антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза) и низкомолекулярных антиоксидантных соединений (восстановленный глутатион,  $\beta$ -токоферол, фенольная форма коэнзима Q<sub>10</sub>,  $\beta$ -каротин, аскорбиновая кислота и др.) (Меньшикова и др., 2008; Winston, 1991). Антиоксидантной системе принадлежит важная роль в реализации адаптивных компенсаторных реакций в организме, поскольку компоненты этой системы участвуют в регуляции процессов метаболизма (Winston, 1991). Известно, что в каждом биологическом организме существует баланс окислительно-восстановительных процессов, а изменение соотношения между ПОЛ и активностью антиоксидантной защиты тканей считается одним из чувствительных индикаторов, отражающим влияние неблагоприятных стресс-факторов на метаболические процессы и состояние здоровья рыб. Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высоком уровне липидоперекислительных и антиокислительных процессов, происходящих в организме рыб этого семейства.

Таким образом, анализ полученных данных показал наличие, как сходства, так и некоторые отличия в уровнях исследуемых показателей у гольцов из оз. Кроноцкое. Установленные различия в уровнях морфологических, иммунологических и биохимических показателей, по-видимому, связаны с видовыми особенностями и образом жизни (Буторина и др., 2008). Полученные результаты не дают однозначного ответа

на вопрос о степени различия изучаемых видов (форм) гольцов, который неоднократно изучался различными авторами (Pavlov et al, 2013; Сенчукова и др., 2012; Senchukova et al, 2013), но могут быть использованы для мониторинга состояния популяции и сравнения с близкородственными видами.

Благодарности. Авторский коллектив выражает благодарность инспекторам Кроноцкого государственного природного биосферного заповедника и лично директору Шпиленку Тихону Игоревичу, а также Салтыковой Е.А. и Анисимовой Л.А. за помощь в сборе и транспортировке материала.

#### Список литературы

Андреева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. 1988. № 11. С. 41–43.

Атлас пресноводных рыб России. Под редакцией Ю.С. Решетникова. М.: Наука, 2002. Т. 1. 379 с.

Арцимович Н.Г., Настоящая Н.Н., Казанский Д.Б., Ломакин М.С. Печень как орган иммунобиологической системы гомеостаза // Успехи соврем. биологии. 1992. Т. 112. № 1. С. 88–99.

Балабанова Л.В. Судьба парентерально введенных бактерий в организме рыб // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л.: Наука, 1979. С. 88–104.

Бугорина Т.Е., Шедько М.Б., Горювая О.Ю. Экологические особенности гольцов рода *Salvelinus* озера Кроноцкого на Камчатке // Вопросы ихтиологии. 2008. Вып. 5. С. 652–667.

Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лабораторное дело. 1981. № 8. С. 493–496.

Грубинко В.В., Леус Ю.В., Арсан О.М. 2001. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у рыб (обзор) // Гидробиол. журн. Т.37, № 1. С.64–78.

Кондратьева И.А., Киташова А.А., Ланге М.А. Современные представления об иммунной системе рыб // Вест. Моск. ун-та. сер. 16. Биология. 2001. № 4. С. 11–20.

Логинов С.И., Смирнов П.Н., Трунов А.Н. Иммунные комплексы у животных и человека: норма и патология. РАСХН. Сиб. Отд-ние. ИЭВСИДВ.: Новосибирск. 1999. 144 с.

Маянский А.Н. Иммунологические свойства синусоидных клеток печени // Успехи соврем. биологии. 1992. Т. 112. № 1. С. 52–61.

Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА. 2008. 284 с.

Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН. 1991. 154 с.

Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. и др. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука. 2001. 126 с.

Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных). М.: Пищевая пром-сть, 1966. 376 с.

Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. 2000. М.: Мир. 592 с.

Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Укр. биохим. журн. 1985. Т. 57, № 3. С. 50–52.

Сенчукова А.С., Павлов С.Д., Мельникова С.Д., Мюге Н.С. 2012. Генетическая дифференциация гольцов (род *Salvelinus*) из озера Кроноцкое на основе анализа митохондриальной ДНК. // Вопросы ихтиологии, Т. 52(4), с. 489–499.

Силкина Н.И., Микряков В.Р., Микряков Д.В. Особенности липидного обмена леща *Abramis brama*, обитающего в реках Южного Урала // Экология. 2010. № 6. С. 472-474.

Шанцер А.Е., Мелекесцев И.В. 1967. Особенности древней и новейшей тектоники района Кроноцкого озера, состав и строение слагающих его молодых вулканогенных толщ. Петропавловск-Камчатский: Архив ИВ АН СССР ДВНЦ. № 37. 12 с.

Pavlov S.D., Kuzishchin K.V., Gruzdeva M.A., Senchukova A.L., Pivovarov E.A. (2013). Phenetic diversity and spatial structure of chars ( *Salvelinus* ) of Kronotskaya lake-river system (eastern Kamchatka) // Journal of Ichthyology. Vol. 53(6). 645–670.

Rudneva I.I., Kuzminova N.S. Effect of chronic pollution on hepatic antioxidant system of Black Sea fish species // Int. J. of Sci. and Nature. 2011. 2, № 2. P. 279–286.

Senchukova, a.L., Muge, N.S., Pavlov, S.D., & Mel'nikova, M.N. On the origin of charrs of the genus *Salvelinus* of the Kronotskoe Lake and their relationships with other charr populations of the Kamchatka peninsula // Journal of Ichthyology. 2013. Vol. 53(6), p. 840–848.

Van Muiswinkel W., Vervoorn-Van Der Wal B. The immune system of fish // Fish diseases and disorders. 2006. V. 1. P. 678-701.

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

Zapata A.G., Chiba A., Varas A. Cells and tissues of the immune system of fish. London. Acad. Press. 1996. P. 1-62.

### **SOME MORPHOMETRIC AND IMMUNOBIOCHEMICAL INDICES OF THREE SPECIES OF CHARR FROM THE KRONOTSKY LAKE (KAMCHATKA PENINSULA)**

Gordeev I.I., Mikryakov D.V., Silkina N.I., Mikryakov V.R.

Specimens of three species of char caught in the Kronotsky Lake – *Salvelinus albus*, *S. schmidtii* и *S. kronocius* were studied for morphometric characteristics, innate immunity index and oxidation processes in blood plasma, liver, mesonephric kidney and spleen. It was found that charrs inhabit the same lake have both features of similarity of studied indices and differences caused possibly by species peculiarities and way of life.

# РАЗЛИЧНАЯ ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ ЛЕКТИНОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ФАГОЦИТОВ ДВУХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ РАНЫ У ГОЛОТУРИИ *EUPENTACTA FRAUDATRIX*

Л.С. Долматова<sup>1</sup>, И.Ю. Долматов<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>*Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичева  
ДВО РАН, Владивосток, Россия*

<sup>2</sup>*Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН,  
Владивосток, Россия*

<sup>3</sup>*Дальневосточный федеральный университет, Владивосток,  
Россия, e-mail: dolmatova@poi.dvo.ru*

Способность голотурий (*Echinodermata, Holothuroidea*) в течение жизни сохранять способность к регенерации частей тела и простота строения делают их перспективной моделью для изучения механизмов репарации (Долматов, Машанов, 2007). Исследования на позвоночных показали, что при заживлении ран большое значение имеет иммунная система (Bukovsky et al., 2009). Моноцитам принадлежит ведущая роль в этих процессах, при этом разные субпопуляции макрофагов/моноцитов вовлечены на разных стадиях воспаления и репарации (Wang et al., 2014). У эхинодерм также описано участие фагоцитов в заживлении ран (Hernroth et al., 2010; Долматова, Уланова, 2014), однако участие отдельных субпопуляций в этом процессе не исследовано. У голотурий *Eupentacta fraudatrix* на основе градиентного центрифугирования выделены две субпопуляции фагоцитов (Ф1 и Ф2), обладающие некоторыми функциональными отличиями (Долматова и др., 2004), кроме того, они обладают различным уровнем связывания растительного лектина конканавалина А (кон А) (Долматова, Долматов, 2004). Поскольку эндогенные лектины животных участвуют в регуляции многих внутриклеточных процессов, а также взаимодействия клеток (Харченко и др., 2009), при этом они весьма чувствительны к изменениям в структуре клеточных рецепторов, можно ожидать, что изучение изменений в связывании лектинов в процессе заживления ран может быть

полезным для оценки участия каждой субпопуляции фагоцитов голотурий в процессах заживления ран.

Ранее было показано также, что экстракт из тканей голотурий (ЭГ), обладающий высокой антиоксидантной активностью (Долматова и др., 2007), значительно ускоряет заживление поверхностных ран у голотурий (Долматова, Уланова, 2014). В связи с этим представляло интерес выяснение антиоксидантных механизмов влияния экстракта на заживление ран.

Целью работы явилось исследование уровня связывания растительных лектинов кон А и лектина из луковиц гиацинта *Dolichos biflorus* (DB) с поверхностными рецепторами двух субпопуляций фагоцитов голотурии при заживлении резаной раны стенки тела, а также влияния на процесс связывания лектинов экстракта из голотурий в присутствии и в отсутствие коммерческого препарата каталазы.

Голотурии были собраны в марте 2014 г на станции «Восток» Института биологии моря ДВО РАН в заливе Восток Японского моря. До начала экспериментов животные находились в аквариумах с проточной аэрируемой морской водой с соответствующей сезону температурой не менее двух недель.

Экстракт из голотурий получали по методу, описанному ранее (Долматова и др., 2007).

Повреждение стенки тела производили скальпелем, в другом ее участке в целомическую полость вводили буферный раствор (1 группа) или раствор ЭГ 8 мкг/мл (2 группа). Третьей группе животных вводили ЭГ вместе с раствором коммерческой каталазы (20 мкг/г). Измеряли длину раны и отбирали целомическую жидкость сразу после надреза и через 4 сут.

Полученную целомическую жидкость добавляли к равному объему антикоагулирующего раствора (Chia, Xing, 1996). Разделение фагоцитов двух субпопуляций проводили в ступенчатом градиенте фиколл-верографина, как описано ранее (Долматова и др., 2004).

Определение уровня связывания поверхностных рецепторов клеток с FITC (флюоросцеин изотиоцианат) - конъюгированным конканавалином А (con A) или лектином из луковиц гиацинта

*Dolichos biflorus* (DB) проводили по методу McKenzie и Preston (1992). Детекцию ярко-зеленой флуоресценции клеток проводили на флуоресцентном микроскопе Leica DM 4500.

Результаты обрабатывали статистически. Данные представлены в виде  $M \pm m$ . Для определения достоверности различий между группами использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при  $P < 0,05$ .

Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1. Уровень связывания FITC-меченых растительных лектинов с поверхностными рецепторами субпопуляций фагоцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix* через 4 сут после повреждения стенки тела.

Лектин	Экспериментальное воздействие							
	Контроль		Надрез		Надрез+ЭГ		Надрез+ЭГ+каталаза	
	Ф1	Ф2	Ф1	Ф2	Ф1	Ф2	Ф1	Ф2
DB	13,0±1,0	22,3±2,6	20±2,5	31,0±4,7	41±3,5*	-	6,0±0,8*	-
Con A	75,0±4,3	18±2,1	16±1,8*	24±1,9	5,1±0,28*	-	-	-

Фагоциты двух субпопуляций различались по уровню связывания соn A, в Ф1 он был почти в 4 раза выше, чем в Ф2. В отличие от насекомых, рецепторы иммуноцитов которых не связывают соn A (McKenzie, Preston, 1992), у голотурий фагоциты первого типа связывают его в значительном количестве, подобно таковым позвоночных. Вместе с тем, значительно более низкий процент связывания в Ф2 свидетельствует о том, что фагоциты двух субпопуляций фенотипически различимы. Ранение животного приводило к значительному снижению уровня связывания соn A в Ф1, в 4,7 раза, а в Ф2 происходил его рост в 1,3 раза (статистически недостоверно). Это показывает, что разница между субпопуляциями имеется также при заживлении раны-ответ в двух типах клеток был противоположным. Кроме того, снижение уровня связывания FITC-меченого соn A, по-видимому, означает рост числа конкурирующих эндогенных лектинов, связывающихся с маннозным остатком рецептора. Использование ЭГ, который значительно ускоряет заживление раны через 4 сут (Долматова, Уланова, 2014), вызывало еще большее снижение связывания FITC-меченого соn A. Эти данные согласуются с ранее полученными результатами об участии маннан-связывающего лектина в процессах регенерации

голотурии *Apostichopus japonicus* и повышении его концентрации в регенерирующих тканях ([Bulgakov et al., 2007](#)).

Связывание DB в Ф1 было незначительно меньше, чем в Ф2. Повреждение стенки тела вызывало рост уровня связывания в обеих субпопуляциях фагоцитов, в 1,5 раза в Ф1 и 1,4 раза в Ф2. Таким образом, поверхностные рецепторы к этому лектину не являются отличительными маркерами двух субпопуляций фагоцитов как в контроле, так и в процессе заживления раны.

Введение голотуриям ЭГ усиливало влияние повреждения на уровень связывания соn A и DB в Ф1. Такое повышение может быть связано как с экспрессией генов рецепторов, так и с возможными изменениями на уровне самих рецепторов. Применение ЭГ совместно с каталазой отменяло эффект ЭГ и даже снижало процент связывания DB по сравнению с контролем. Это свидетельствует о том, что рост экспрессии рецепторов был опосредован действием активных форм кислорода, которые могли изменять структуру рецепторов. В свою очередь, повышение уровня кислородных радикалов под действием ЭГ может быть связано с увеличением функциональной активности Ф1. Стимулирующее действие ЭГ на макрофаги мышей было показано ранее (Долматова и др., 2012).

Таким образом, исследование связывания отдельными фракциями фагоцитов голотурий растительных лектинов позволяет выявить динамику их активности на определенном этапе заживления раны, открывая возможность моделирования макрофаго-зависимых механизмов заживления тканей *in vivo*, являющихся наименее изученными, на более простой модели фагоцитов голотурий. Кроме того, показано, что ЭГ, по-видимому, способен стимулировать связывание эндогенных лектинов, участвующих в заживлении раны, и стимулировать функциональную активность Ф1.

#### Список литературы

Долматов И.Ю., Машанов В.С. Регенерация у голотурий. Владивосток: Дальнаука. 2007. 208 с.

Долматова Л.С., Долматов И.Ю. Особенности экспрессии поверхностных маркеров различных фракций целоцитозов голотурии *Eupentasta fraudatrix* // Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии: Тез. докл. Региональной научной конференции. 16-18 ноября 2004, Владивосток. Владивосток: ДВО РАН. 2004. С. 30.



Долматова Л.С., Елисейкина М.Г., Ромашина В.В. Антиоксидантная ферментативная активность целомоцитов дальневосточной голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2004. Т. 40, № 2. С. 104-111.

Долматова Л.С., Заика О.А, Тимченко Н.Ф. Влияние экстракта из дальневосточных видов голотурий на оксидантно-антиоксидантный баланс и апоптоз в макрофагах мышей при экспериментальной псевдотуберкулезной инфекции // Тихоокеанский медицинский журнал. 2012. №1 (47). С. 53-56.

Долматова Л.С., Тимченко Н.Ф., Стасенко Н.Я. Характеристика состава и медико-биологические исследования комплекса биологически активных веществ из дальневосточных видов голотурий // Дальневосточные моря России. Книга 2. Исследование морской экологии и биоресурсов / под. ред. В.А. Акуличева и В.П. Челомина. М.: Наука. 2007. С. 684–694.

Долматова Л.С., Уланова О.А. Влияние экстракта из голотурий на скорость заживления раны поверхностного покрова и динамику концентрации целомоцитов в модельном эксперименте // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2014. № 3(57). С. 23-25.

Харченко С.В., Дорохова О.А., Шаповалова Е. Ю. Особенности распределения рецепторов лектинов в нормальном эмбриогенезе легких и почек крыс // Украинский медицинский альманах, 2009, Т. 12 , № 3. С. 185-188.

Bukovsky A., Caudle M.R., Carson R.J. et al. Immune physiology in tissue regeneration and aging, tumor growth, and regenerative medicine // Aging. 2009. Vol. 1 (2) . P. 157-181.

[Bulgakov A.A.](#), Eliseikina M.G., [Petrova I.Y.](#) et al. Molecular and biological characterization of a mannan-binding lectin from the holothurian *Apostichopus japonicus* // [Glycobiology](#). 2007. Vol. 17, no. 12. P. 1284-1298.

Chia F. and Xing J. Echinoderm coelomocytes // Zoological Studies. 1996. Vol. 35. P. 231-254.

McKenzie, A.N.J., Preston T.M. Functional studies on *Calliphora vomitoria* haemocyte subpopulations defined by lectin staining and density centrifugation // Develop. Comp. Immunology. 1992. Vol. 16, no 1. P. 19-30.

Hernroth B., Farahani F., Brunborg G. et al. Possibility of mixed progenitor cells in sea star arm regeneration // J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol. 2010. Vol. 314, no 6. P. 457-468.

Wang N., Liang H., [Zen K.](#) Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance // [Front. Immunol.](#) 2014. 5: 614.

## DIFFERENT DYNAMICS OF EXPRESSION OF THE RECEPTORS TO LECTINS ON THE SURFACE OF THE PHAGOCYTES OF TWO SUBPOPULATIONS DURING WOUND HEALING IN THE HOLOTHURIAN *EUPENTACTA FRAUDATRIX*

L.S. Dolmatova, I.Y.U. Dolmatov

The levels of binding FITC-labeled plant lectins concanavalin A (con A) and lectin from *Dolichos biflorus* (DB) to the phagocytes of two subpopulations (P1 and P2) of the holothurian *Eupentacta fraudatrix* as well as influence of the new extract from

holothurian tissue (ET) and commercially available catalase on lectin binding were studied in 4 days after body wall injuring. It was shown that con A but not DB binds to P1 and P2 in different manner that can be useful for evaluation of the role of each subpopulation in wound healing. Changes in the levels of both lectins after injuring were found in P1 but not in P2 and were more pronounced under ET treatment. This confirms participation of endogenous lectins and marks out the role of P1 in wound healing at this stage. Using catalase abolished effect of ET on DB binding to P1 that evidences relation of this process to the level of reactive oxygen substances and P1 functional activity.

## **ВЛИЯНИЕ ПЕСТИЦИДА РАУНДАП НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ КЛЕТОК ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНОВ ГОЛОВЕШКИ- РОТАНА *PERCOTTUS GLENII***

Е.А. Заботкина, В.К. Голованов, И.Л. Голованова

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

*Борок, Россия, e-mail: [zabel@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:zabel@ibiw.yaroslavl.ru)*

Раундап (Roundup) является одним из наиболее широко применяемых и производимых в мире гербицидов. В дозе 2–4 л/га он рекомендован для уничтожения однолетних и многолетних злаковых и двудольных сорняков на паровых полях и в посевах зерновых и бахчевых культур, картофеля, а также генно-модифицированных пшеницы, кукурузы, сахарной свеклы, сои и рапса. В дозе 8–10 л/га пестицид применяют для уничтожения растительности в оросительных каналах. Действующим веществом в составе пестицида является глифосат (N-(фосфонометил)-глицин,  $C_3H_8NO_5P$ ) – неселективный системный гербицид, который в России известен под торговыми названиями «Раундап», «Глифор», «Торнадо» и «Ураган». Период полураспада глифосата в почве от 30 до 90 сут, в воде 7–14 сут (Giesy et al., 2000).

Токсическое действие глифосата обусловлено ингибированием 5-еноилпирувил-шикимат-3-фосфат-синтазы растений, которая является компонентом ферментной системы шикиматного пути биосинтеза бензоидных ароматических соединений - предшественников трёх ароматических протеиногенных аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана), пара-аминобензоата, терпеноидных хинонов

(убихинона, пластохинона, филлохинона) и ряда других важных метаболитов (Ефремов, Быкова, 2004). Глифосат оккупирует в активном центре фермента место фосфоенолпирувата и блокирует его активность (Брежнев, 2004). Важно отметить, что животные получают эти аминокислоты с пищей, и потому не имеют ферментной системы шикиматного пути. Долгое время глифосат считали малотоксичным для животных гербицидом, что подтверждается его высокой полумлетальной дозой ( $LC_{50}$ ): более 5000 мг/кг веса при внутреннем употреблении в экспериментах на крысах, более 10000 мг/кг для мышей и 3530 мг/кг для коз (Брежнев, 2004). Для гидробионтов указанные дозы значительно ниже – для рыб 96 ч значения  $LC_{50}$  варьируют от 2 до 55 мг/л в зависимости от вида, стадии жизненного цикла и условий эксперимента (Giesy et al., 2000).

Международное агентство по изучению рака Всемирной организации здравоохранения в марте 2015 года, основываясь на эпидемиологических исследованиях и исследованиях на животных и клеточной ткани, обнародовало заключение, что глифосат является "возможным канцерогеном для человека" (категория опасности "2А"). Имеются свидетельства о его канцерогенности в отношении неходжкинской лимфомы человека, а также лабораторных крыс и мышей (Hardell, Eriksson, 1994; IARC Monograf, 2015).

У гидробионтов Раундап и его действующее вещество глифосат вызывают повреждение митохондрий в клетках жабр, печени, почек, и как следствие – нарушение процессов окислительного фосфорилирования, оксидативный стресс в тканях, гиалиновую дистрофию почек, повреждение генетического аппарата клеток, в том числе половых (Harayashiki et al., 2013; Moreno et al., 2014; Braz-Mota et al., 2015).

Головешка-ротан *Percocottus glenii* является видом-вселенцем для водоемов бассейна Верхней Волги. Его природный ареал расположен на Дальнем Востоке, в Китае и Северной Корее, в настоящее время он широко распространен в водоемах Северной Евразии. Ротан быстро адаптируется к действию природных и антропогенных факторов, угнетает популяции аборигенных видов рыб. По температурным характеристикам (окончательно

избираемой и верхней летальной температуре) ротан относится к наиболее теплолюбивым видам рыб, обитающих в пресных водоемах России (Голованов, 2013). Хроническое действие Раундапа в концентрации 2 мкг/л меняет терморегуляционное поведение и активность пищеварительных гликозидаз у ротана (Голованова и др., 2013). Однако действие Раундапа на структуру лейкоцитов иммунокомпетентных органов ротана-головешки ранее не исследовалось.

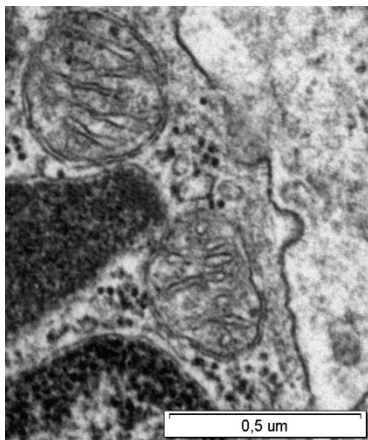
Цель работы – изучить хроническое действие гербицида Раундап в сублетальной концентрации на тонкую структуру клеток лимфо-миелоидной ткани иммунокомпетентных органов молоди головешки-ротана.

Исследованы сеголетки ротана, отловленные в одном из прудов Некоузского района Ярославской области. Рыб предварительно акклимировали к лабораторным условиям в течение 1 месяца в 200 л аквариумах с постоянной аэрацией, 12-ч периодом освещения, при температуре воды  $15.5 \pm 1.0$  °C. Масса рыб составила  $3.1 \pm 0.2$  г, длина тела –  $5.4 \pm 0.1$  см. Затем контрольную группу рыб (50 экз.) поместили в аквариум с чистой водой, а вторую опытную группу (50 экз.) – в аквариум с водой, содержащей Раундап в концентрации 2 мкг/л (2 ПДК). Смену воды в аквариумах проводили 2 раза в неделю без отсадки рыб. По истечении 30 суток у 6 экз. рыб из каждой группы были взяты пробы головного и туловищного отдела почек, селезенки и печени для электронно-микроскопического (ЭМ) исследования.

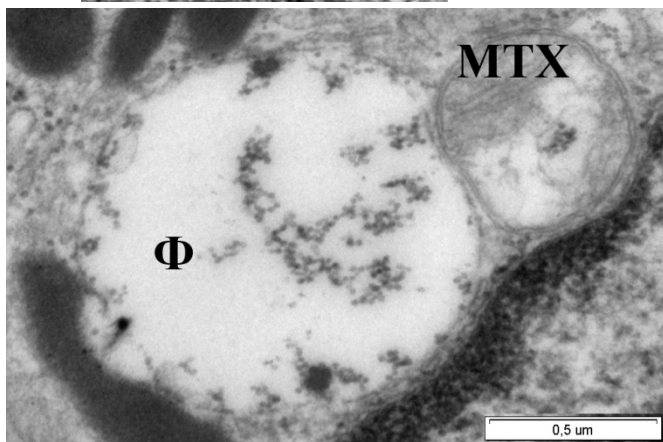
Для ЭМ исследований кусочки тканей фиксировали в 2.5% растворе глутарового диальдегида на фосфатном буфере (pH 7.2), затем постфиксировали 1% раствором тетраоксида осмия на том же буфере, обезживали в градиенте спиртов и заливали в смесь Аралдит-Эпон по стандартной методике (Миронов и др., 1994). Из полученных образцов на ультратоме Nova готовили ультратонкие срезы, которые контрастировали 1% водными растворами уранилацетата и цитрата свинца, а затем просматривали при помощи электронного микроскопа Jem 1011 при 80 kV.

Установлено, что при хроническом действии Раундапа клетки лимфомиелоидной ткани во всех исследованных органах имели сходные изменения. У ротана обнаружены следующие

типы лейкоцитов: агранулоциты (лимфоциты, плазматические клетки, макрофаги) и гранулоциты (нейтрофилы и эозинофилы). У всех типов лейкоцитов отмечено повреждение митохондрий: набухание органелл, просветление их матрикса и частичное растворение ламелл внутренней мембраны (Рис. 1а, б).



а



б

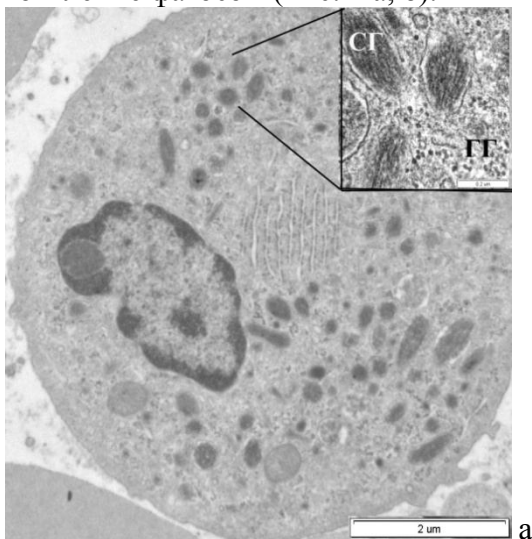
Рис. 1. Структура митохондрий лейкоцитов ротана в контроле (а) и после действия Раундапа (б). На рис. 1б хорошо заметна область с разрушенными ламеллами внутренней мембраны.

Выявленные изменения свидетельствуют о нарушении процессов окислительного фосфорилирования в клетках. Ранее подобные изменения митохондрий были отмечены в сперматоцитах гуппи *Poecilia vivipara* при действии Раундапа в концентрации 130 и 700 мкг/л при 96-часовой экспозиции

(Narayashiki et al., 2013). В культуре изолированных митохондрий гепатоцитов крыс Раундап ингибировал дыхательные процессы в митохондриях и окислительный потенциал мембран клеток более чем на 40% (Peixoto, 2005).

В группе опытных рыб среди агранулярных клеток отмечено также расширение каналов в плазматических клетках, что свидетельствует об усилении синтетической активности клеток. Так как основной функцией плазматических клеток считают синтез антител (Галактионов, 2005), по-видимому, Раундап опосредованно активизирует эти клетки.

Среди нейтрофилов почек и селезенки отмечено увеличение количества и изменение размеров специфичных гранул (появление крупных гранул) в нейтрофилах, накопление гранул гликогена в периферических областях цитоплазмы клеток и появление фагосом (Рис. 2 а, б).



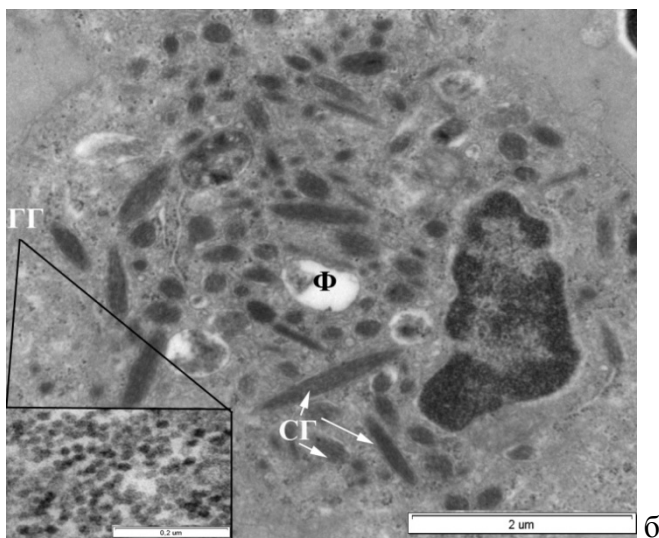


Рис. 2. Структура нейтрофилов ротана в контроле (а) и после экспозиции в Раундапе (б). Вставка на рис. 1а – специфичные гранулы (СГ) и редкие гранулы гликогена (ГГ), вставка на рис. 1б – скопление гранул гликогена в цитоплазме (ГГ). Ф – фагосома.

Изменение количества и размеров гранул нейтрофилов отмечали ранее при действии ряда токсикантов (Заботкина, Лапирова, 2004), а изменение содержания гликогена в нейтрофилах – при иммунизации карпов (Балабанова, Заботкина, 1988).

В эозинофилах у опытной группы рыб также отмечены изменение размеров и количества специфичных гранул и появление фагосом в клетках (Рис. 3 а, б).

Появление фагосом в цитоплазме гранулоцитов свидетельствует об активизации клеток, которая происходит при попадании в организм чужеродных веществ или частиц (Галактионов, 2005). Считают, что активность этого типа клеток изменяется при паразитарной инфекции организма, либо при аутоиммунных процессах, либо аллергической реакции (Галактионов, 2005). Вместе с тем, показано, что при действии глифосата или Раундапа усиливается активность антиоксидантных ферментов, в том числе в печени (Matviishyn et al., 2014).

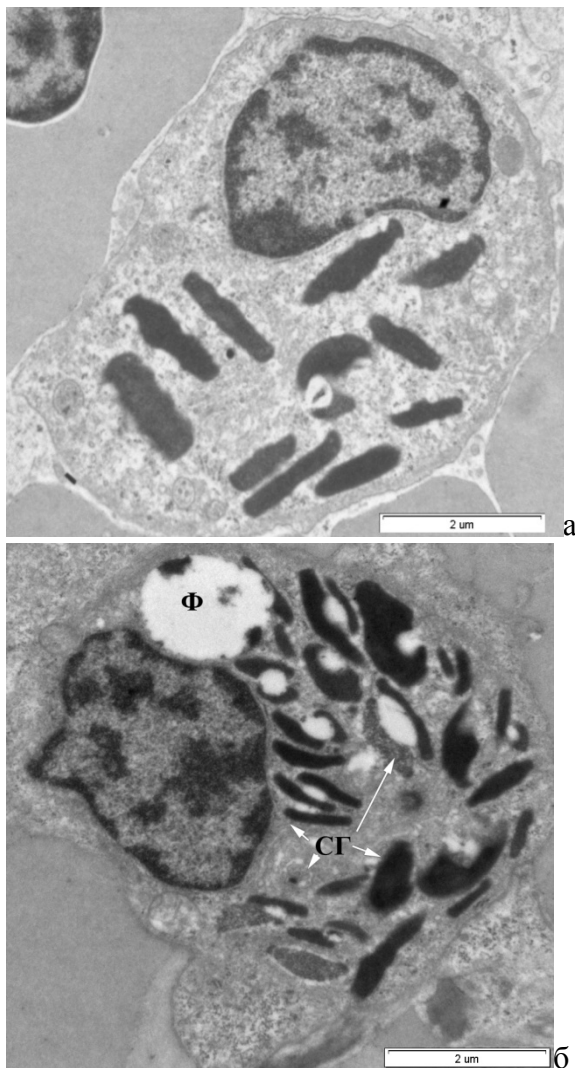


Рис. 3. Структура эозинофила ротана-головешки в контроле (а) и после экспозиции в Раундапе (б). СГ – специфичные гранулы, Φ – фагосома.

Таким образом, Раундап в сублетальной концентрации 2 мкг/л при хроническом действии повреждает структуру митохондрий, ингибируя в результате процессы окислительного фосфорилирования, стимулирует процессы фагоцитоза в организме, а учитывая активизацию плазматических клеток –



возможно, выступает провокатором аллергических реакций в организме.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. Ультраструктура клеток иммунной системы карпа *Cyprinus carpio* L. в норме и при иммунизации // Цитология. 1988. Т. 30. № 6. С. 657–661.

2. Брежнев В.И. Механизированный способ борьбы с сорной растительностью на открытых мелиоративных каналах гербицидом Раундап. Автореф. дисс. ... уч. степ. к.т.н. Новочеркасск, 2004. 24 с.

3. Галактионов В.Г. Эволюционная иммунология. М.: ИКЦ, 2005. 407 с.

4. Голованов В.К. Эколого-физиологические закономерности распределения и поведения пресноводных рыб в термоградиентных условиях // Вопр. ихтиологии. 2013. Т. 53. № 3. С. 286–314.

5. Голованова И.Л., Аминов А.И., Капшай Д.С., Голованов В.К. Физиолого-биохимические и температурные характеристики сеголетков ротана при хроническом действии Раундапа // Вестник АГТУ: Рыбное хозяйство. 2013. № 3. С. 98–104.

6. Ефремов И.В., Быкова Л.А. Разработка методики оценки влияния гербицидов на фотосинтетический аппарат растительных тканей // Вестник Оренбургского государственного университета. 2004. № 1. С. 126–129.

7. Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б. Влияние пестицидов на иммунофизиологическое состояние рыб // Успехи соврем. биологии. 2004. Т. 124, № 4. С. 361–368.

8. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб: Наука, 1994. 400 с.

9. Braz-Mota S., Sadauskas-Henrique H., Duarte R.M., Val A.L., Almeida-Val V.M.F. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum* // Chemosphere. 2015. V. 135. P. 53–60.

10. Giesy J.P., Dobson S., Solomon K.R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 2000. V. 167. P. 35–120.

11. Harayashiki C.A.Y., Varela J.A.S., de Souza M.A.A., da Costa L.C., Primeld E.G., Bianchinib A., Corcinie C.D. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water // Aquatic Toxicology. 2013. V. 142–143. P. 176–184.

12. Hardell L., Eriksson M. A Case-Control Study of Non-Hodgkin Lymphoma and Exposure to Pesticides // CANCER. 1999. Vol.85, No.6. P. 1353-1360.

13. IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization (March 20, 2015).

14. Matviishyn T.M., Kubrak O.I., Husak V.V., Storey K.B., Lushchak V.I. Tissue-specific induction of oxidative stress in goldfish by 2,4-

dichlorophenoxyacetic acid: Mild in brain and moderate in liver and kidney // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014. V. 37. I. 2. P. 861–869.

15. Moreno N.C., Sofia S.H., Martineza C.B.R. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus* // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014. V. 37, I. 1. P. 448-454.

16. Peixoto M. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation // *Chemosphere*. 2005. V. 61. I. 8. P. 1115-1122.

### **THE EFFECT OF A PESTICIDE ROUNDUP ON THE CELL ULTRASTRUCTURE OF IMMUNOCOMPETENT ORGANS OF AMUR SLEEPER *PERCOTTUS GLENII***

Zabotkina E.A., Golovanov V.K., Golovanova I.L.

The chronic effect of sublethal concentrations of the herbicide Roundup (2 mg/l) on the ultrastructure of kidney, spleen and liver cells of youngerling *Amur sleeper* were studied. It was shown that prolonged exposure to Roundup causes damage to the structure of mitochondria of all cells of the lymphomyeloid tissue, the appearance of phagosomes into granulocytes from kidney, spleen and liver, expanding channels of the rough endoplasmic reticulum of plasma cells in the kidney and spleen.

### **ДИНАМИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ В ПРОЦЕССЕ ОНТОГЕНЕЗА У РЫБ КРАСНОЯРСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА**

Г.В. Макарская<sup>1,2</sup>, С.В. Тарских<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Институт вычислительного моделирования СО РАН,*

*Красноярск, Россия, e-mail: [mgv@icm.krasn.ru](mailto:mgv@icm.krasn.ru)*

<sup>2</sup>*Международный научный центр исследований экстремальных состояний организма при Президиуме Красноярского научного центра СО РАН, Красноярск, Россия, e-mail: [tsv@akadem.ru](mailto:tsv@akadem.ru)*

Развитие организма в онтогенезе определяется формированием его тканеспецифических систем и их функциональных свойств, что отражается в устойчивости организма к разного рода воздействиям внешней среды в определенные возрастные периоды. Особую роль в адаптационной устойчивости рыб играет система гемоиммуногенеза, гомеостатические свойства которой определяются интеграционной слаженностью функционирования

гуморальных и клеточных факторов, в том числе и системы неспецифической резистентности (Микряков, 1991; Кондратьева, Киташова, 2001; Руднева, 2003). Одним из механизмов, обеспечивающих неспецифическую резистентность организма, является способность лейкоцитарных клеток продуцировать активные формы кислорода (АФК) в процессе своего функционирования, наиболее выраженная в состоянии антигенной активации (Бахов и др., 2000; Владимиров, Проскурина, 2009). Кинетика процесса генерации АФК в ответ на антигенное внедрение *in vitro*, регистрируемая хемилюминесцентным методом в нефракционированной крови, характеризует физиологически обусловленные потенциальные возможности реакции системы неспецифической резистентности на чужеродные агенты и отражает не только активность функционирования каскадно включающихся про- и антиоксидантных ферментов клеточных мембран фагоцитирующих клеток, но и всей совокупности про- и антиоксидантных факторов периферической крови (Руднева, 2003; Владимиров, Проскурина, 2009; Magrisso et al., 2000). Выявленные многолетними наблюдениями закономерности изменения кислородного метаболизма клеток крови рыб позволяют использовать информативность хемилюминесцентного метода оценки иммунного статуса рыб в мониторинге ихтиоценозов и водных экосистем (Гордеева, Лабас, 2003; Макарская и др., 2011; Lushchak, 2011).

Цель работы – изучение возрастных (постэмбриональный – взрослый период) изменений функциональной активности клеток неспецифической резистентности разных видов рыб Красноярского водохранилища в летний период.

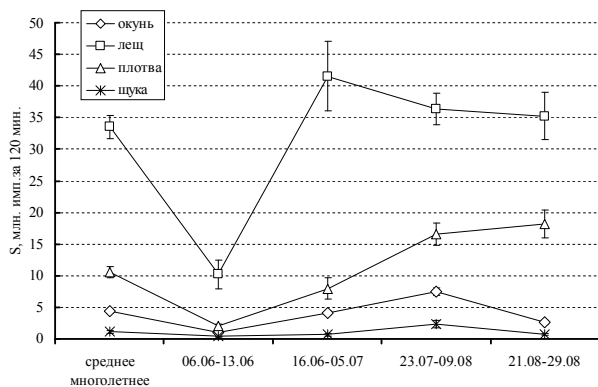
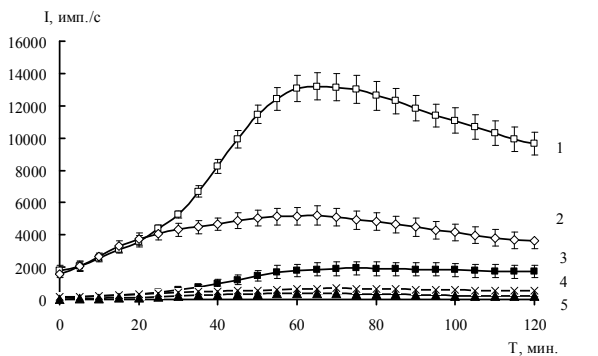
Исследование биологических компонентов рыб (*Rutilus rutilus* L., *Abramis brama* L., *Perca fluviatilis* и щука - *Esox lucius*), обитающих в средней части Красноярского водохранилища, проводилось в летние сезоны 2000–2012 гг., включающие период нереста и посленерестового нагула. Пробы крови получали из кровяных сосудов жабр путем их рассечения. Состояние системы гемоиммуногенеза рыб оценивали гематологическими методами (содержание гемоглобина, численность эритроцитов и

лейкоцитов) (Иванова, 1982) и по кинетике генерации активных форм кислорода (АФК) клетками крови при антигенной стимуляции *in vitro* частицами монодисперсного латекса (ФГУП Научно-исследовательский институт синтетического каучука им. С.В. Лебедева, С-Петербург), регистрируемой методом люминолуциленированной хемилюминесценции с использованием 36-канального аппаратурно-программного комплекса “Хемилюминометр CL-3604 – ПЭВМ” (СКТБ «Наука», Красноярск) (Макарская, Тарских, 2011). Хемилюминесцентная кинетика генерации АФК при респираторном взрыве в суспензии клеток крови в ответ на введение антигена представляет собой куполообразную кривую, характеризующуюся параметрами:  $I_{\max}$  (имп/с) – амплитуда максимальной активности хемилюминесцентной реакции,  $T_{\max}$  (мин) – время достижения максимума и  $S$  (имп) – площадь под кривой хемилюминесценции за 120 мин, определяющая общее количество АФК, генерируемых клетками за время записи хемилюминесцентной кривой.

В Красноярском водохранилище доминирующее положение занимают рыбы семейства окуневых – *Perca fluviatilis*, и семейства карповых – *Abramis brama* L. и *Rutilus rutilus* L. (Вышегородцев и др., 2005). Средний участок водохранилища характеризуется в последнее десятилетие сезонно стабильным органо-минеральным режимом, видовым составом и биомассой фито-, бактерио- и зоопланктона. А вот вклад различных видов рыб в ихтиоценоз этой части водохранилища заметно изменяется с увеличением доли окуневых.

При наличии межвидовых особенностей продукции АФК в крови при антигенной активации *in vitro* (рис. 1А) у рыб в Красноярском водохранилище выявлена слабо выраженная межгодовая динамика кислородного метаболизма клеток крови.

Общий объем продукции АФК ( $S$ , млн. имп/120 мин) у леща изменялся от  $10.22 \pm 2.31$  до  $41.55 \pm 5.45$ , плотвы от  $1.89 \pm 0.39$  до  $18.2 \pm 2.26$ , окуня от  $1.02 \pm 0.14$  до  $7.51 \pm 0.59$ . Более выраженной является внутрисезонная ежегодно повторяющаяся динамика продукции АФК антигенактивированными клетками, характерная для всех обследованных видов рыб (рис. 1Б).



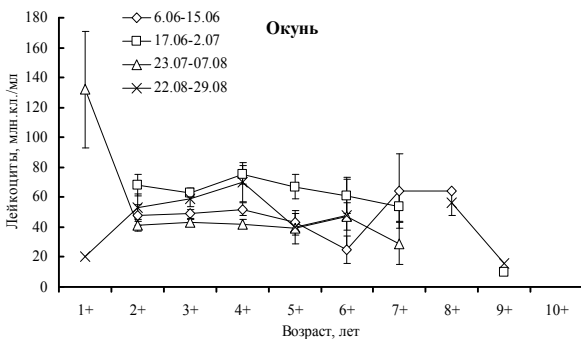
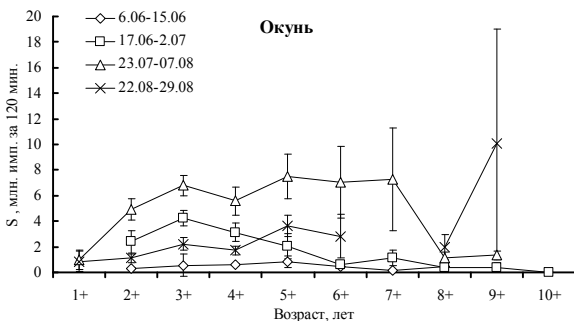
А)

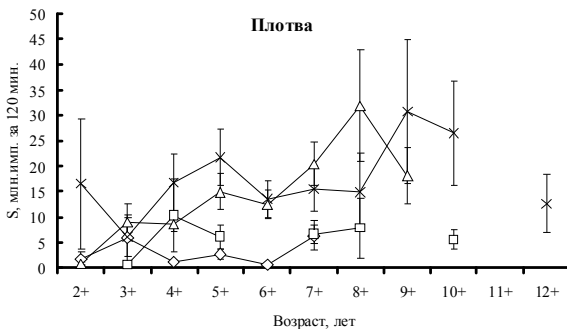
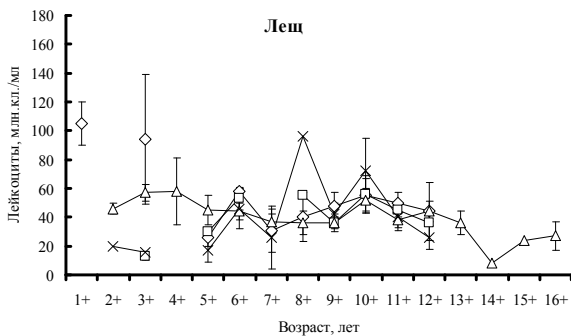
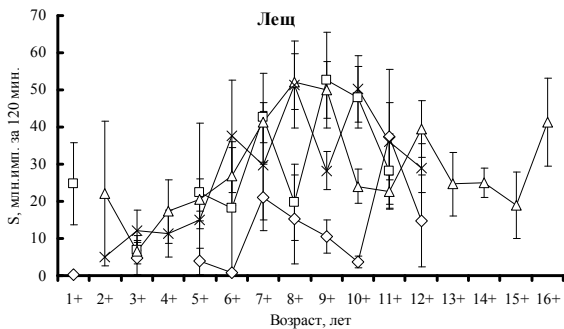
Б)

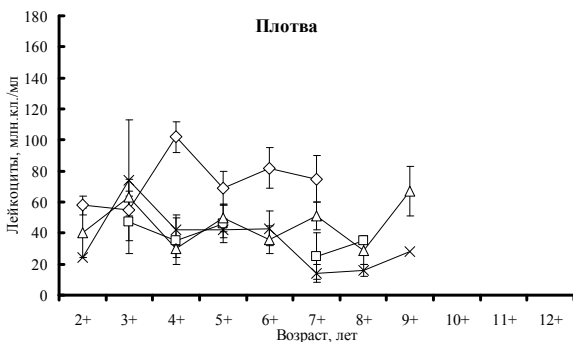
Рис.1. Кинетика (А) генерации АФК антигенактивированными *in vitro* клетками цельной крови рыб средней части Красноярского водохранилища и динамика (Б) ее параметра S в летний период. 1 – лещ; 2 – плотва; 3 – елец; 4 – окунь; 5 – щука.

Ее особенностью является достоверно ( $P < 0.01$  при расчетных значениях критерия Стьюдента 3.25–10.70 против табличных 2.01–1.96) низкий уровень продукции АФК клетками крови в первой половине июня, совпадающий с наиболее низким температурным периодом летнего сезона и периодом нереста. Аналогичное снижение защитных показателей иммунитета в период нереста, а именно бактерицидной активности сыворотки крови, отмечается и у других видов рыб (Микряков, 1978), что является одной из наиважнейших причин подверженности рыб в этот период заражению. В конце июня – начале июля в период завершения нереста наблюдалось 2–3-кратное увеличение продукции АФК, у плотвы и окуня приближающееся к уровню

среднего многолетнего значения (соответственно  $10.5 \pm 0.9$  и  $4.4 \pm 0.3$ ), у леща превышая его ( $34.1 \pm 1.9$ ). Увеличение продолжалось в течение июля, у плотвы – и августа, с характерным сокращением времени достижения максимума хемилюминесцентной кривой у карповых рыб к концу лета, что свидетельствует об увеличении активности прооксидантных факторов клеток крови. Выявленные закономерности изменения функциональной активности клеток в летний период характерны для всех возрастных категорий исследованных видов рыб (рис. 2), кроме первого года жизни. Однако, первые 3 года у окуня, 5 лет у плотвы и 8 лет у леща отмечался ежегодный прирост объема продукции АФК в ответ на антигенную стимуляцию с последующей стабилизацией в середине июля – начале августа на одном уровне у окуня и плотвы на протяжении 4 лет, у леща – 2-х лет и снижением в более зрелом возрасте (рис. 2А). При этом в этот же период лета численность лейкоцитов была минимальной у окуня, средней у плотвы и леща в продолжение летнего сезона (рис. 2Б).







А)

Б)

Рис.2. Возрастная динамика общего (А) объема генерации АФК клетками периферической крови рыб при антигенной активации *in vitro* и численности лейкоцитов (Б) в различные временные периоды летнего сезона.

Компонентный анализ (Magrisso et al, 2000) возрастных изменений кинетики генерации АФК у особей окуня (рис. 3) показал, что от 5,3 до 9% и от 22 до 51% АФК генерируется в результате внеклеточного и внутриклеточного этапов фагоцитарного процесса соответственно, при этом объем первых возрастает на протяжении 5 лет, а затем колеблется. Объем внутриклеточной генерации снижается в течение 3 лет, затем колеблется. Не связанная с фагоцитозом внутриклеточная продукция АФК на протяжении 3-х лет возрастает, затем снижается. У особей старше 6 лет доминирует фагоцитозсвязанная продукция АФК.

Для особей плотвы характерно увеличение с возрастом внеклеточной фагоцитоззависимой продукции АФК на протяжении 6 лет с последующим снижением, но объем третьей компоненты, за исключением возраста 5+, доминировал.

Таким образом, у рыб Красноярского водохранилища, начиная с возраста 2+, в летний период проявляется закономерная динамика величины объема и максимальной интенсивности продукции АФК клетками периферической крови при антигенной активации *in vitro* от минимальных в период нереста, до максимальных в период нагула.



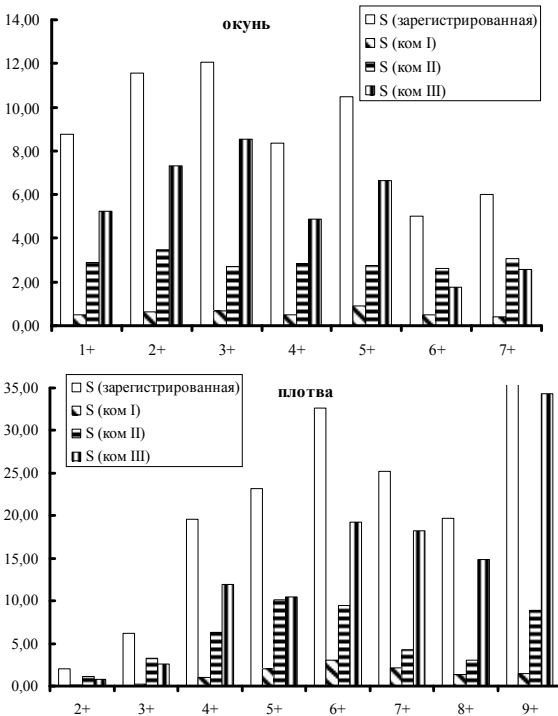


Рис.3. Возрастная динамика общего объема (S) генерации АФК клетками периферической крови рыб при антигенной активации *in vitro* и его компонентных составляющих по Magrisso (Magrisso et al, 2000).

Первые 3 года жизни у окуня, 6 лет у плотвы и 8 лет у леща характеризуются увеличением активности продукции АФК, при этом распределение объема продукции АФК, непосредственно связанного с фагоцитозом, специфично для каждого вида и изменяется по мере взросления особей.

#### Список литературы

1. Бахов Н.И., Майчук Ю.Ф., Корнев А.В. Механизмы защиты организма от вирусных инфекций: нейтрофильные лейкоциты //Успехи современной биологии. 2000. Т.130, № 1. С. 23-35.
2. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция //Успехи биологической химии. 2009. Т. 49. С. 341-388.
3. Вышегородцев А.А., Космаков И.В., Ануфриева Т.А., Кузнецова О.А. Красноярское водохранилище. Новосибирск: Наука, 2005. 212 с.
4. Гордеева А.В., Лабас Ю.А. Генерация активных форм кислорода наружными поверхностями водных организмов // Цитология. 2003. 45 (3). С. 284-289.
5. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб (сравнительная морфология и

классификация форменных элементов крови рыб). М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. 184 с.

6. Кондратьева И.А., Киташова А.А. Современные представления об иммунной системе рыб // Иммунология. 2002. № 2. С. 97-101.

7. Макарская Г.В., Тарских С.В. Особенности функциональной активности клеток периферической крови рыб средней части Красноярского водохранилища в летний период // Гидробиологический журнал. 2011. Т. 47, № 5. С. 88-95.

8. Микряков В.Р. Актуальные вопросы иммунологии рыб // Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ Л.: Наука, 1978. С. 116-133.

9. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. 154 с.

10. Руднева И.И. Эколого-физиологические особенности антиоксидантной системы рыб и процессов перекисного окисления липидов // Успехи совр. биологии. 2003. Т. 123, № 4. С. 391-400.

11. Lushchak V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals // Aquatic Toxicology. 2011. Vol. 101. P. 13-30.

12. Magrisso M.Y., Aleksandrova M.L., Markova V.I., Bechev B.G., Bochev P.G. Functional states of polymorphonuclear leucocytes determined by chemiluminescent analysis // Luminescence. 2000. V.15. P. 143-151.

13. Stasiak S.A., Baumann P.C. Neutrophilic activity as a potential bioindicator for contaminant analysis // Fish & Shellfish Immunology. 1996. Vol. 6. P. 537-539.

## **DYNAMICS OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF NONSPECIFIC RESISTENCY CELLS OF FISHS OF KRASNOYARSK RESERVOIR DURING ONTOGENESIS**

G.V. Makarskaya, S.V.Tarskikh

The age-specific dynamics of functional activity of fish blood cells, estimated by kinetics of ROS generation by antigene-activated immunocompetent cells in system of whole blood at all surveyed kinds of the fishes is characterized. The intensity and volume of ROS generation of blood cells are changing with increase in age and the maximum of reaction is displaced to more later time, that probably testifies about decreasing of activity of pro- and antioxydant enzymes of cells and factors of a cellular environment. The first 3 years of a life at the perch, 6 years at the roach and 8 years at the bream are characterized increase in activity of production ROS, thus distribution of volume of production ROS directly connected with phagocytosis, is specific to each kind and changes in process of aging of individuals.

## ДИНАМИКА БАСК В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ГОДОВОГО ЦИКЛА РЫБ

В.Р. Микряков, Н.И. Силкина, Д.В. Микряков, Н.В. Елизарова  
 Институт биологии внутренних вод РАН, Борок Ярославской обл., Россия, e-mail: [mvr@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:mvr@ibiw.yaroslavl.ru)

Годовой цикл рыб состоит из ряда периодов: преднерестового, нереста, посленерестового, нагульного, зимовальной миграции, зимовки, нерестовой миграции, преднерестового нагула (Никольский, 1974). Ранее на примере плотвы было показано, что устойчивость рыб к бактериальной инфекции в разные периоды года отличается (Микряков, 1978). В нерестовой период май, июнь 100% гибель плотвы отмечена после заражения их бактериями *Aeromonas punctata* шт. 111 в дозе 10 млн. микробных тел на 1.0 г. живого веса, тогда как в конце нагульного периода, в августе - в дозе 100 млн. Минимальная устойчивость к возбудителям аэромоназа рыб (Schaperclaus, 1979) выявлена на примере леща, синца и окуня 7 отнерестившихся особей, по сравнению с таковыми в конце нагула. Сходные результаты нами получены при исследовании динамики изменения БАСК (с 1972 по 1977 гг.) в различные периоды годового цикла леща Волжского плеса (табл., рис.).

Таблица. Распределение леща по классам БАСК в различные периоды годового цикла, %.

Период	n	БАСК	Классы				
		M+m	1	2	3	4	5
преднерестовый	30	51±7.0	5±2.1	7±2.9	27±5.6	47±3.8	15±2.1
нерестовый	35	46±12.3	18±3.0	10±2.8	15±1.9	22±1.8	35±3.8
посленерестовый	49	33±7.1	30±7.2 <sup>x</sup>	5±1.9	20±2.8	26±4.6	19±2.3
нагульный	100	70±8.1	9±7.6	4±2.2	8±2.4	23±3.1	58±6.7
зимовка	33	63±7.2	7±2.0	6±1.3	12±3.2	33±2.4	42±3.8

Примечание: <sup>x</sup> – число ИМД в отдельные годы может колебаться от 6 до 66%. (Микряков, 1978, 1984).

Из представленных данных видно, что низкие величины БАСК выявлены у отнерестившихся особей (33%), а высокие – у лещей с III-IV стадией готовности половых продуктов (70 и 64%). Колебание активности БАСК в течение года происходит за счет

изменения доли рыб, имеющих высокие и низкие показатели иммунитета. В преднерестовый период показатели иммунитета по сравнению с зимним периодом претерпевают значительные сдвиги. Прежде всего, это происходит за счет снижения до 15% доли рыб относящихся к 5-му классу против 40% в зимний период. Одновременно с этим повышается доля рыб 3 и 4 классов. Величины 1 и 2 классов в этот период не меняются.

Нерестовый период является переломным в жизненном цикле рыб, требующий огромных энергетических затрат, активации катаболических и снижения анаболических процессов. В обменные процессы включаются структурные фракции липидов (фосфолипидов), нарастают показатели содержания холестерина, а альбумина, гликогена,  $\alpha$ -глобулина падают; в этот период процессы диссимиляции преобладают над ассимиляцией (Шульман, 1972; Шатуновский, 1980; Решетников, 1980). Одновременно в нерестовый и посленерестовый периоды нарастает доля ИМД особей.

Нагульный период характеризуется не только восстановлением израсходованных во время зимовки и нереста ресурсов пластических и энергетических веществ, но и повышением функциональной активности иммунной системы. В период зимовки функциональные показатели гуморальных факторов иммунитета существенных изменений не претерпевают.

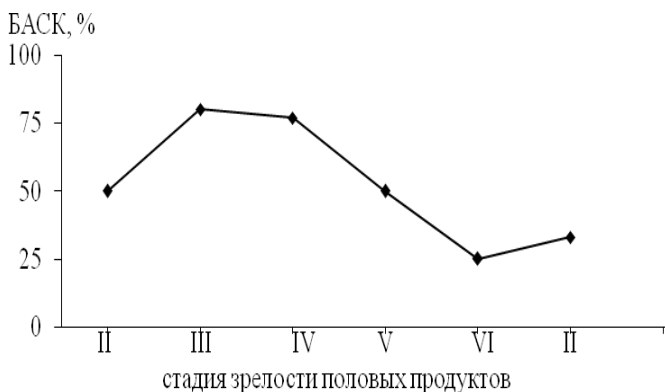


Рис. Динамика БАСК леща в зависимости от стадии созревания половых продуктов.

При анализе показателей функционального состояния иммунной системы леща в разные периоды годового цикла выявлена связь иммунологической реактивности рыб с процессами созревания половых продуктов, нерестом, условиями нагула и зимовки. Низкие показатели иммунитета выявлены у отнерестившихся особей в VI-II стадиях зрелости, а максимальные – у рыб в III-IV стадиях зрелости. К концу нагульного периода иммунологическая реактивность восстанавливается, а доля иммунодефицитных резко снижается. В зимний период величины БАСК (кроме налима) существенно не меняются, а весной постепенно снижаются. Обнаруженные изменения в иммунной системе рыб в связи с созреванием половых продуктов рассматривается как реакция рыб в ответ на качественные и количественные сдвиги, происходящие в воспроизводительной системе. Установленные закономерности динамики изменения БАСК в связи созреванием половых продуктов представляют интерес при оценке иммунного статуса и характера влияния нерестового периода на защитные функции и оценке состояния здоровья рыб нерестовых популяций.

Список литературы.

1. Микряков В.Р. Актуальные вопросы иммунологии рыб. В кн.: Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ. Л.: Наука, 1978. Вып. 32/25. С. 116–134.
2. Никольский Г.В. Экология рыб. М. Высшая школа, 1974. 367 с.
3. Решетников Ю.С. Экология и систематика сиговых рыб. М. Наука, 1980. 300 с.
4. Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М. Наука, 1980. 238 с.
5. Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М.: Пищевая промышленность, 1972. 368 с.
6. Schaperclaus W. Fischkrankheiten. Berlin: Academic-Verlag., V. 1. 1979. 510 p.

#### **DYNAMICS THE SBA DURING THE VARIOUS PERIODS OF THE ANNUAL CYCLE OF FISHES**

Mikryakov V.R., Silkina N.I., Mikryakov D.V., Elizarova N.V.

The given changes of antimicrobic function of blood serum in bream *Abramis brama* L. Rybinsk water basin depending on the period of an annual cycle: prespawning, spawning, after spawning, fattening, are cited. Dependence of indicators the SBA biological a condition of fishes is shown.

# ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СОДЕРЖАНИЕ АНТИГЕНРЕАГИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ В ОРГАНИЗМЕ КАРПА *CYPRINUS CARPIO*

Д.В. Микряков, В.Р. Микряков, В.М. Степанова  
Институт биологии внутренних вод РАН, Борок Ярославской  
обл., Россия, e-mail: [mvr@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:mvr@ibiw.yaroslavl.ru)

Лимфоциты рыб, подобно таковым высших позвоночных (Петров, 1983; Ройт и др., 2000; Койко и др., 2008), являются центральной фигурой иммунной системы (Купер, 1980; Микряков, Балабанова, 1979; Микряков, 1991; Manning, Nakanishi, 1996; Romano et al., 1998; Van Muiswinkel, Vervoorn-Van Der Wal, 2006). Одна из важнейших функций лейкоцитов – распознавание «чужого» с помощью иммуноглобулин подобных рецепторов путем адгезии антигена на поверхности клетки. В результате их взаимодействия образуются розетки в виде комплекса антиген-лимфоцит или антигенреагирующая клетка (АГРК). По содержанию антигенсвязывающих рецепторов лимфоциты рыб неоднородны (Микряков, 1991). Об этом, в частности, свидетельствуют данные и наших исследований, проведенные на лимфоцитах карпа по изучению разнообразия антигенреагирующих клеток (Микряков, Степанова, 1983; Степанова, Микряков, 2002) с помощью реакции розеткообразования по методу Мендеса (Гришина, Мюллер, 1978).

Разнокачественность антигенреагирующих лимфоцитов изучали на иммуноцитах карпа, выделенных из почек, селезенки и периферической крови. В качестве антигена использовали бактерии *Aeromonas punctata*, эритроцитов барана (ЭБ), зимозан и комплекс зимозан+ЭБ. Показано, что антигенреагирующие лимфоциты исследуемых рыб гетерогенны (табл. 1).

Следует отметить, что число лимфоцитов рыб, вступающих в реакцию цитоадгезии с бактериальным антигеном, было больше, чем таковых, вступающих в реакцию с ЭБ, зимозаном, и комплексом зимозан+ЭБ. Особенно низким было количество

антигенраспознающих клеток к ЭБ, зимозану и комплексу зимозан+ЭБ в популяциях лимфоцитов селезенки.

Таблица 1. Относительное число антигенреагирующих лимфоцитов в организме карпов, содержащихся при температуре воды 16-19°C, %

Источник антигена	Место локализации лимфоцитов		
	периферическая кровь	мезонефрос	селезенка
Бактерии	13.9±0.3	32.0±1.9	42.0±1.8
Эритроциты барана		5.89±0.78	1.33±0.15
Зимозан		7.13±0.90	5.96±0.78
Зимозан+ЭБ		13.6±1.06	3.78±0.64

Примечание. Из расчета на 1 тысячу клеток.

### **Зависимость антигенреагирующей функции лимфоцитов от присутствия ионов $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$**

Известно, что процесс реагирования лимфоцита с клеткой мишенью или с чужеродным телом зависит от присутствия ионов кальция ( $Ca^{2+}$ ), магния ( $Mg^{2+}$ ) и подавляется ингибиторами клеточного метаболизма (Хаитов, Атауллаханов, 1981; Петров и др., 1983).

Сущность действия ионов  $Ca^{2+}$  сводится к контролю активности рецепторных участков мембраны лимфоцита с антигенным сигналом и проницаемости плазматических мембран (Петров и др., 1983). Ионы магния необходимы как катализаторы ферментативных процессов, в том числе циклазных ферментов: аденилат- и гуанилатциклаз (Хаитов, Атауллаханов, 1981). Наличие этих ферментов способствует переводу некоммутированных лимфоцит (неспособных вступать в реакцию с антигеном) в коммутированные, участвующие в процессе узнавания чужеродных тел и реакции бласттрансформации.

Данных по влиянию активаторов рецепторных систем на функционирование антигенраспознающих структур у рыб в доступной литературе нет. Чтобы понять механизмы, регулирующие взаимодействие лимфоцитов с бактериальным антигеном, нами проведено исследование зависимости антигенреагирующей функции этих клеток от присутствия в инкубационной среде ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ .

Исследования показали зависимость процесса распознавания от наличия в среде двухвалентных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . (табл. 2).

Таблица 2. Реакция лимфоцитов почек карпа с инактивированными бактериями после связывания  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  этилендиаминтетраацетатом ЭДТА

Условия опыта	Число опытов	Доля антигенреагирующих клеток, %	
		иммунные	неиммунные
В присутствии 1 мл моль ЭДТА	10	11±0.09	12±0.2
Трис буфера без ЭДТА	8	69±2.7	37±1.7
0.05%-ный раствор $\text{Na}_3\text{N}$	7	5±0.2	7±0.4

Количество антигенреагирующих лимфоцитов с бактериями в присутствии хелатора ЭДТА резко падает. Полученные данные позволяют считать, что для осуществления реакции АГРК нуждаются в присутствии двухвалентных ионов ( $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ). Они, подобно таковым высших позвоночных, по-видимому, выполняют функцию активаторов рецепторных систем и регулируют реакцию взаимодействия АГРК с бактериями. В присутствии хелатора ЭДТА в популяциях лимфоцитов снижается не только доля АГРК, но резко уменьшается число трансформированных лимфоцитов, напоминающих макрофаги (табл. 3).

Таблица 3. Влияние ЭДТА на состав лимфоидных клеток почек карпа, %

Состав иммуноцитов	Опыт	Контроль
Лимфоциты	39±2,2	36±1,3
Лимфобласты	-	4±0,2
Лимфобласты на стадии трансформации	5±0,2	44±2,2
Ретикулярные клетки	2±0,1	16±0,6

Примечание. Состав клеток определялся в 10 экспериментах через 0.5 ч от момента постановки опыта.



В опыте уменьшаются не только трансформированные лимфоциты, но и ретикулярные клетки. В популяциях клеток, обработанных ЭДТА, доля лимфоцитов, находящихся на стадии «покоя», наоборот увеличивается. Присутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , видимо, блокируя процесс взаимодействия антигена с мембранными рецепторами АГРК, препятствует переходу иммуноцитов из фазы покоя G в фазу клеточной трансформации и деления (Хайтов, Атауллаханов, 1981).

Вероятно, это является одной из причин нарушения образования клеток, осуществляющих функцию разрушения чужеродных тел и антителосинтезирующих клеток. Сходные изменения в характере реагирования АГРК с бактериями получены при культивировании иммуноцитов карпа в присутствии ингибитора метаболической активности клеток – 0.05%-ного азида натрия.

Таким образом, результаты исследования морфофункциональных характеристик АГРК показали, что функцию распознавания бактериальных тел выполняют лимфоциты, снабженные мембранными рецепторами. Лимфоциты рыб по характеру реагирования на митогены представлены более чем 2 субпопуляциями. Обнаружен видоспецифический характер распределения этих клеток в организме рыб. По наличию антигенреагирующих рецепторов лимфоциты рыб гетерогенны. Высказано предположение, что интенсивность иммунного ответа определяется наличием в организме достаточного количества АГРК. Выявленное различие в содержании преддетерминированных АГРК к разным по происхождению антигенам в организме рыб и теплокровных животных отражает эволюционные отношения между ними и их экологические особенности. Функция мембранных рецепторов АГРК зависит от ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Их отсутствие или недостаток в организме и в окружающей среде следует считать неблагоприятным для функционирования иммунной системы, в частности, по реализации процессов распознавания и нейтрализации чужеродных тел, вызывающих инфекционные болезни у рыб.

### **Влияние некоторых факторов на содержание антигенреагирующих клеток в организме рыб**

Известно, что изменения, происходящие в окружающей среде, оказывают прямое или опосредованное влияние на иммунологическую реактивность рыб (Гончаров, 1962, 1967; Лукьяненко, 1971). Однако сведения о характере влияния экологических факторов в доступной литературе отсутствуют. Вместе с тем следует отметить, что большое влияние на содержание АГРК оказывают температура и рН воды (табл. 4, 5).

Влияние температуры воды. Полученные материалы показали, что у рыб при температуре 4°С резко снижается доля АГРК, и наоборот, при температуре 22-26°С – повышается. Степень изменчивости исследуемого показателя зависит от иммунизации рыб. У предварительно иммунизированных карпов различия в содержании бактериальной АГРК при разных температурах колеблются менее чем в 4 раза, а у интактных – в 10 раз.

Популяция бактериальных АГРК в организме карпа, вероятно, состоит из устойчивых и чувствительных к воздействию низкой температуры воды субпопуляций. С понижением температуры воды за пределы толерантной (оптимальной) для данного вида рыб происходит снижение АГРК, и наоборот, с повышением температуры воды доля этих клеток в организме рыб повышается.

Таблица 4. Влияние температуры на содержание АГРК, %

температура,	иммунные	интактные
4	19±0,9	5±0,1
15	62±3,0	20±2,8
22	77±4,7	38±3,4
26	75±5,1	49±4,4

Выявленные различия в характере реагирования АГРК у иммунных и неиммунных особей позволяют предполагать, что иммунизация индуцирует образование устойчивых и чувствительных к низкой температуре АГРК. Не исключено, что колебание АГРК в организме рыб при разных температурах происходит за счет изменения активности рецепторного аппарата этих клеток. Вполне возможно, что при низких температурах подавляется функция рецепторов у большинства АГРК.

Выявленное различие в уровне содержания АГРК при разных температурах позволяет высказать предположение, что интенсивность разрушения чужеродных тел, образования антителосинтезирующих клеток определяется исходным количеством антигенраспознающих клеток.

Влияние рН воды. Известно, что рН воды играет существенную роль в жизнедеятельности водных животных (Виноградов и др., 1979). Колебания концентраций водородных ионов в водоеме оказывают отрицательное влияние на водных животных. При снижении (закислении) рН воды за пределы оптимальной для водных животных увеличивается смертность рыб и снижается продуктивность водоема. При низких значениях рН в популяциях рыб появляются эпизоотии костноза, сапролегниоза и болезни Стаффа (Бауер, 1959; Канаев, 1973; Бауер и др., 1977; Schaperclaus, 1979), косвенно свидетельствующие об изменении иммунологической реактивности рыб и доли содержания АГРК лимфоцитов.

Об этом свидетельствуют данные исследований содержания АГРК к бактериям *A. punctata* у рыб, находящихся при низких значениях рН воды. Опыты ставили на двухлетках карпа, в непроточных аквариумах при рН=4.7 и температуре воды 16–18°C. Необходимую величину рН в опытах поддерживали автоматическим титрованием воды, разбавленной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> с помощью БАТ-15. Содержание АГРК устанавливали через 15 сут после посадки рыб в опытные аквариумы (табл. 5). Из представленных данных видно, что при низких значениях рН уменьшается содержание АГРК и лимфоцитов. Степень снижения иммуноцитов в селезенке была выражена сильнее, чем в почках.

Таблица 5. Влияние рН воды (4.7) на содержание лимфоцитов и АГРК в 1 млн лейкоцитов, тыс. кл.

место концентрации клеток	лимфоциты		АГРК	
	опыт	контроль	опыт	контроль
мезонефрос	$4.3 \times 10^4 \pm 1.8 \times 10^3$	$7.0 \times 10^4 \pm 2.4 \times 10^3$	$12.5 \times 10^3 \pm 3.0 \times 10^3$	$26.6 \times 10^3 \pm 4 \times 10^3$
селезенка	$3.9 \times 10^4 \pm 2.5 \times 10^3$	$41 \times 10^4 \pm 7.3 \times 10^3$	$5.4 \times 10^3 \pm 1.2 \times 10^3$	$11.1 \times 10^4 \pm 8 \times 10^3$

Примечание. Контрольные особи содержались при рН воды 7.2-7.4

Таким образом, количественное содержание бактериальных АГРК в организме рыб не является величиной постоянной. В

зависимости от условий среды их число колеблется. При воздействии на рыб неблагоприятных для их жизнедеятельности факторов содержание АГРК уменьшается. Ранее исследованиями влияния гормона стресса на содержание АГРК к бактериям *A. punctata* (Микряков, 2004) показано резкое снижение доли лимфоцитов с антигенреагирующими рецепторами. Установленное различие в содержании этих клеток у рыб свидетельствует, что АГРК представлены не менее чем 2-мя субпопуляциями: чувствительными и устойчивыми к повреждающим действиям экологических факторов клеток. Данные свидетельствуют о возможности использования АГРК в качестве клеток-«мишеней» при оценке реакции иммунной системы рыб в ответ на воздействие неблагоприятных (стресс) факторов среды. Угнетающее действие стресс-раздражителей на напряженность активно приобретенного и естественного иммунитета и сопротивляемость рыб к инфекционным и инвазионным болезням, вероятно, определяется долей содержания АГРК.

#### Список литературы

- Бауер О.Н. Экология паразитов пресноводных рыб (Взаимоотношения паразита со средой обитания) // Изв. ГосНИОРХ. 1959. Т. 49.
- Бауер О.Н., Мусселиус В.А., Николаева В.М., Стрелков Ю.А. Иктиопатология. М., 1977.
- Виноградов Г.А., Гдовский П.А., Матей В.Е. Закисление водоемов и его влияние на метаболизм у пресноводных животных // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., 1979.
- Гончаров Г.Д. Иммунологическая реактивность у рыб // Бюл. Ин-та биол. водохр. М.-Л., 1962. № 12.
- Гончаров Г.Д. Изучение механизма иммунитета рыб к инфекции // Обмен веществ и биохимия рыб. М., 1967.
- Гришина Т.И., Мюллер С. Одновременное выявление Т-, В- и D-розеткообразующих лимфоцитов и нулевых клеток человека // Бюлл. экп. биол. мед. 1978. № 4, С. 503-506.
- Канаев А.И. Ветеринарная санитария в рыбоводстве. М., 1973.
- Койко Р., Саншайн Д., Бенджамини Э. Иммунология: Уч. пособие. М.: Издат. центр "Академия", 2008. 368 с.
- Купер Э. Сравнительная иммунология. М.: Мир, 1980. 424 с.
- Лукьяненко В.И. Иммунобиология рыб. М., 1971.
- Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. 153 с.

Микряков В.Р., Балабанова Л.В. Клеточные основы иммунитета у рыб. В кн.: Физиология и паразитология пресноводных животных. Л.: Наука, 1979. С. 57-64.

Микряков Д.В. Влияние некоторых кортикостероидных гормонов на структуру и функцию иммунной системы рыб: Автореф. дис. ...кандидата биол. наук. Москва, 2004. 24 с.

Микряков В. Р., Степанова В. М. Влияние митогенов на лимфоциты карпа (*Cyprinus carpio* L.) // Иммунология. 1983. С. 33-42. Деп. 18.10.83. № 5725-83.

Петров Р.В. Иммунология. М.: Медгиз, 1983. 367 с.

Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М.: Мир, 2000. 592 с.

Степанова В.М., Микряков В.Р. Использование метода Мендеса для изучения субпопуляций лимфоцитов карпа (*Cyprinus carpio* L.) // Биол. внутр. вод. 2002. № 3. С. 84-87.

Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И. Мембранозависимые медиаторы, регулирующие метаболизм, пролиферацию и дифференцировку иммунцитов // Итоги науки и техники. Иммунология. 1981. Т. 9.

Manning M.J., Nakanishi T. The specific immune system: cellular defenses. London. Academic Press. 1996. P. 160-206.

Romano N., Taverne-Thiele J.J., Van Maanen J.C., Rombout J.H. Leukocyte subpopulations in developing carp (*Cyprinus carpio* L.): immunocytochemical studies // Fish & Shellfish Immunology. 1997. V. 7, № 7. P. 439-453.

Schaperclaus W. Fischkrankheiten. Berlin, 1979.

Van Muiswinkel W., Vervoorn-Van Der Wal B. The immune system of fish // Fish diseases and disorders. 2006. V. 1. P. 678-701.

### **INFLUENCE OF SOME ECOLOGICAL FACTORS ON MAINTENANCE ANTIGEN-REACTIVE LYMPHOCYTE IN THE ORGANISM OF CARP *CYPRINUS CARPIO* L.**

Mikryakov D.V., Mikryakov V.R., Stepanova V.M.

The given researches of the maintenance antigen-reactive lymphocyte in an organism of carp *Cyprinus carpio* to erythrocyte a ram, zymosan, to bacteria *Aeromonas punctata*, depending on the nature of an antigene, ions  $Ca^{+}$  and  $Mg^{2+}$ , temperatures and pH waters are cited. lymphocyte on character of reaction with antigenes heterogenous.

## АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ РЫБ НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ ВОДЫ ТОКСИКАНТАМИ

В.Р. Микряков, С.Н. Половкова, Д.В. Половков

*Институт биологии внутренних вод РАН, Борок Ярославской  
обл., Россия, e-mail: [mvr@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:mvr@ibiw.yaroslavl.ru)*

Ранее нами установлено, что в популяциях рыб, обитающих в антропогенно загрязнённых водоёмах, повышается доля рыб с вторичными иммунодефицитами (Микряков и др., 1990; 2001; 2008; Силкина и др., 2010; 2012; 2013). У рыб из антропогенно загрязнённых водоемов (Рыбинское водохранилище, о. Неро, рр. Урал, Кубань и др.) отмечены деструктивные, дистрофические процессы, дистрофия гуморальных и клеточных факторов иммунитета, увеличение содержания неспецифических иммунных комплексов, нарушение структуры и функции клеток крови, активация окислительных процессов, дизрегуляция лейко- и эритропоэза, явления цирроза в иммунокомпетентных тканях и органах, язвенные поражения кожи и т.д.

Происходящие в организме патологические процессы соответствуют таковым, наблюдаемым у высших позвоночных при аллергических реакциях на загрязняющие вещества, наблюдаемым среди населения, работающего на химических и промышленных предприятиях (Алексеева, Дуева, 1978; Хаитов и др., 1995; Клиническая аллергология, 2002). Установленные в организме рыб изменения свидетельствуют о сенсибилизации и аллергизации организма к токсикантам.

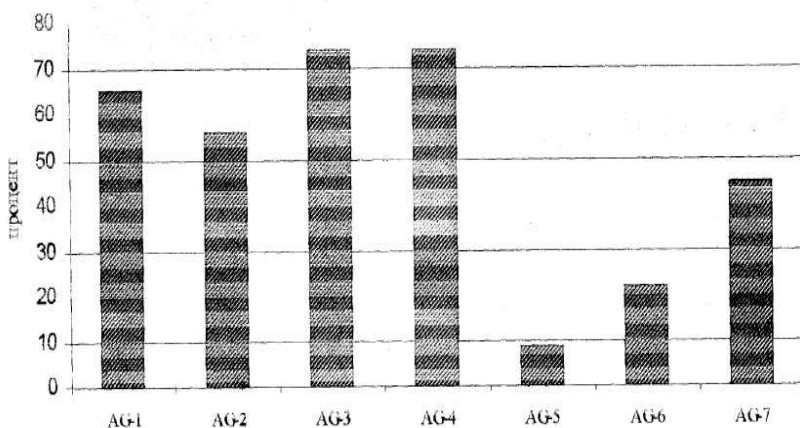
Целью настоящей работы является изучение аллергических реакций рыб к пестицидам, используемым при обработке луковых плантаций, расположенных вокруг озера Неро Ярославской области.

Материалом для исследования служили 122 экз. леща *Abramis brama* о. Неро и 30 особей карпа *Cyprinus carpio* в возрасте 2+ с экспериментальной прудовой базы «Сунога» ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН. Аллергизацию рыб оценивали по данным анализа содержания антипестицидных антител: прометрину, семерону, фундазолу, рамроду, феназону, тетрану, тиурану-

ТМТД. Антитела к пестицидам определяли в сыворотке крови рыб реакцией пассивной гемагглютинации. В качестве антигена использовали эритроциты барана, нагруженные соответствующими пестицидами. Конъюгацию эритроцитарного антигена с пестицидами проводили по С.Г. Барлоговой и Е.В. Васильевой (Алексеева, Дуева, 1978). Одновременно в экспериментальных условиях изучали влияние рамрода при концентрации 0,5 и 1 мг/л, фундазола – 1-2 мг/л на образование антител к испытуемым токсикантам. Опыты ставились при температуре 15-18°C (в ваннах из инертного материала ёмкостью 1 м<sup>3</sup> из расчёта 53,3 л на особь. Реакцию иммунной системы карпа на токсиканты оценивали по содержанию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК), и появлению токсикантреагирующих антител (ТРА). Материал собирали через 14, 21 и 30 дней с момента начала эксперимента.

Проведенные исследования показали, что рыбы, в озере Неро и карпы в условиях эксперимента реагировали образованием сенсибилизирующих антител к пестицидам (рис. 1).

Рисунок. Количество положительно реагирующих рыб популяции оз.



Неро к пестицидам

Примечание: по оси ординат – число ТРА рыб, в %; по абсцисс – токсиканты:

AG-1 – доля рыб к семерону; AG-2 – к тетрану; AG-3 – к фундазолу; AG-4 – к рамроду; AG-5 – к феназону; AG-6 – к прометрину; AG-7 – к ТМТД.

По содержанию ТРА рыбы разделялись на положительно и негативно реагирующих особей.

Из 7 пестицидов, тестируемых на содержание их в тканях рыб, максимальное число положительно реагирующих особей установлено к фундазолу и рамроду, затем семерону, тетрану, ТМТД, прометрину и феназону (рис.). фундазол и прометрин реагирующих из общего числа исследуемых рыб выявлено у 74 %, семерон реагирующих – 65 %, тетран реагирующих – 56 %, ТМТД-реагирующих – 44,5 %, прометрин реагирующих – 21,7 % и феназон реагирующих – 8,7 %.

Материалы исследований результатов анализа показали, что карпы на присутствие в воде рамрода и фундазола реагировали синтезом ТРА и изменением величины БАСК и динамикой содержания неспецифических иммунных комплексов (табл.).

Таблица. Влияние рамрода и фундазола на иммунный статус карпа

Исследуемый признак	Число рыб (экз.)	Сроки отбора проб, дни		
		14	21	30
ЦИК, ус.ед.	<u>5</u>	<u>25±4.0</u>	<u>12±0.9</u>	<u>9±1.0</u>
	5	9±0.7	13±	11±0.6
БАСК, %	<u>5</u>	<u>19±2.1</u>	<u>40±1.8</u>	<u>70±5.7</u>
	5	75±6.0	81±	
ТРА, в титрах разведения сыворотки, к рамроду	<u>5</u>	<u>1:4–1:8</u>	<u>1:16–1:32</u>	<u>1:32–1:64</u>
	5	1:4–1:6	1:8–1:10	
к фундазолу	<u>5</u>	<u>1:2–1:8</u>	<u>1:4–1:8</u>	<u>1:8–1:24</u>
	5	1:4–1:8	1:6–1:10	1:4–1:8

Примечание: в числителе – опыт; в знаменателе – контроль.

Изменения ЦИК и БАСК в организме карпа носили разнонаправленный характер. ТРА выявлены у рыб, подвергнутых воздействию рамрода. Высокие величины ЦИК обнаружены на 14 сутки после начала опыта, а таковые БАСК и ТРА к концу эксперимента. Реакция гуморальных факторов иммунитета была интенсивной в присутствии рамрода. При



действию рамрода отмечена обратная корреляция ТРА с высоким содержанием ЦИК, которые, в свою очередь, совпадали с нарастающей активностью бактерицидных свойств сыворотки крови. Обнаруженные в сыворотке крови ТРА к рамроду и фундазолу свидетельствуют, что рыбы на присутствие в воде токсиканта, как и у высших позвоночных, реагируют сенсibiliзацией организма. Однако, сенсibiliзирующее действие токсиканта на рыб, видимо, определяется природой и токсичностью загрязняющего вещества.

#### Список литературы

Алексеева О.Г., Дуева Л.А. Аллергия к промышленным химическим соединениям. М.: «Медицина». 1978. 272 с.

Клиническая аллергология: Под ред. Р.М. Хаитова; М.: Медпресс-информ. 2002. 623 с.

Микряков В.Р., Андреева А.М., Лапирова Т.Б., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб Шекснинского плеса после аварии промышленных предприятий г. Череповца / Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск, 1990. С. 144-155.

Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука, 2001. 126 с.

Микряков В.Р., Половков Д.В., Половкова С.Н., Надиров С.Н. Иммунологическая характеристика леща *Abramis brama* (L.) оз. Неро. В монографии «Состояние экосистемы озера Неро в начале XXI» М.: Наука. 2008. С. 252-263.

Силкина Н.И., Микряков В.Р., Микряков Д.В. Особенности липидного обмена леща *Abramis brama*, обитающего в реках Южного Урала // Экология. 2010. № 6. С. 472-474.

Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние антропогенного загрязнения на окислительные процессы в печени рыб Рыбинского водохранилища // Экология. 2012. № 5. С. 361-365.

Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Некоторые иммунобиохимические показатели леща *Abramis brama*, обитающего в реке Кубань // Экология. 2013. № 4. С. 296-299.

Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М.: Издательство ВНИРО, 1995. 219 с.

## ALLERGIC REACTIONS OF FISHES TO POLLUTION OF WATER TOXICANT

V.R. Mikryakov, S.N. Polovkova, D.V. Polovkov

Data of researches allergization bream *Abramis brama* (L.) island Nero and carp *Cyprinus carpio* (L.) in the conditions of chronic experiment. It is shown, that fishes

reacted an organism sensibilisation, synthesis toxicant reacting antibodies. Quantitative characteristics of a share of the maintenance in investigated samples of fishes react positively and react negatively on toxicants individuals and their communication with the nature and toxicity of pesticide are defined.

## **РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПЦР-РВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ**

В.А. Пыльнов, М.М. Никитин, М.И. Доронин, Е.В. Котова  
*Федеральный центр охраны здоровья животных ФГБУ  
«ВНИИЗЖ»*

*ООО «Люмэкс-маркетинг», г. Санкт-Петербург,  
[lena1969@hotmail.ru](mailto:lena1969@hotmail.ru)*

Разработан метод детекции генома вирусов рыб в различных патматериалах на основе обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР с использованием микрочипового амплификатора нуклеиновых кислот в режиме реального времени «АриаДНА», позволяющий в течение 2-х часов детектировать геном вирусов.

Разработанный метод детекции вирусов использовался для исследования патматериала, полученного от рыб из различных регионов России в 2015 году. За истекший период обследовано около 100 рыбоводческих хозяйств. В некоторых хозяйствах в связи с эпизоотической обстановкой анализ проводился неоднократно. Пробы от рыб с подозрением на ВГС (вирусная геморрагическая септицемия), ИГН (инфекционный гемопоэтический некроз), ИПН (инфекционный панкреатический некроз), ВВК (весенняя виремия карпа) представляли собой следующие органы: мозг, жабры, почка, селезёнка, сердце, печень, а также кровь, слизь и др. Для выяснения вопроса сравнительной концентрации вирусов в конкретных органах и тканях проверяли большинство органов и биологических жидкостей на наличие генома вирусов ВГС, ИГН, ИПН, ВВК. Для этого исследовали отдельно различные участки органов и тканей как с видимыми патоморфологическими изменениями, так и без них. В наших исследованиях вирусы выявляли преимущественно

в мозге, почке и селезёнке. На наличие вирусов были обследованы рыбы разных возрастных групп. Вирусы выявлялись в пробах не только от рыб с клиническими признаками, но и без них. Таким образом, проведение амплификации различных регионов геномов вирусов ВГС, ИГН, ИПН, ВВК позволяло выявлять вирусспецифический фрагмент в различных пробах патматериала, поступивших на исследование с помощью нового метода.

Разработанный метод предполагает использование микрочипа с иммобилизованными пцр-смесями. Минимальная детектируемая концентрация ВГС, ИГН, ИПН, ВВК составляет 1 нг/мл, а в микрореакторах отсутствовали неспецифические реакции на образцы РНК вирусов рыб в концентрации  $10^3$  нг/мл. Регистрация результатов амплификации происходит в режиме «реального времени». Изменение уровня флуоресценции по каналам FAM и ROX отображается на графиках. Анализ результатов проводится с помощью программного обеспечения микрочипового амплификатора нуклеиновых кислот «АриаДНА», в котором задаются все необходимые параметры по длине волны, количеству циклов и фону. Таким образом, метод позволяет провести анализ 4-х проб на 4 вируса одновременно за 1 час без учёта пробоподготовки, которая включает приготовление 10% суспензии внутренних органов из патматериала и выделение РНК. Использование метода для скрининговых исследований значительно снизит нагрузку на проводимые анализы и исключит вероятность получения ложноположительных результатов, а также может быть рекомендован для проведения первоначальной диагностики в региональных лабораториях по болезням рыб.

V.A. Pylnov, M.M. Nikitin, M.I. Doronin, Ye.V. Kotova

Real-time PCR Technique Development for Diagnostics of Fish Viral Diseases The technique to detect fish viral genome in different kinds of pathological material based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using fluorescence hybridization and microarray-based amplification of nucleic acids in real time called AriaDNA which allows to detect viral genome within two hours was developed.

# ОЦЕНКА ОСОБЕННОСТЕЙ ФОРМИРУЮЩИХСЯ ОРГАНОВ КРОВЕТВОРЕНИЯ ЛИЧИНОК ЖАБЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*BUFO VIRIDIS*)

Д.Р. Светашева, М.П. Грушко  
Астраханский государственный технический университет,  
Астрахань, Россия, *mgrushko@mail.ru*

Амфибии представляют важную ступень в эволюции позвоночных животных и стоят на истоках становления многих узловых взаимосвязей, которые обеспечивают особенности их организации. Развитие организма - это самый уязвимый период в жизни любого животного. Изучение отклонений в развитии у животных позволяет выделить ведущие факторы окружающей среды, которые определяют картину выявленных изменений.

Задачей исследования явилось изучение особенностей личиночного периода зеленой жабы (*Bufo viridis* Laurenti, 1768).

Исследование проводилось на сериях срезов личинок зеленой жабы, приготовленных и окрашенных по общепринятым методикам (Волкова, Елецкий, 1982). Личинки жаб отбирали из городского водоема «Золотой затон», где, в летние месяцы, наблюдалось их активное размножение.

Исследования показали, что у головастиков на первые-вторые сутки эмбрионального развития происходит активное формирование органов гемопоэза. На ранних этапах развития функцию кроветворения выполняет первичная почка, как наиболее активный орган в этот период. В первые сутки личиночного развития жабы почка представляла собой пронефрос, позади жаберной полости без четких границ переходящий в мезонефрос. Морфологически пронефрос и мезонефрос были представлены изогнутыми почечными канальцами различного размера. Отмечалось очень мало межканальцевой ткани. По мере развития происходили значительные морфо-функциональные изменения этого органа. На протяжении всего исследованного периода развития почка наряду со своей основной функцией – выделения, выполняла функцию кроветворения. С первых дней развития после вылупления в почке жабы образовывались

элементы крови всех рядов: эритропоэтического, гранулоцитопоэтического и агранулоцитопоэтического. Большинство исследованных клеток принадлежало к эритропоэтическому ряду. Количество и соотношение форменных элементов крови изменялось у личинки с возрастом. Изучение структуры органа показало, что периферических или центральных зон кроветворения в органе не выявлено, все кроветворные элементы располагались хаотично, за исключением образования эритропоэтических островков на конечных этапах раннего онтогенеза.

Развивалась почка поэтапно, дифференцируясь пространственно и структурно по мере роста и развития личинки. К концу личиночного периода развития, орган был представлен парными вытянутыми тяжами со структурными элементами – почечными канальцами и почечными тельцами. У исследованных личинок среди всего многообразия клеточных элементов эритропоэтического ряда были выявлены клетки с патологиями – пойкилоциты. Также в просветах некоторых почечных канальцев у личинок был обнаружен белок. Причиной выявленных патологий, возможно, явилось негативное воздействие факторов окружающей среды. Такими вредно действующими агентами могут быть различные химические вещества, а так же микробы и вирусы, которые вызывают нарушение деятельности органов кроветворения (Житенева и др., 1989).

Селезенка выполняет в зрелом организме и при его развитии целый ряд разнообразных и важных функций. Выполнение этих многообразных функций осуществляется взаимодействием ее органных структур. Поэтому и гистогенез этого органа представляется весьма сложным (Волкова, Пекарский, 1976).

На срезах личинок жаб выявлялся зачаток селезенки, который представлял собой плотное скопление мезенхимных клеток, расположенный в каудальном направлении в петлях кишечника под зачатком мезонефроса. В строении формирующегося органа выявлялись очаги кроветворения. В первые сутки личиночного развития здесь были отмечены единичные эритробласты. На вторые сутки развития личинки появляются единичные клетки лимфоцитопоэтического ряда: лимфобласты и пролимфоциты. На

5–6 сутки в петлях молодой ретикулярной ткани выявлялись очаги размножающихся кроветворных клеток эритропоэтического, лимфоцитопоэтического, моноцитопоэтического и тромбоцитопоэтического рядов. Все клетки располагались хаотично. Происходила закладка просвета первичных сосудов. На 9-е сутки в селезенке личинок была заметна разветвленная сеть щелей, что можно считать «прообразом» формирующейся сосудистой системы органа (Волкова, Пекарский, 1976). Мезенхимный ретикулум, расположенный между сосудами, уже в большей степени к этому возрасту был замещен дифференцирующимися гемопоэтическими клетками, ретикулярными клетками, макрофагами. Снаружи орган был покрыт тонкой соединительнотканной капсулой. В поверхностном слое органа редко определялись идущие от капсулы вглубь закладки тяжи вытянутых клеток – развивающиеся трабекулы. В этот период добавляется гранулоцитопоз. На 12-е сутки личиночного развития селезенка приобретает слабовыраженную дифференцировку на белую и красную пульпу, при этом участки белой и красной пульпы не имели четкого места локализации. К 20 дню развития личинки Жабы обыкновенной селезенка полностью сформирована, строма органа подразделяется на красную и белую пульпу. В этот период в селезенке доминирует лимфоцитопоз.

Таким образом, проведенное исследование формирующихся органов кроветворения личинок жабы обыкновенной показало, что процесс становления изученных органов происходит постепенно, поэтапно по мере роста и развития личинки. Кроме этого, установлено, что в формирующемся мезонефросе имели место патологические отклонения, что указывает на неблагоприятную окружающую среду обитания этих животных.

#### Список литературы

Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой, 20-е изд. М.: Медицина, 1982. 304 с.

Волкова О.В., Пекарский М.И. Эмбриогенез и возрастная гистология внутренних органов человека, М.: Медицина, 1976. 416 с.

Житенева Л.Д., Полтавцева Т.Г., Рудницкая О.А. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб. Роств-н/Д. Ростовское книжное издательство. 1989 г.

# ЗАВИСИМОСТЬ АНТИМИКРОБНОЙ ФУНКЦИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ РЫБ ОТ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ

Н.И. Силкина, Н.Ф. Силкин, В.Р. Микряков  
*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,  
Борок, Россия, e-mail: [sni@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:sni@ibiw.yaroslavl.ru)*

Сыворотка крови рыб выполняет разнообразные физиологические и иммунологические функции. Она состоит из разных по функциональному значению компонентов: белков, липидов, углеводов и их составляющих: глико-, липопротеидов, мукополисахаридов, аминок- и жирных кислот, иммуноглобулинов, минеральных анионов, катионов, воды и т.д. Каждый из этих элементов находится в сбалансированных между собой соотношениях, образуя единую функциональную систему, выполняющую важную гомеостатическую функцию по поддержанию биологического постоянства внутренней среды в онтогенезе (Микряков и др. 1979; Микряков, 1984).

Сбалансированность входящих в состав крови биохимических компонентов является одним из важных условий, определяющих устойчивое существование живых организмов на адаптацию в колеблющихся условиях среды. Степень сбалансированности и прочность этого состояния зависит от внутренних и внешних факторов. Недостаток того или иного вещества в конечном итоге приводит к нарушению целостности структур, изменению функций механизмов иммунитета и устойчивости к заразным болезням. Следует отметить, что исследований по изучению связи антимикробных функций сыворотки крови рыб с фракционным составом белков и липидов в доступной литературе мало.

Целью настоящей работы является изучение антимикробных свойств сыворотки крови рыб имеющих различные величины альбумин-глобулинового коэффициента, отдельных белковых фракций и соотношения между белками и липидами.

Материалом для исследования использовали сыворотку крови леща, синца и налима, Рыбинского водохранилища. БАСК

измеряли нефелометрическим методом (Смирнова, Кузьмина, 1966), адаптированного нами для рыб (Микряков, 1984). Альбумин-глобулиновый коэффициент устанавливали после электрофореза сыворотки крови на целлюлозной пленке (Хромов и др. 1976). Альбумины, общие глобулины,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулины получали по общепринятому методу Конна с помощью сернокислого аммония. Белково-липидное соотношение оценивали по отношению показателей веса сывороточных белков и липидов после их разделения.

### Альбумин-глобулиновый коэффициент и БАСК.

Альбумин-глобулиновый (А/Г) коэффициент означает отношение низкомолекулярных белков к высокомолекулярным. Данный показатель в области клинической медицины определяется при оценке общего состояния здоровья, характера течения обменных процессов, болезней и т.д. (Неменова, 1972; Чеснокова, Киселева, 1980; Schaperclaus, 1979 и др.).

Исследованиями показано, что рыбы, имеющие различные величины БАСК, отличались по А/Г коэффициенту (рис. 1).

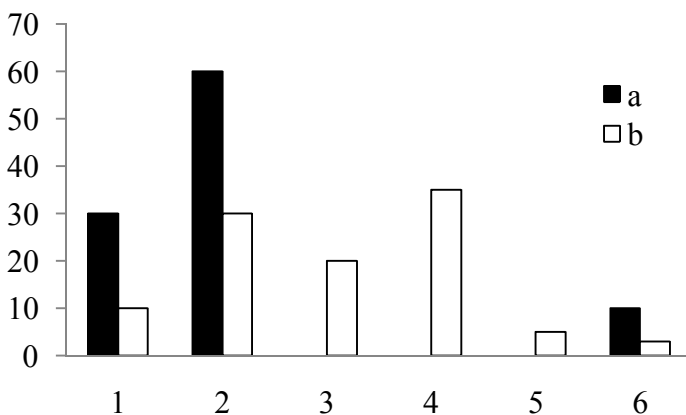


Рис. 1. Распределение леща по классам альбумин-глобулинового коэффициента.

Примечание: а – иммунодефицитные особи, б – иммунореактивные особи. По оси ординат – число рыб, %; по оси абсцисс – классы А/Г коэффициента.

Из 91 иммунодефицитного леща, сыворотки которых не оказывали угнетающего действия на развитие микробов, либо угнетали очень слабо, 28,6% имели А-Г коэффициент в среднем



равный 0,2, 59,3% - 0,27 и только 12% - 0,7. У 39% иммунореактивных особей из 220 исследованных лещей, А/Г коэффициент соответствовал первому и второму классам, с модельным значением показателей белков 0,2 и 0,3, а у остальных 61% рыб А/Г коэффициенты равнялись 0,4 (18,2%), 0,5 (32,3%), 0,6 (7%) и 0,7 (3,6%).

Сравнение величины БАСК леща с данными альбумин-глобулиновых соотношений показали, что большинство рыб с высокими величинами защитных свойств сыворотки крови имели А/Г коэффициент свыше 0,35, а с низкими – менее 0,35.

Следует отметить, что степень корреляции между функциональными показателями иммунитета и А/Г коэффициентом у рыб, обитающих в разных условиях, отличается. Коэффициент парной корреляции для лещей дельты Волги был равен +0.94, тогда как для Рыбинского водохранилища – +0.52. Все это говорит о том, что не во всех случаях может быть установлена прямая связь между напряженностью естественного иммунитета и данными коэффициентом. Это же можно сказать, по-видимому, в отношении других видов. В частности, между А/Г коэффициентом и показателями БАСК у синца какой-либо связи нами не установлено. Из изложенного следует, что А/Г коэффициент по-видимому, не является универсальным показателем, позволяющим оценить функциональное состояние естественных механизмов гуморального иммунитета.

**Влияние отдельных белковых фракций сыворотки крови леща на развитие микробов.** Вопрос о том, каким образом влияют отдельные фракции сывороточных белков на БАСК, ранее никем не рассматривался. Исследование данного вопроса представляется важным при оценке роли отдельных фракций в формировании естественного иммунитета у рыб.

В опытах использовали сыворотки крови леща до и после удаления той или иной белковой фракции (Микряков и др., 1979). Удаление белковой фракции из сыворотки крови осуществляли по Кону (Кэбот, Майер, 1968) с помощью сернокислого аммония. Надосадочную жидкость после обессоливания пропускали через молекулярное сито – сефадек-25 по Кульбергу (1968), а затем

использовали для определения активности антимикробных свойств белковых фракций.

Результаты проведенных исследований показали, что удаление из сыворотки белковых фракций по сравнению с контрольными вызывают снижение антимикробной функции (табл. 1). Показатели бактериостатической активности  $\alpha$ -глобулинов в отличие от других фракций превышают таковые альбумина,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинов.

Таблица 1. Антимикробный эффект отдельных компонентов сыворотки крови леща, %

Номер опыта	Интактная сыворотка	Альбумины	Глобулины		
			$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
1	98	9	43	25	23
2	81	-	54	46	-
3	40	25	28	25	22
4	78	25	15	40	15
5	75	31	28	21	20
6	80	10	44	25	21
7	69	29	35	16	15
8	85	24	36	18	22
9	92	33	41	11	15
10	86	27	23	17	23
Среднее:	78,4	21,3	34,7	24,1	17,9

$\gamma$  – глобулины, по результатам наших опытов на антимикробные свойства сыворотки крови, существенного влияния не оказывали и не подтверждают бытующее в литературе мнение о том, что защитная функция крови в основном зависит от  $\gamma$  – глобулинов (Ахмедов, 1968; Kulov, 1966 и др.). Активность БАСК леща, зависит от сбалансированной целостности входящих в состав сыворотки белковых компонентов и особенностей их взаимодействия.

**Зависимость антимикробных свойств сыворотки крови от соотношения между белками и липидами.** Исследованиями установлено, что между белково-липидными соотношениями и уровнем антимикробных свойств существует линейная зависимость. Белково-липидное соотношение в сыворотке рыб 1 группы с уровнем антимикробного эффекта  $10 \pm 0.7$  % (в среднем) равнялось 5.21:1, 2-ой группы с бактерицидной активностью

55.3±0.4 % - 3.4:1, 3-ей группы с величинами антимикробных свойств 83.5±0,4 % - 2.7:1 (табл. 2).

Таблица 2. Статистическая характеристика белково-липидного соотношения и уровней антимикробных свойств сыворотки крови леща.

Статистические параметры	Белково-липидные соотношения по группам			Активность антимикробных свойств по группам, %		
	I	II	III	I	II	III
Число рыб	22	43	55	22	43	55
Средняя арифметическая	5.2:1	3.4:1	2.7:1	9.95	55.3	83.5
Ошибка среднего	0.49	0.28	0.22	0.67	0.36	0.35
Коэффициент вариации	0.43	0.53	0.60	0.31	0.03	0.03
Коэффициент корреляции	+0.99	+0.98	+0.90	+0.99	+0.98	+0.90

Приведенные данные свидетельствуют о том, что чем больше белка приходится на долю органического вещества сыворотки крови по сравнению с липидами, тем слабее угнетается развитие бактерий, и, наоборот, чем больше доля липидов на единицу веса органического вещества сыворотки крови, тем сильнее угнетается развитие микробов.

Таким образом, из приведенных данных видно, что активность механизмов естественного иммунитета зависит не только от белковых фракций, аминокислот, но и от соотношений между разными группами органического вещества. Снижение доли липидов в тканях рыб за пределами оптимального для вида уровня приводит к супрессии иммунной системы и повышению иммунодефицитных особей. Данные этих опытов свидетельствуют о том, что в определении антимикробных свойств сыворотки крови существенная роль принадлежит липидам. Выявленную связь между белково-липидными соотношениями и активностью защитных свойств сыворотки крови следует считать важным в деле понимания механизмов иммунитета, причин изменения восприимчивости к заразным болезням и темпа естественной смертности рыб.

Таблица 3. Содержание отдельных фракций липидов (% от общей суммы липидов) у иммунодефицитных и иммунореактивных особей.

Название фракций	Синец		Налим	
	самка	самец	самка	самец
фосфолипиды	<u>23.4±0.3</u>	<u>26.2±0.5<sup>xx</sup></u>	<u>21.7±0.3<sup>xx</sup></u>	<u>21.3±0.2<sup>xx</sup></u>
	24.4±0.4	22.0±0.3	18.6±0.2	18.6±1.3
Холестерин	<u>16.6±0.1</u>	<u>16.6±0.06</u>	<u>13.9±0.2</u>	<u>13.6±0.1</u>
	15.9±0.3	15.4±0.3	13.4±0.4	12.3±0.6
НЭЖК	<u>10.1±0.2</u>	<u>9.8±0.05</u>	<u>10.0±0.3</u>	<u>10.4±0.2</u>
	9.98±0.2	11.2±0.3	10.5±0.2	10.2±0.1
Эфиры стериннов	<u>17.9±0.2</u>	<u>18.9±0.2</u>	<u>15.2±0.2<sup>xx</sup></u>	<u>15.7±0.2<sup>xx</sup></u>
	19.6±0.2	18.5±0.3	19.8±0.3	21.1±0.2
Триацилглицериды	<u>20.7±0.5</u>	<u>20.5±0.5<sup>xx</sup></u>	<u>24.5±0.3</u>	<u>22.5±0.1</u>
	20.9±0.7	23.1±0.1	24.6±0.6	24.9±0.1
Фронт (углеводороды и другие в-ва липидной природы)	<u>11.3±0.2</u>	<u>8.0±0.3</u>	<u>14.4±0.4</u>	<u>16.4±0.4</u>
	9.2±0.3	7.9±0.4	13.1±1.0	17.3±0.7

Примечание: xx – различия между средними значениями достоверно ( $P < 0.01$ ); в числителе – средние арифметические иммунодефицитных особей, в знаменателе – иммунореактивных, с антимикробным эффектом сыворотки крови свыше 50 %.

Чтобы понять, изменение каких липидных фракций отражается на функциональной активности иммунной системы, нами проведено одновременное исследование состава и уровня липидных фракций и БАСК некоторых видов рыб. Материалом для исследования послужила сыворотка крови налима и синца, имеющая высокие и низкие показатели антимикробных свойств или таковые, полученные от иммунодефицитных и иммунореактивных особей. При сопоставлении величины исследуемых признаков выявлено, что иммудефицитные и иммунореактивные особи отличались между собой по величине содержания отдельных липидных фракций (табл. 3).

Независимо от видовых особенностей, иммунодефицитные особи от иммунореактивных отличались содержанием фосфолипидов и эфиров стериннов. Количество фосфолипидов, участвующих в структурной организации клеточных мембран и выполняющих бактериальную и транспортную функции клеток, стабилизаторов частиц, поверхностно-активных веществ и т.д., в сыворотке крови иммунореактивных особей, за исключением

самок синца, было достоверно меньше, чем у иммунодефицитных ( $P < 0,001$ ).

Эфиры стеринов, выполняющие важную транспортную функцию в переброске триацилглицеридов, жирных кислот, жирных кислот, фосфолипидов и участвующие в структурной организации липопротеидов низкой плотности, такие, как и фосфолипиды, видимо, играют существенную роль в регуляции активности иммунитета. Уровень эфиров стеринов у иммунодефицитных особей были достоверно ниже ( $P < 0.001-0.05$ ) по сравнению с таковыми у иммунореактивных. Если самцы синца, имеющие разные показатели иммунитета, отличались между собой, как и налим, по содержанию фосфолипидов, то по величине эфиров стеринов – нет. У синца по уровню эфиров стеринов различные между иммунодефицитным и иммунореактивными особями установлено только среди самок. Между другими фракциями липидов различия отсутствовали, за исключением триацилглицеридов у самок синца. В сыворотке крови самцов иммунореактивных особей триацилглицеридов было больше, чем у иммунодефицитных (табл. 3).

Корреляционный анализ, проведенный между отдельными фракциями и БАСК налима, показали, что защитные свойства сыворотки крови рыб в большей степени зависят от содержания эфиров стеринов, фосфолипидов и триацилглицеридов (табл. 4).

Таблица 4. Корреляция БАСК налима с отдельными фракциями липидов

Фракция	Пол	r	P
Эфиры стеринов	самец	0.914	0.01
	самка	0.852	0.01
фосфолипиды	самец	-0.526	0.01
Триацилглицериды	самец	-0.794	0.01
	самка	-0.794	0.01

Примечание: r – коэффициент парной корреляции, P – достоверность коэффициента парной корреляции.

Высокий уровень корреляции триацилглицеридов с БАСК (+0.727), выявленный у самцов налима, свидетельствует о том, что эта фракция, видимо, оказывает существенное влияние на функционирование гуморальных факторов естественного иммунитета.

Результаты данной серии опытов позволили установить, что особи, имеющие высокие и низкие показатели иммунитета, отличаются между собой содержанием эфиров стерина, фосфолипидов и триглицеридов. Изменение количественных показателей этих фракций приводит к стимулированию или супрессии защитной функции сыворотки крови.

**Взаимосвязь между характером белкового и липидного обмена и сезонной динамики гуморальных факторов иммунитета.** Ранее многолетними исследованиями сезонной динамики антимикробных свойств сыворотки крови было показано, что функциональная активность иммунной системы в течение года сильно колеблется (Микряков, 1978). Существенные количественные сдвиги претерпевают также показатели белкового и липидного обмена (Шульман, 1972; Шатуновский, 1976, 1980; Силкина, 1977, 1984; Лапина, 1979; Кирсипуу, 1979 и др.). Наиболее глубокие сдвиги в иммунологических и биохимических показателях, как это было установлено нами на синцах и леще, происходит весной, в период нереста (Микряков, 1978, 1984; Микряков, Силкина, 1979, 1980 и др., 1979, 1983). В нерестовый период у синца в связи с интенсивным расходом запасных веществ на созревание половых продуктов и выметывание их, показатели коэффициентов упитанности, альбуминов,  $\alpha$ -глобулинов и  $\gamma$ -глобулинов, общих липидов, триацилглицеридов падают, а уровень эфиров стерина, холестерина, фосфолипидов и  $\beta$ -глобулинов повышаются. В популяции рыб появляются особи (около 7%) с иммунодефицитным состоянием. Анализ корреляционной связи БАСК с биохимическими параметрами показал наличие положительной корреляции с общими липидами, эфирами стерина и отрицательной с холестерином и  $\alpha$ -глобулинами (табл. 5).

У отнерестившихся особей, в начале лета показатели БАСК уменьшаются в среднем до 19 % у самок и до 5% у самцов, доля рыб с иммунодефицитным состоянием увеличивается в 6 раз по сравнению с некоторыми периодами, а содержание триацилглицеридов, НЭЖК, общих липидов,  $\beta$ -глобулинов и  $\alpha$ -глобулинов (у самок) уменьшается, концентрация же альбуминов,  $\gamma$ -глобулинов и упитанность рыб возрастает. В начале нагульного

периода БАСК положительно коррелировал с общими липидами и эфирами стерина и отрицательно – с  $\beta$ -глобулинами.

Таблица 5. Корреляция уровня БАСК сыворотки крови синца с отдельными фракциями белков и липидов в разные сезоны года.

МЕСЯЦ	Фракция липидов и белков	Число рыб (n)	Коэффициент парной корреляции (r)	Достоверность коэффициента парной корреляции (P)
Апрель	БАСК	30	52±3.5	
	Холестерин	30	0.589	0.01
	НЭЖК	30	0.458	0.05
	ЭС	30	0.372	0.05
Май	БАСК	29	44±4.0	
	$\beta$ -глобулины (самки)	19	-0.476	0.05
	Общие липиды	29	0.378	0.05
	Холестерин	29	-0.407	0.05
	ЭС	29	0.448	0.05
Июнь	БАСК	55	19±3.3	
	$\beta$ -глобулины (самки)	33	-0.640	0.01
	Общие липиды	55	0.439	0.01
	ЭС	55	0.548	0.01
Июль	БАСК	34	40±3.1	
	Фосфолипиды	34	0.491	0.01
	ЭС	34	0.368	0.05
Август	БАСК	15	75±2.9	
	$\beta$ -глобулины (самки)	6	0.860	0.01
	Фосфолипиды	15	-0.892	0.01
	Холестерин	15	-0.815	0.01
	НЭЖК	15	0.783	0.01

В период интенсивного нагула, когда в организме происходит интенсивное накопление энергетических ресурсов, усиливаются процессы генеративного и пластического обмена, уровень защитных свойств сыворотки возрастает до 70-80%. В популяциях рыб исчезают особи с иммунодефицитным состоянием. Показатели коэффициентов упитанности, уровень общих липидов, триацилглицеридов, НЭЖК,  $\beta$ -глобулинов (самки) и  $\alpha$ -глобулинов (самцы) в этот сезон года нарастают, содержание холестерина, фосфолипидов, альбуминов,  $\gamma$ -глобулинов и  $\beta$ -глобулинов (самцы) снижается. Величина БАСК в конце нагульного периода отрицательно коррелировала с

фосфолипидами, холестерином, НЭЖК, а с  $\beta$ -глобулинами – положительно.

Во время зимовки уровень общих липидов, холестерина, триацилглицеродов, а также упитанность рыб падают. Весной, в преднерестовый период, уменьшаются величины БАСК, снижается упитанность, падают концентрации триацилглицеридов, альбуминов и  $\alpha$ -глобулинов, а содержание  $\beta$ -глобулинов, эфиров стерина, фосфолипидов, холестерина по сравнению с зимним сезоном, повышается. Период нереста БАСК коррелирует положительно с холестерином, НЭЖК и эфирами стерина.

Полученные данные свидетельствуют о том, что показатели, характеризующие иммуно-физиологическое состояние синца, колеблются и обусловлены сезонными ритмами жизнедеятельности. Отмеченные сдвиги уровней физиолого-биохимических параметров существенно и неоднозначно отражаются на защитных свойствах сыворотки крови синца. Из 11-ти исследованных биохимических показателей, величины БАСК в различные сезоны года коррелировала с 7-ю:  $\alpha$  и  $\beta$ -глобулинами, общими липидами, холестерином, НЭЖК, фосфолипидами и эфирами стерина ( $P < 0.05$ ).

Таблица 6. Коэффициент корреляции зависимости бактериостатической активности и белков сыворотки крови леща в различные сезоны года.

Время сбора материала	Признак	Число рыб (n)	Средняя арифметическая и ее ошибка ( )	Коэффициент корреляции с уровнем значимости более 95 %
Май	БАСК	19	80.9 $\pm$ 3.7	
	$\beta_2$ -глобулины	11	15.1 $\pm$ 1.1	-0.63
	$\gamma$ -глобулины	17	10.4 $\pm$ 0.8	-0.55
Июнь	БАСК	27	29.5 $\pm$ 3.5	
	Альбумины	27	25.0 $\pm$ 1.0	0.47
	$\alpha$ -глобулины	27	30.7 $\pm$ 1.6	-0.42
	$\beta_1$ -глобулины	13	16.8 $\pm$ 1.5	-0.56
Август	БАСК	10	65.8 $\pm$ 3.5	
	$\beta_1$ -глобулины	7	16.2 $\pm$ 2.2	-0.75
Сентябрь	БАСК	11	85.8 $\pm$ 3.5	
	$\alpha$ -глобулины	7	14.8 $\pm$ 1.5	0.85
	$\gamma$ -глобулины	8	9.4 $\pm$ 1.1	0.74
Октябрь	БАСК	14	90.4 $\pm$ 1.4	

Примечание: Альбумины, глобулины и БАСК (бактериостатическая активность сыворотки крови), %.



Анализ корреляционных связей между изучаемыми параметрами свидетельствует о том, что активность защитных свойств сыворотки крови в разные сезоны года зависит от изменения уровня содержания либо альбумина, либо  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов (табл. 6).

Чтобы понять, изменение каких белковых фракций сыворотки крови в течение года оказывает существенное влияние на функционирование механизмов естественного иммунитета, нами проведено исследование данного вопроса методом нахождения главных компонентов (Андерсон, 1963).

Аналізу подвергались сыворотки крови 304 лещей, собранные в течение года. У рыб изучали показатели фракционного состава белков и БАСК. Исследования выявили, что особи, имеющие разные показатели иммунитета по уровню содержания белковых фракций, разделяются на 14 основных групп (табл. 7).

Таблица 7. Взаимосвязь уровня БАСК с относительным содержанием белковых фракций сыворотки крови леща в разные сезоны года.

№	Числ о рыб	% от сум- мы рыб	БАСК, %	Альб у- мин ы, %	Глобулины, %			Частота встречаемости рыб с данным вариантом, %			
								зи ма	вес на	лет о	осе нь
Иммунодефицитные особи											
1	4	1.3	6	37	32	14	17	-	100	-	-
2	11	3.6	2	15	26	50	9	-	-	100	-
3	10	3.3	10	20	15	44	21	10	90	-	-
4	5	1.6	9	17	41	24	18	-	80	20	-
5	54	17.8	30	25	37	22	16	16	24	36	24
Иммунореактивные особи											
6	11	3.6	77	19	26	43	12	-	100	-	-
7	12	3.9	89	21	49	13	12	-	-	-	100
8	10	3.3	84	16	37	37	10	20	80	-	-
9	15	4.9	65	36	16	35	13	33	67	-	-
10	10	3.3	76	24	31	25	20	20	70	10	-
11	8	2.6	91	43	44	7	6	25	25	-	50
12	40	13.2	59	30	38	20	12	12	50	5	32.5
13	71	23.4	88	35	29	22	14	18	50	20	12
14	43	14.2	91	25	32	32	11	24	16	3	57

При рассмотрении данных видно, что иммунореактивные особи отличаются от иммунодефицитных числом вариантов уровней содержания белковых фракций. Среди иммунодефицитных выявлено 5, а иммунореактивных – 9, что соответственно составляет 27.6 % и 72.4% от общего числа вариантов белковых компонентов. Каждый вариант сочетаний белковых фракций достоверно отличается от другого по уровню содержания либо всех 4 фракций (21.9 % случаев), либо – 3 (39.5 %), либо – 2 (30.76 %), либо – 1 (7.69 %). У особей с низкими показателями иммунитета в 4-х случаях из 5-ти альбумина было меньше, чем  $\alpha$  или  $\beta$ -глобулинов, а в двух – равно  $\gamma$ -глобулинам. Только в одном случае альбумина обнаружено больше, чем других фракций (1-й вариант). У 87 % иммунодефицитных особей  $\gamma$ -глобулинов содержалось достоверно выше, по сравнению с 95.8 % иммунореактивных лещей.  $\gamma$ -глобулины у иммунореактивных особей в 95.8 % случаев составляли меньшую долю сывороточных белков, против остальных фракций.

Все это позволяет думать о том, что  $\gamma$ -глобулины у леща не играют, видимо, существенной роли в определении антимикробных свойств сыворотки крови (Микряков и др., 1979). Варианты сочетаний уровней белковых компонентов среди иммунореактивных рыб отличались либо по содержанию альбумина,  $\alpha$ -,  $\beta$ -глобулина, либо по соотношению между альбуминами и глобулинами. Анализ частот встречаемости этих вариантов показал, что лещи по степени разнокачественности вариантов белковых фракций в разные сезоны года различаются. Лещи, выловленные в весенний период, по этому признаку оказались наиболее гетерогенными, чем таковые летом и осенью. Весной среди лещей Рыбинского водохранилища обнаружено 12 вариантов, летом и осенью – 7 и 6 соответственно. Обнаруженное различие в вариантах содержания белковых компонентов (в течение года), по всей вероятности, отражает пути адаптации рыб к меняющимся условиям среды. Вполне возможно, лещи в весенний период в связи с переходом их из зимних условий в летние, когда гидробиологические процессы усиливаются, а также с усилением процессов созревания и выметывания половых продуктов, реагируют изменением обменных реакций с разной

степень интенсивности. Вследствие этого степень разнокачественности (или фенотипической изменчивости) уровней содержания белковых фракций, обуславливающих появление в популяциях рыб иммунодефицитных и иммунореактивных особей, возрастает. Летом и осенью, в период интенсивного нагула и после него, когда процессы обмена становятся относительно стабильными, эта разнокачественность уменьшается. В результате этого число вариантов белковых фракций среди рыб снижается более чем на 50 %. Несмотря на большое разнообразие уровней белковых фракций из 14 вариантов, всего 4 выявлены во все времена года: 1 – среди иммунодефицитных (5-й вариант) и 3 среди иммунореактивных (12-14 варианты). Остальные 10 вариантов обнаружены либо весной (1 и 6), летом (2-й), осенью (7-й), либо зимой и весной (3, 8 и 9), или весной и летом (4-й), либо зимой, весной и летом (10-й), либо осенью, зимой и весной (11-й вариант). На долю 4-х вариантов сочетаний белковых фракций приходится 68.6 % исследуемых рыб, тогда как на 10-ти – 31.4%. Исходя из этих данных следует, что 10 вариантов белковых сочетаний, видимо, отражают особенности модификационной фенотипической изменчивости иммунной системы рыб, происходящие в течение года в ответ на меняющиеся условия среды обитания и ритмы внутренней жизнедеятельности рыб.

Выявленное различие в количестве вариантов содержания уровней белковых фракций среди иммунодефицитных и иммунореактивных особей позволяет считать, что одно и то же иммунологическое состояние рыб определяется разными соотношениями величины сывороточных белков. Это говорит о том, что не всякое изменение в функциональном состоянии организма, приводящее к колебаниям уровней белковых фракций в разные сезоны года, однозначно отражается на иммунологической реактивности рыб. Вполне вероятно, это связано со стратегией адаптации леща к паразитам, заразным болезням и условиям среды обитания.

Таким образом, анализируя полученные материалы по изучению биохимических показателей физиологического состояния иммунодефицитных и иммунореактивных особей,

следует отметить, что функциональная активность иммунной системы зависит от состояния белкового и липидного обменов. Снижение доли одних биохимических компонентов, увеличение других приводят к появлению в популяциях либо иммунодефицитных, либо иммунореактивных особей.

#### Список литературы

1. Кульберг А.Я. Ионообменная хроматография и гель-фильтрация в иммунологии. В кн.: Иммунохимический анализ. М.: Медицина, 1968. С. 21-39.
2. Кэбот Е., Мейер М. Экспериментальная иммунохимия. Перевод с англ. Левенсона и др. М.: Медицина, 1968. 684 с.
3. Микряков В.Р., Силкина Н.Ф., Силкина Н.И. Антимикробные свойства сыворотки крови рыб // Сб. трудов ИБВВ АН СССР «Физиология и паразитология пресноводных животных». Л.: Наука, 1979. Вып. 38 (41). С. 125-132.
4. Микряков В.Р. Закономерности функционирования иммунной системы пресноводных рыб: Автореф. дис. д-ра биол. наук. М.: ИМЭЖ РАН, 1984. 37 с.
5. Неменова Ю. М. Методы лабораторных клинических исследований. М., Медицина, 1972. 424 с.
6. Смирнова О.В., Кузьмина Т.Д. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом фотонейтриметрии // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. 1966. №4. С. 8-11.
7. Храмов В.А., Спасов А.А., Сяткин С.П. К методике электрофоретического разделения сывороточных белков на полосках ацетата целлюлозы // Лаб. дело. 1976. № 10. С. 584-586.
8. Чеснокова С.А., Киселева И.С. Жидкие среды организма. В кн.: Нормальная физиология. М.: Высшая школа, 1980. С. 26-53.
9. Scharperclaus W. Fischkrankheiten. Berlin: Academic-Verlag. 1979. 1090 p.

### **DEPENDENCE OF ANTIMICROBIC FUNCTION OF BLOOD SERUM FISHES ON FRACTIONAL STRUCTURE OF PROTEINS AND LIPIDS**

Silkina N.I., Silkin N.F., Mikryakov V.R.

The given researches of dependence of level of antimicrobial blood serum *Abramis brama*, *A. ballerus* and *Lota lota* are cited. From albumin-globulin factor, a parity between proteins and lipids, fractional structure of proteins and lipids. Communication between increase in protective functions and biochemical characteristics of blood serum is shown.

# ВЛИЯНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛЕТОЧНОЕ ЗВЕНО ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЫБ

Т.А. Суворова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,  
Борок Ярославской обл., Россия, e-mail: [tanya@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:tanya@ibiw.yaroslavl.ru)*

Известно, что терапевтическое действие ряда лекарственных средств связано с их способностью повышать общую сопротивляемость организма и влиять на специфические иммунные реакции (Машковский, 2011). В настоящее время большое значение приобретают разработка и внедрение в рыбоводную практику природных комплексных препаратов, стимулирующих рост, развитие и устойчивость рыб к неблагоприятным факторам (Oliva-Teles A., 2012). Целесообразно их применение в нерестовый сезон для укрепления иммунной системы производителей, в период подготовки и получения половых продуктов, а также для повышения жизнестойкости разновозрастной молодежи (Аликин и др., 2011; Матвиенко и др., 2011; Magnadottir et al., 2006). С целью повышения устойчивости рыб к заболеваниям в условиях промышленной аквакультуры на рыбоводных предприятиях проводится регулярное введение в корма различного рода витаминных премиксов, кормовых пробиотиков и прочих биологически активных добавок (Кондратенко, Папазян, 2011). Механизм действия пробиотиков прежде всего направлен на вытеснение патогенной микрофлоры кишечника и, как следствие, на нормализацию обмена веществ у рыб, улучшение усвоения корма, повышение резистентности организма (Юхименко и др., 2009). Не менее важная функция пробиотиков – продуцирование комплекса биологически активных веществ, способных нейтрализовать опасные метаболиты, токсины бактерий. За счет нормализации основных физиологических процессов усиливаются механизмы неспецифического иммунитета (Лукьянова, 2007).

Тем не менее, контроль бактериальных заболеваний рыб в нашей стране в основном базируется на применении медикаментозных лекарственных средств. Для химиотерапии

инфекций, наносящих большой экономический ущерб рыбоводным хозяйствам, в частности аэромоноза, в производственной практике успешно применяют антибактериальные препараты, особенно на основе ципрофлоксацина из группы фторхинолонов (Гончарова, 2009). Добавление в корм этих препаратов значительно повышало уровень напряженности неспецифического иммунитета карпа (Гаврилин и др., 2010) и влияло на интенсивность инвазии рыб эктопаразитами (Микряков и др., 2010). Однако в доступной литературе экспериментальные данные по влиянию антибактериальных препаратов и пробиотиков на различные факторы иммунитета носят противоречивый и не всегда доказательный характер.

Ихтиологи в настоящее время уделяют большое внимание исследованиям влияния половых стероидов на ускорение полового созревания и увеличение продуктивности при товарном выращивании объектов аквакультуры. Добавление в корм андрогенов вызывает маскулинизацию, образование триплоидных гибридов и увеличивает длину и массу тела молоди рыб (Метальникова, 2010; Lin et al., 2010; Naugen et al., 2011; Zanardi et al., 2011). При этом сведений о влиянии андрогенов на состояние иммунной системы рыб в доступной литературе немного. В работах на плотве и лине (Vainikka et al., 2004) показано, что введение тестостерона повышает уровень данного гормона в плазме крови, но не подавляет литическую активность сыворотки крови и фагоцитов головной почки. Хорошо известно, что тестостерон принимает участие не только в регуляции репродуктивной функции, но и влияет на рост (Sparks et al., 2003), метаболизм (Sparks et al., 2003; Arjona et al., 2008), осморегуляцию (Arjona et al., 2008), транспорт глюкозы (Reshkin et al., 1989), активность гликозидаз и протеиназ химуса и слизистой оболочки кишечника (Кузьмина и др., 2011), а также функциональную настройку рецепторных систем рыб (Шпарковский, 1986). При этом уровень тестостерона в разные периоды жизни значительно меняется и в тканях половых органов, и в плазме крови (Баранникова и др., 1997; Vainikka et al., 2004).

Учитывая, что данное направление исследований

представляет огромный интерес для отечественной аквакультуры, нами была проведена сравнительная оценка влияния широко используемых в рыбоводстве антибактериального препарата, пробиотика и полового гормона на функционирование клеточного звена иммунной системы рыб.

Эксперименты проводили на базе аквариальной лаборатории иммунологии Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН в 2009-2011 гг. Опыты ставились на карпах *Cyprinus carpio* L. в возрасте 1+ 2+, средней массой 50–70 г. и стерляди *Acipenser ruthenus* в возрасте 3+, средней массой 400–450 г. Рыб содержали в аэрируемых аквариумах при температуре воды  $20 \pm 1 - 2^\circ\text{C}$  и  $16 - 18^\circ\text{C}$  соответственно. Лечебные корма с вышеуказанными препаратами рыбы получали в течение 5 сут согласно инструкции. Сбор материала производили на 7, 10 и 14 сут после начала опыта. Стерляди внутривентрально инъецировали 0.2 мл раствора тестостерона ( $0.7 \text{ мг/кг}$  массы тела или  $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ), приготовленного на физиологическом растворе для холоднокровных животных, что выше содержания гормона в плазме крови в период нереста рыб –  $10^{-6} \text{ M}$  (Schmidt, Idler, 1962). Использование более высокой дозы обусловлено тем, что у рыб низкий уровень обменных процессов и после внутривентральной инъекции только незначительная часть гормона попадет в кровь. Рыбам контрольной группы вводили равное количество физиологического раствора. Пробы для анализа отбирали перед началом опыта у интактных особей (0 сут) и через 1, 3, 7, 14 и 21 сут после инъекции. Каждая выборка состояла из пяти особей.

Реакцию иммунной системы рыб на воздействие препаратов определяли по структурно-функциональному состоянию лейкоцитов периферической крови и иммунокомпетентных органов. В качестве иммунобиологических препаратов использовали пробиотик СУБ-ПРО (SUB-PRO) – препарат в форме порошка для перорального применения, предназначенный для профилактики желудочно-кишечных болезней, повышения продуктивности и лечения разных видов животных, в т.ч. птиц и рыб, при кишечных инфекциях и гастроэнтеритах, протекающих с диарейным синдромом, антибактериальный препарат Антибак 100 для карповых рыб, содержащий в качестве действующего

вещества ципрофлоксацин, а также вспомогательные компоненты и раствор тестостерона, приготовленного на физиологическом растворе для холоднокровных животных, рыбам контрольной группы в этой серии экспериментов вводили равное количество физиологического раствора.

Состав лейкоцитов определяли в мазках крови и мазках-отпечатках органов, окрашенных по Романовскому-Гимза. Кровь для приготовления мазков получали из хвостовой артерии. В каждом из них определяли относительное количество лимфоцитов, палочко- и сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, моноцитов и бластных форм клеток по классификации Ивановой (1983) под тринокулярным микроскопом «Биомед-6ПР1-ФК», просчитывая по 200 клеток. Состав лейкоцитов стерляди был представлен такими же типами лейкоцитов, как и у других пресноводных видов рыб, за исключением базофилов (Иванова, 1983).

Результаты исследований были статистически обработаны при помощи стандартного пакета программ (приложение *Statistica*) с использованием t-теста,  $p \leq 0.05$ .

Система крови, представленная периферической кровью и органами кроветворения, является незаменимым материалом для получения информации о принципиальной полноценности работы иммунной системы. Периферическая кровь, находящаяся в русле сосудов, постоянно омывает ткани, органы и системы органов, являясь транзитом иммунокомпетентных клеток, в котором проявляется суммарный эффект изменения активности иммунной системы в процессе борьбы с чужеродным (Лебедев, Понякина, 1990). Экспериментально установлено, что иммуномодулирующие препараты повышают фагоцитарную активность нейтрофилов, бактериостатическую активность сыворотки крови рыб (Сыч и др., 2007). Известно, что иммунокомпетентные клетки являются основными структурами, обеспечивающими иммунитет рыб к патогенным организмам в онтогенезе в колеблющихся условиях среды и при воздействии стрессоров. Знание этого вопроса представляется весьма важным при оценке механизма влияния иммунобиологических препаратов на иммунный статус рыб.



Под влиянием препаратов Антибак 100 и СУБ-ПРО у опытных рыб по сравнению с контролем были отмечены различия в составе лейкоцитов периферической крови, почек и селезенки (табл. 1). При этом обнаруженные отличия зависели не только от применяемого препарата, но и от времени, прошедшего после начала опыта.

При исследовании лейкограмм опытных карпов достоверные отличия от контрольных особей отмечены в основном на 7 сут эксперимента: у рыб, которым давали Антибак 100 снижается относительное количество лимфоцитов и повышается остальных типов клеток, а у особей, которых кормили препаратом СУБ-ПРО увеличивается число сегментоядерных нейтрофилов и базофилов. В дальнейшие сроки наблюдения лейкоцитарные формулы опытных рыб практически не отличаются от таковых контрольных особей, кроме содержания палочкоядерных нейтрофилов и бластных клеток у рыб 1 группы. У опытных рыб 1 группы в лейкограмме головной почки отмечены изменения процентного содержания лимфоцитов, палочкоядерных нейтрофилов и базофилов, а у опытных карпов 2 группы лимфоцитов, сегментоядерных нейтрофилов, базо- и эозинофилов.

При исследовании мазков-отпечатков селезенки в обеих группах опытных карпов отмечено увеличение содержания базофилов, эозинофилов, которое было более значительное у рыб, которым давали СУБ-ПРО.

Сравнительный анализ уровня содержания отдельных типов лейкоцитов в почке и селезенке показал, что, в отличие от периферической крови, более значительные изменения происходят в лейкограмме особей 2 группы. Повышение количества базофилов и эозинофилов указывает на аллергическую реакцию организма, которая, по-видимому, наступает в ответ на основу пробиотического препарата – *Bacillus subtilis*. Данный вид микроорганизмов не является представителем нормальной микрофлоры кишечника рыб, следовательно, продукты жизнедеятельности сенной палочки могут восприниматься иммунной системой как опасные ксенобиотики.

При различных стрессовых воздействиях, в том числе инфекционных, инвазионных и токсических в лейкоцитах крови рыб отмечаются дестабилизационные и дезинтеграционные процессы, приводящие к снижению адаптивных способностей организма. При этом в первую очередь происходят нарушения в соотношении различных форм лейкоцитов, т.е. изменения в лейкоцитарной формуле. В этой связи изменения в соотношении различных форм лейкоцитов могут быть индикатором степени дестабилизационных процессов, происходящих в иммунной системе рыб, и основой прогноза последствий действия возмущающих (агрессивных) факторов на структурно-функциональное состояние клеточных факторов иммунитета (Микряков и др., 2005).

Проведенные исследования показали, что под влиянием Антибак 100 и СУБ-ПРО изменяются исследуемые показатели клеточного иммунитета: у опытных рыб по сравнению с контролем отмечены различия в составе лейкоцитов периферической крови, почек и селезенки. При этом интересно отметить, что эффект влияния антибактериального препарата практически не отличался от действия пробиотика. Следовательно, (с учетом литературных данных), зафиксированные изменения после курса кормления антибиотиком соответствуют ожидаемым, а пробиотиком нет. При этом обнаруженные отличия зависели не только от применяемого препарата, но и от времени, прошедшего после начала опыта. Полученных данных не достаточно, чтобы делать окончательные выводы о влиянии Антибак 100 и СУБ-ПРО на лейкоциты периферической крови, но можно отметить, что в лейкограммах карпов, которым давали Антибак 100, зафиксированы более сильные изменения по сравнению с особями, которых кормили СУБ-ПРО.

В ответ на введение тестостерона и инъекцию физраствора в периферической крови и иммунокомпетентных органах стерляди отмечены различия в содержании отдельных популяций клеток (табл. 2).

Наибольшие отклонения зафиксированы в лейкограммах периферической крови, а наименьшие в селезенке. Вероятно, это

связано с особенностями структурно-функциональной организации иммунокомпетентных органов рыб. Селезенка – основное место эритропоза, тогда как краниальная лимфоидная ткань и головная почка – лимфо- и гранулопоза (Кондратьева и др., 2001; Грушко и др., 2009). От этого зависит количественное содержание различных форм лейкоцитов в исследуемых тканях и органах.

На высших позвоночных установлено, что андрогены могут воздействовать на тимоциты как через рецепторы, так и взаимодействуя с глюкокортикоидными рецепторами, благодаря высокой степени гомологичности между различными стероидами и их рецепторами, оказывая иммуносупрессивный глюкокортикоидоподобный эффект (Kincade et al., 2000).

Таблица 1. Изменение лейкограмм крови и органов карпов *Cyprinus carpio* L. под влиянием препаратов, %

сут	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы		Базофилы	Эозинофилы	Бластные формы
			ПЯ	СЯ			
Периферическая кровь							
К	$92,7 \pm 0,6$ $92,9 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,2$ $0,4 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,3$ $0,9 \pm 0,4$	$0,1 \pm 0,1$ $0,6 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,1$ $0,1 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,3$ $0,6 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,4$ $4,6 \pm 0,9$
7	$73,7 \pm 2,8^*$ $89,9 \pm 1,7$	$1,7 \pm 0,2^*$ $0,5 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,7^*$ $1,2 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,3^*$ $1,5 \pm 0,2^*$	$1,8 \pm 0,3^*$ $2,5 \pm 0,4^*$	$5,1 \pm 1,4$ $1,8 \pm 0,5$	$10,7 \pm 2,8$ $2,6 \pm 0,2$
10	$93,7 \pm 1,0$ $93,4 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,1$ $0,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2^*$ $1,4 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,2$ $0,9 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,1$ $0,4 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,6$ $0,6 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,4^*$ $2,9 \pm 0,1$
14	$92,5 \pm 0,4$ $89,3 \pm 1,8$	$0,7 \pm 0,1$ $0,6 \pm 0,9$	$1,6 \pm 0,5$ $1,4 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,2$ $0,9 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$ $1,6 \pm 0,6$	$0,4 \pm 0,1$ $1,1 \pm 0,4$	$4,4 \pm 0,7$ $2,1 \pm 0,5$
Головная почка							
К	$51,3 \pm 0,9$ $50,9 \pm 1,2$	$1,7 \pm 0,3$ $1,2 \pm 0,2$	$16,1 \pm 0,5$ $17,8 \pm 0,9$	$2,3 \pm 0,6$ $3,0 \pm 0,6$	$3,0 \pm 0,3$ $1,8 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,4$ $3,8 \pm 0,5$	$20,1 \pm 1,1$ $21,5 \pm 2,3$
7	$46,5 \pm 1,0^*$ $45,2 \pm 0,9^*$	$1,1 \pm 0,2$ $0,8 \pm 0,2$	$20,6 \pm 1,0^*$ $19,4 \pm 3,1$	$1,9 \pm 0,3$ $2,2 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,2$ $7,7 \pm 1,9^*$	$6,2 \pm 0,3$ $6,7 \pm 1,0^*$	$20,7 \pm 0,9$ $18,0 \pm 1,2$
1	$54,2 \pm 1,0$	$1,4 \pm 0,3$	$14,4 \pm 0,8$	$1,7 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,2^*$	$6,3 \pm 0,6$	$18,0 \pm 0,5$
0	$40,8 \pm 2,7^*$	$1,1 \pm 0,1$	$22,1 \pm 2,4$	$2,3 \pm 0,3$	$6,3 \pm 1,1^*$	$6,4 \pm 1,2$	$21,0 \pm 3,3$
1	$45,8 \pm 1,5^*$	$1,1 \pm 0,1$	$18,4 \pm 1,2$	$1,6 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,4$	$5,5 \pm 1,6$	$24,0 \pm 2,4$
4	$48,2 \pm 1,4$	$1,2 \pm 0,3$	$14,4 \pm 0,8^*$	$1,5 \pm 0,3$	$5,3 \pm 1,3^*$	$7,1 \pm 0,8^*$	$22,3 \pm 1,1$
Селезенка							
К	$46,2 \pm 11,6$ $56,4 \pm 2,0$	$1,2 \pm 0,4$ $1,2 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,5$ $2,2 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,5$ $0,6 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,5$ $0,6 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,4$ $1,6 \pm 0,2$	$25,6 \pm 6,4$ $37,4 \pm 1,7$
7	$48,2 \pm 1,7$ $51,0 \pm 1,1^*$	$1,3 \pm 0,4$ $1,0 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,4$ $2,0 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,33$ $0,8 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,8^*$ $6,0 \pm 0,3^*$	$3,1 \pm 0,3^*$ $5,8 \pm 0,6^*$	$38,8 \pm 1,6$ $33,4 \pm 1,1$
10	$60,4 \pm 1,1$ $58,0 \pm 2,3$	$1,6 \pm 0,2$ $1,4 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$ $1,8 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,3$ $1,2 \pm 0,4$	$4,4 \pm 0,8^*$ $6,0 \pm 0,7^*$	$3,6 \pm 0,7^*$ $5,6 \pm 0,4^*$	$27,4 \pm 1,5$ $26,0 \pm 2,2^*$
14	$53,3 \pm 0,5$ $48,4 \pm 1,8^*$	$1,25 \pm 0,5$ $1,8 \pm 0,37$	$2,0 \pm 0,4$ $2,8 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,4$ $0,8 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,4$ $2,2 \pm 0,2^*$	$1,25 \pm 0,3$ $3,0 \pm 0,4^*$	$40,2 \pm 0,9$ $41,0 \pm 2,1$

Примечание. Над чертой – Антибак 100, под чертой – СУБ-ПРО.\* – достоверно относительно контроля при уровне значимости  $p < 0,05$ . К – контроль

Таблица 2. Изменение лейкоцитарного состава ( $M \pm m$ , %) крови и органов стерляди *Acipenser ruthenus* под влиянием тестостерона

Время, сут	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы		Эозинофилы	Бластные формы
			ПЯ	СЯ		
Периферическая кровь						
И	71,1±1,1	3,4±0,6	15,5±0,9	4,1±1,3	1,2±0,1	4,7±0,6
1	<u>68,2±2,3</u> 66,3±1,4 <sup>a</sup>	<u>7,2±1,2<sup>a</sup></u> 5,5±1,0	<u>12,8±2,6</u> 17,0±1,0	<u>3,3±0,2</u> 4,8±0,6	<u>1,8±0,6</u> 0,8±0,3	<u>6,7±1,3</u> 5,6±1,4
3	<u>74,8±2,3</u> 65,6±3,6	<u>3,3±0,9</u> 3,7±0,3	<u>11,2±2,2</u> 17,5±3,3	<u>2,2±0,3</u> 6,0±1,2	<u>0,5±0,0<sup>a</sup></u> 0,5±0,2 <sup>a</sup>	<u>8,0±1,0<sup>a</sup></u> 6,7±1,2
7	<u>75,5±1,0<sup>a</sup></u> 63,8±2,4 <sup>ab</sup>	<u>3,2±0,3</u> 3,4±0,34	<u>11,0±1,3<sup>a</sup></u> 18,0±2,6	<u>3,3±0,4</u> 7,9±1,4	<u>0,5±0,3<sup>a</sup></u> 0,7±0,2	<u>6,5±0,8</u> 6,2±0,8
14	<u>70,3±1,9</u> 69,0±1,15	<u>3,8±0,4</u> 4,7±0,6	<u>13,0±2,5</u> 14,5±0,9	<u>4,3±0,7</u> 4,7±0,9	<u>0,5±0,3<sup>a</sup></u> 1,0±0,3	<u>8,0±1,5</u> 6,1±1,1
21	<u>69,2±2,4</u> 67,1±3,3	<u>4,3±0,5</u> 3,6±0,5	<u>12,0±1,5</u> 13,1±2,9	<u>5,4±0,9</u> 7,5±0,9	<u>0,7±0,2</u> 1,0±0,4	<u>8,4±0,7<sup>a</sup></u> 7,6±1,2
Головная почка						
И	52,7±1,7	1,4±0,18	14,5±2,1	1,1±0,2	3,0±0,5	27,3±0,7
1	<u>50,7±1,9</u> 62,3±1,7 <sup>ab</sup>	<u>1,5±0,3</u> 1,5±0,4	<u>15,0±3,5</u> 6,3±0,3 <sup>ab</sup>	<u>1,5±0,0</u> 0,9±0,1 <sup>b</sup>	<u>4,0±0,8</u> 2,2±0,5	<u>27,3±2,3</u> 27,0±1,6
3	<u>43,3±2,0<sup>a</sup></u> 36,4±1,1 <sup>ab</sup>	<u>2,7±0,2<sup>a</sup></u> 2,7±0,3 <sup>a</sup>	<u>15,3±0,7</u> 23,6±1,5 <sup>ab</sup>	<u>1,2±0,2</u> 1,5±0,3	<u>4,5±0,5</u> 3,6±0,7	<u>33,0±2,0<sup>a</sup></u> 31,2±1,5 <sup>a</sup>
7	<u>47,7±5,1</u> 39,8±1,9 <sup>a</sup>	<u>2,2±0,4</u> 2,4±0,5	<u>19,2±3,3</u> 27,7±3,2 <sup>a</sup>	<u>1,7±0,2</u> 1,4±0,4	<u>3,3±0,2</u> 4,6±1,1	<u>26,0±1,9</u> 24,1±2,5
14	<u>36,8±2,7<sup>a</sup></u> 42,1±0,8 <sup>a</sup>	<u>2,8±0,7<sup>a</sup></u> 2,4±0,4 <sup>a</sup>	<u>22,8±2,3<sup>a</sup></u> 23,1±1,2 <sup>a</sup>	<u>1,7±0,6</u> 1,2±0,3	<u>7,3±2,1<sup>a</sup></u> 5,9±1,0 <sup>a</sup>	<u>28,5±4,9</u> 25,3±0,4 <sup>a</sup>
21	<u>46,9±1,3<sup>a</sup></u> 36,5±1,5 <sup>ab</sup>	<u>1,8±0,2</u> 3,2±0,2 <sup>ab</sup>	<u>18,5±1,1</u> 23,4±1,2 <sup>ab</sup>	<u>1,0±0,2</u> 1,0±0,2	<u>5,1±0,5+</u> 6,4±1,4	<u>26,8±1,2</u> 29,5±2,7
Селезенка						
И	75,0±2,0	1,5±0,2	4,6±0,6	0,5±0,4	2,0±0,7	16,4±1,9
1	<u>73,7±2,0</u> 80,5±2,1	<u>0,8±0,3</u> 0,9±0,1 <sup>a</sup>	<u>6,0±0,8</u> 6,4±1,2	<u>0,8±0,2</u> 1,1±0,3	<u>2,7±1,2</u> 1,6±0,2	<u>16,0±2,2</u> 9,5±1,4 <sup>a</sup>
3	<u>73,3±4,8</u> 75,9±0,7	<u>1,2±0,2</u> 2,1±0,2 <sup>b</sup>	<u>6,5±1,3</u> 5,2±0,6	<u>0,3±0,2</u> 0,7±0,2	<u>2,7±0,7</u> 2,3±0,4	<u>16,5±3,3</u> 13,8±0,9
7	<u>73,2±2,6</u> 74,0±2,9	<u>1,3±0,2</u> 1,2±0,2	<u>4,7±0,3</u> 4,3±0,5	<u>0,3±0,2</u> 0,7±0,1	<u>1,3±0,2</u> 0,7±0,4	<u>18,7±2,7</u> 19,1±2,6
14	<u>77,0±0,3</u> 80,8±1,5 <sup>a</sup>	<u>1,7±0,3</u> 1,0±0,2	<u>4,7±0,3</u> 3,5±0,2 <sup>b</sup>	<u>0,5±0,3</u> 0,8±0,2	<u>0,7±0,4</u> 0,9±0,3	<u>15,5±0,8</u> 13,0±1,2
21	<u>73,8±2,0</u> 75,5±1,1	<u>1,2±0,1</u> 1,4±0,2	<u>3,9±0,5</u> 4,7±0,7	<u>0,7±0,2</u> 0,5±0	<u>1,5±0,5</u> 1,3±0,3	<u>18,9±1,8</u> 16,6±1,3

Примечание.  $M \pm m$  – среднее значение и его ошибка; над чертой – контроль, под чертой – опыт; ПЯ – палочкоядерные, СЯ – сегментоядерные, И – интактная группа; <sup>a</sup> – достоверные отличия от интактной группы, <sup>b</sup> – от контроля.

Полученные данные позволяют предположить, что в организме рыб происходят аналогичные взаимодействия между иммунocyтaми и андрoгенами. Это подтверждает сходный характер изменения состава лейкоцитов у рыб после инъекций синтетического аналога гормона-стресса – кортизола (Микряков и др., 2007, 2009).

В периферической крови основные изменения лейкоцитарного состава происходили в первую неделю после начала эксперимента. У опытных рыб зафиксировано снижение относительного количества лимфоцитов и эозинофилов и увеличение нейтрофилов, моноцитов и бластных форм клеток, тогда как в контроле отмечено увеличение процентного содержания лимфоцитов и снижение нейтрофилов по сравнению интактными особями. Количественные характеристики лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов на 14 и 21 сутки приближались к уровню значений интактной группы, повышенным оставалось содержание бластных форм клеток. В головной почке происходило наиболее существенное изменение лейкоцитарного состава. В опытной группе рыб по отношению к интактным особям отмечено достоверное снижение относительного количества лимфоцитов, увеличение доли содержания моноцитов, палочкоядерных нейтрофилов и эозинофилов. Аналогичные изменения зафиксированы в контрольной группе, однако у опытных рыб они были более значимыми, на что указывают достоверные отличия от контрольных особей. В селезенке значительных изменений в лейкоцитарной форме не обнаружено, за исключением повышения процентного содержания лимфоцитов и снижения бластных форм клеток на 1 и 14 сут в опытной группе, а также достоверные отличия относительного количества моноцитов на 3 сут и палочкоядерных нейтрофилов на 14 сут наблюдения между опытными и контрольными рыбами.

Введение физиологического раствора сопровождалось повышением процентного содержания лимфоцитов, моноцитов и бластных форм и снижением нейтрофилов и эозинофилов в периферической крови относительно интактных особей. Во всех иммунокомпетентных органах отмечено снижение

относительного количества лимфоцитов, увеличение бластных форм и эозинофилов в головной почке, в которой также повышалось содержание моноцитов и нейтрофилов.

Однако эти изменения отличались направлением и величиной от результатов, полученных после инъекции гормона. У опытных рыб во всех тканях и органах (кроме селезенки) зафиксировано снижение относительного количества лимфоцитов. В периферической крови и головной почке зафиксировано повышение процентного содержания моноцитов и нейтрофилов, однако они различались показателями эозинофилов и бластных форм. В головной почке увеличивалось относительное количество эозинофилов, а в периферической крови и селезенке, наоборот, снижалось.

Таким образом, проведенные исследования показали, что тестостерон вызывает изменение доли содержания отдельных типов лейкоцитов в периферической крови и иммунокомпетентных органах.

Сравнивая результаты собственных исследований и литературных данных, проведенных в этой области экспериментов, можно констатировать, что эффекты действия препаратов во многом зависят от вида рыбы, её физиологического статуса (Кольман и др., 2006) и времени воздействия. Полученные результаты наблюдений указывают на целесообразность дальнейших исследований по изучению воздействия иммунобиологических препаратов на иммунный ответ рыб, особенно в связи с их использованием для увеличения продуктивности при товарном выращивании объектов аквакультуры.

#### Список литературы

Аликин Ю.С. 2011. Индукторы интерферона на основе РНК – потенциальные противоиные средства в рыбоводстве / Ю.С. Аликин, В.Ф. Подгорный, В.П. Клименко, И.С. Щелкунов, Т.И. Щелкунова // Рыбовод. и рыб. х-во. 2011. № 12. С. 32-41.

Баранникова И.А., Баюнова Л.В., Саенко И.И. 1997. Динамика половых стероидных гормонов у осетра *Acipenser gueldenstaedti* при различном состоянии гонад в начале анадромной миграции в Волгу // Вопр. ихтиологии. Вып. 37. №3. С. 400-406.

Гаврилин К.В., Микряков Д.В., Силкина Н.И., Суворова Т.А. Изменение функциональной активности гуморальных факторов неспецифического

иммунитета карпа *Cyprinus carpio* под влиянием антибактериального препарата и пробиотика // Ветеринария Кубани. 2010. № 6. С. 14-16.

Гончарова М.Н. 2009. Антимикробный препарат для лечения бактериальных болезней рыб // Вестн. Рос. акад. с.-х. наук. 2009. № 2. С. 77-78.

Грушко М.П., Ложниченко О.В., Федорова Н.Н. 2009. Гемопозз у осетровых рыб. Астрахань: «Триада», 190 с.

Иванова Н.Т. 1983. Атлас клеток крови рыб. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 184 с.

Кольман Р., 2006. Влияние биологически активных препаратов на выживаемость и рост личинок и мальков сибирского осетра (*Acipenser baerii* Br.) / Р. Кольман, Г. Кольман, М. Щепковски, А. Дуда // 4 Международная научная конференция "Инновации в науке и образовании – 2006", Калининград, 18-20 окт., 2006: Труды научной конференции. Ч. 1. Калининград. 2006. С. 85-88.

Кондратенко Я.В. 2011. Иммунопрофилактика лососевых рыб в ФГУП ПФЗ "Адлер" / Я.В. Кондратенко; Ю.А. Папазян / Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб: М.: Расширенные материалы 3 Международной конференции, Борок, 18-22 июля, 2011 г. С. 175-176.

Кондратьева И.А., Киташова А.А., Ланге М.А. 2001. Современные представления об иммунной системе рыб // Вест. Московского ун-та. Серия 16. Биология. № 4. С. 11-20.

Кузьмина В.В., Семенова Е.М., Русанова П.В., Микряков Д.В. 2011. Влияние тестостерона на активность гликозидаз и протеиназ кишечника стерляди *Acipenser ruthenus* // Известия РАН. Серия биологическая. № 5. С. 1-7.

Лебедев К.А., Понякина И.Д. 1990. Иммунограмма в клинической практике. М.: Наука, 1990. 224 с.

Лукиянова Н.А. 2007. Пробиотические препараты и микроорганизмы, обладающие пробиотическими свойствами, применяемые в рыбоводстве // Рациональное использование пресноводных экосистем – перспективное направление реализации национального проекта "Развитие АПК" (2007, Москва). Международная научно-практическая конференция, Москва, 17-19 декабря 2007 г.: материалы и доклады / ГНУ ВНИИР Россельхозакадемии. М.: Изд-во Россельхозакадемии. 2007. С. 177-180.

Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Микряков Д.В. 2007. Влияние транспортировки на состав лейкоцитов периферической крови карпа *Cyprinus carpio* L. // Вопр. рыболовства. Т. 8. № 2(30). С. 209-214.

Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Микряков Д.В. 2009. Реакция лейкоцитов стерляди *Acipenser ruthenus* на гормониндуцируемый стресс // Вопр. ихтиологии. Т. 49. № 4. С. 554-557.

Машковский М.Д. 2011. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2011. 1216 с.

Метальникова К.В. 2010. Гистогенез гонад, как ответная реакция на воздействие андрогенами на *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) и *Huso huso* x *Acipenser ruthenus* (Гибрид бестера (F[2])). // Современные проблемы

физиологии и биохимии водных организмов. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. Сборник научных статей. Т. 1 С. 151-162.

Микряков В.Р., Терещенко В.Г., Микряков Д.В. 2005. Использование индекса Шеннона для оценки последствий влияния стресс-факторов на структурную организацию состава лейкоцитов рыб // Вопросы рыболовства. 2005. Т. 6. № 3(23). С. 518-532.

Микряков Д.В., Степанова М.А., Суворова Т.А, Гаврилин К.В. 2010. Влияние антибактериальных препаратов и пробиотиков на заражённость карпа *Suiprinus carpio* эктопаразитами // Теоретические и практические проблемы паразитологии. Материалы Международной научной конференции (30 ноября – 3 декабря 2010 г. Москва). Москва. 2010. С. 235-239.

Сыч А.А. 2007. Влияние иммуномодулирующего препарата "Изатизон" на фагоцитарную активность нейтрофилов и бактериостатическую активность сыворотки крови однолеток карповых рыб / А.А. Сыч, Л.П. Бучацкий, Н.Н. Матвиенко // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов-2: Расширенные материалы Международной научно-практической конференции, Борок, 17-20 июля, 2007. М.. 2007. С. 548-551.

Шпарковский И.А. 1986. Физиология пищеварения рыб. Двигательная активность. Л.: Наука, 176 с.

Юхименко Л., 2009. Что мешает рыбе быть здоровой / Л. Юхименко, А. Литов // Комбикорма. 2009. № 8. С. 51-52.

Arjona F.J., Sangiao-Alvarellos S., Polakov S. et al. 2008. Interaction of short-term testosterone treatment with osmotic acclimation in the gilthead sea bream *Sparus auratus* // Mar. biol. V. 153. P. 661-671.

Haugen T., Andersson E., Norberg B., Taranger G.L. 2011. The production of hermaphrodites of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by masculinization with orally administered 17- $\alpha$ -methyltestosterone, and subsequent production of all-female cod populations // Aquaculture. V. 311. № 1-4. P. 148-154.

Kincade P.W., Medina K.L., Payne K.J. et al. 2000. Estrogen reulates lymphopoiesis. The Menopause at the Millennium: 171-174.

Lin S., Benfey T.J., Martin-Robichaud D.J. 2010. Sex control in Atlantic cod (*Gadus morhua*) // Bull. aquacult. assoc. can. V. 108. № 2. P. 25-28.

Magnadottir B., 2006. Immunostimulation of larvae and juveniles of cod, *Gadus morhua* L. / Magnadottir B., Gudmundsdottir B.K., Lange S., Steinarsson A., Oddgeirsson M., Bowden T., Bricknell I., Dalmo R.A., Gudmundsdottir S. // J. Fish Diseases. 2006. 29, № 3. P. 147-155.

Oliva-Teles A. 2012. Nutrition and health of aquaculture fish / Oliva-Teles A. // J. Fish Diseases. 2012. т. 35. № 2. P. 83-108.

Reshkin S.J., Grover M.L., Howerton R.D. et al. 1989. Dietary hormonal modification of growth, intestinal ATPase, and glucose transport in tilapia // Am. j. physiol. V. 256. P. E610-E618.

Schmidt P.J., Idler D.R. 1962. Steroid hormones in the plasma of salmon at various stages of maturation // Gen. comp. endocrinol. V. 2. P. 204-214.



Sparks R., Shepherd B.S., Ron B. et al. 2003. Effects of environmental salinity and 17 $\beta$ -methyltestosterone on growth and oxygen consumption in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* // *Comp. biochem. physiol.* V. 136 B. P. 657-665.

Vainikka A., Jokinen E.I., Kortet R., Taskinen J. 2004. Gender- and season-dependent relationships between testosterone, oestradiol and immune functions in wild roach // *J. fish biol.* V. 64. № 1. P. 227-240.

Zanardi M.F., Ribeiro Dias-Koberstein T.C., Alves dos Santos M., Braga M.E. 2011. Desempenho produtivo e reversão sexual em tilápias em dois métodos hormonal // *Vet. e zootecn.* V. 18. № 1. P. 45-52.

## **INFLUENCE OF IMMUNOBIOLOGICHESKY PREPARATIONS ON THE CELLULAR LINK OF IMMUNE SYSTEM OF FISHES**

T.A. Suvorova

Influence antibacterial both probiotic preparations and testosterone on structure of peripheral blood and immunocompetent bodies of fishes is investigated. Changes of a share of the maintenance of separate groups of leukocytes are established. Thus found out differences depended not only on an applied preparation, but also from features of the structurally functional organisation of investigated bodies and time which has passed after the beginning of experience.

## **ПРИМЕНЕНИЕ ИНТЕГРАЛЬНЫХ ИНДЕКСОВ СТРУКТУРЫ ЛЕЙКОЦИТОВ ДЛЯ ОПИСАНИЯ ПРОЦЕССОВ, ПРОИСХОДЯЩИХ В ИММУННОЙ СИСТЕМЕ РЫБ**

В.Г. Терещенко, В.Р. Микряков, Д.В. Микряков

*Институт биологии внутренних вод РАН, Борок Ярославской обл., Россия, e-mail: [tervlad@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:tervlad@ibiw.yaroslavl.ru)*

В настоящее время в иммунологии широко применяют современные методы исследования, включая молекулярные. Вместе с тем классические методы не только не утратили своего значения, но и могут получить дальнейшее развитие благодаря новым подходам. В частности, это относится к применению интегральных индексов, которые позволяют сконцентрировать различную информацию в одно число, наглядно представить динамику ответа различных звеньев иммунной системы и анализировать одновременно действие различных стресс-факторов или различных их концентраций в сравнительном аспекте. Одна из важных характеристик, отражающая

функционирование иммунной системы – лейкоцитарная формула. При длительных опытах действие различных стресс-факторов и т.д. приходится рассматривать изменения в большом количестве таблиц, что затрудняет анализ.

Цель работы – продемонстрировать возможность применения интегральных индексов для обобщения изменений в лейкоцитарной формуле и описания процессов, происходящих в иммунной системе рыб.

Материалом для этого послужили литературные табличные данные результатов экспериментов по изучению влияния фенола, нафталина и дихлофоса на состав лейкоцитов крови рыб. Эксперименты по действию на иммунную систему рыб фенола и нафталина проводили на годовиках карася *Carassius carassius*, L. (Балабанова, Микряков, 2000). Концентрация фенола равнялась 3 мг/л, нафталина 10 мг/л, что составляло 1/10 LC<sub>50</sub> за 96 час. Опыты по влиянию дихлофоса проводили на сеголетках (4 мес) тиляпии *Oreochromis mossambicus* (Peters) средней массы 5,4 г и среднего размера 54 мм (Балабанова, Степанова, 2000). Концентрация дихлофоса равнялась 0,46 мг/л, что составляло 1/15 LC<sub>50</sub> за 24 часа (Frumin at all, 1992). Экспозиция в токсиканте в последнем эксперименте составляла 60 суток, а последующие 60 суток рыб содержали в чистой воде. Во всех экспериментах контролем служили особи, находившиеся в воде без добавления токсиканта.

### **Интегральный индекс, описывающий структуру лейкоцитов**

Первая мысль при анализе влияния различных нарушающих воздействий на иммунную систему рыб состоит в желании сконцентрировать изменение в лейкоцитарной формуле в одно число. Тогда при длительном воздействии стресс-факторов не нужно будет сравнивать большое количество таблиц, а можно представить все изменения на одном графике.

Изменения в лейкоцитарной формуле крови могут как число форм лейкоцитов, так и их относительного обилия. В качестве показателя для изучения сходных задач в экологии широко применяется индекс биологического разнообразия,

основанный на функции Шеннона (Pielou, 1977; Джиллер, 1988; Терещенко и др. 1994). Концентрируя информацию о видовой структуре сообщества, он позволяет выявить общую тенденцию развития системы. Таким образом, для описания изменения в лейкоцитарной формуле предлагается индекс биологического разнообразия или «энтропия»:

$$H = -\sum_{i=1}^N \left( \frac{n_i}{N} \right) \times \log_2 \left( \frac{n_i}{N} \right)$$

где  $n_i$  - численность  $i$ -й формы лейкоцитов,  $N$  - суммарная численность лейкоцитов всех форм.

Смысл функции Шеннона заключается в оценке неопределенности структуры системы. При исследованиях структуры лейкоцитов неопределенной будет встреча различных форм лейкоцита. При равной доле всех форм лейкоцитов иммунная система в смысле структуры полностью дезорганизована, ее неопределенность максимальна и равна логарифму числа форм. Если некоторые формы лейкоцитов становятся доминантами, то закон равных вероятностей нарушается, а неопределенность структуры уменьшается. Уменьшение неопределенности можно связать с увеличением структурной организации системы. Поскольку удобно работать с относительным показателем, зависящим в основном от вклада различных форм, то предложен еще показатель «относительная организация» ( $R$ ), который в смысловом отношении является индексом доминирования и определяется по формуле (Антомонов, 1977):

$$R = 1 - H / \log_2 N,$$

Для детерминированной системы, состоящей из одной доминирующей формы лейкоцитов, а остальных представленных единичными клетками, этот показатель приближается к 1. Для полностью дезорганизованной, т.е. при равном вкладе всех форм лейкоцитов, показатель равен 0.

Рассмотрим для примера влияния фенола и нафталина на состав лейкоцитов белой крови карася. Ранее при применении стандартных методов исследования были выявлены изменения в

соотношении отдельных типов клеток: лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов и моноцитов (рис. 1).

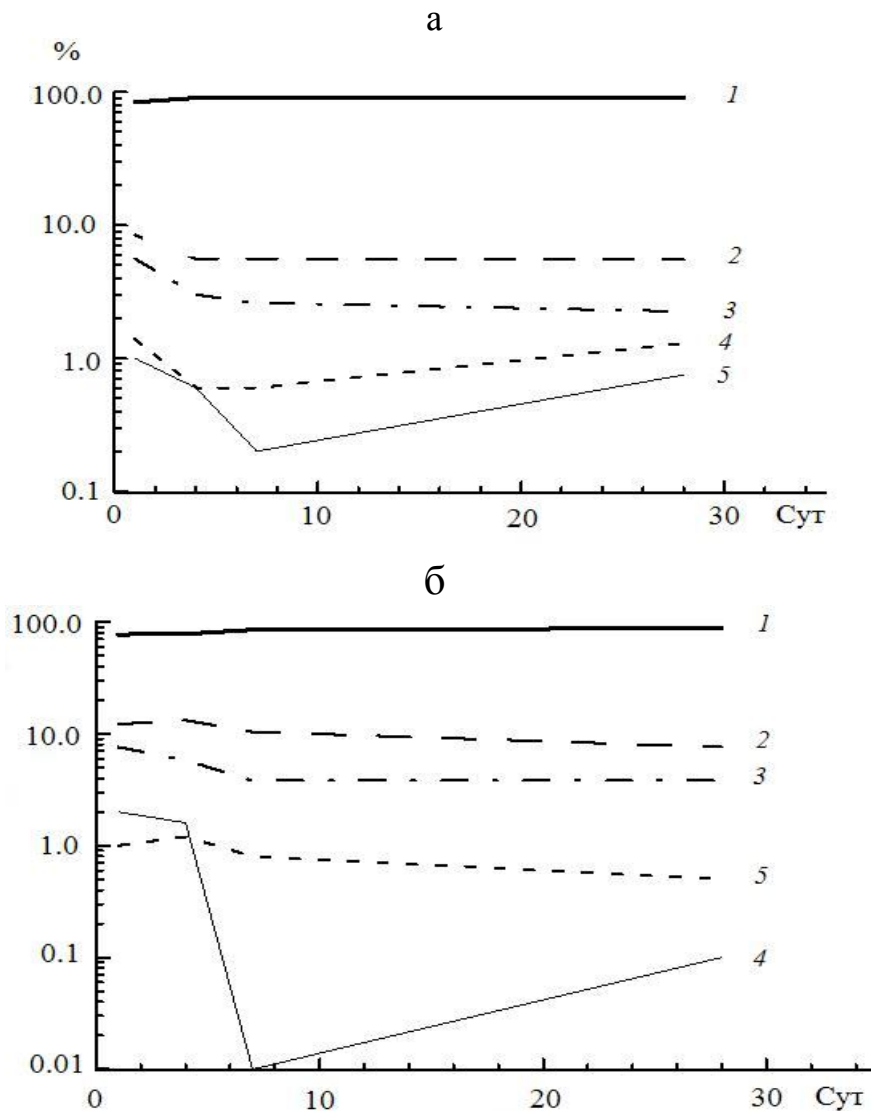
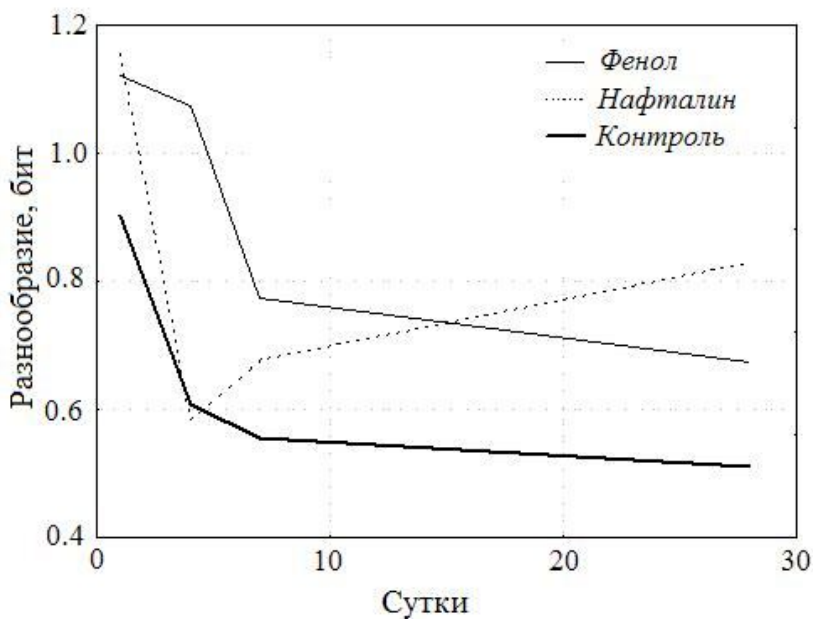


Рис. 1. Динамика различных форм лейкоцитов крови карпа в контроле (а) и при воздействии фенола (б). 1 – лимфоциты, 2 – нейтрофилы, 3 – эозинофилы, 4 – моноциты, 5 – бластные формы.

Установлено, что на четвертые сутки после начала воздействия фенола наблюдались достоверные различия при

уровне значимости  $p < 0,05$  в доле лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов по сравнению с контролем, а на седьмые сутки – достоверно отличалось соотношение только лимфоцитов и нейтрофилов (Балабанова, Микряков, 2000). Следовательно, анализ изменений в численности различных форм лейкоцитов при действии фенола позволяет только констатировать различие в лейкоцитарной формуле контрольных и опытных рыб на четвертые сутки эксперимента. Интегральные характеристики структуры лейкоцитов крови карася (индекс разнообразия и относительная организация) наглядно демонстрирует то, что реакция иммунокомпетентных клеток иммунной системы рыб при воздействии фенола во время всего опыта отличалась от таковой контрольных рыб (рис. 2). Однако, к концу эксперимента на 28 сутки интегральные показатели структуры лейкоцитов белой крови опытных рыб приближаются к состоянию контрольных рыб.

а



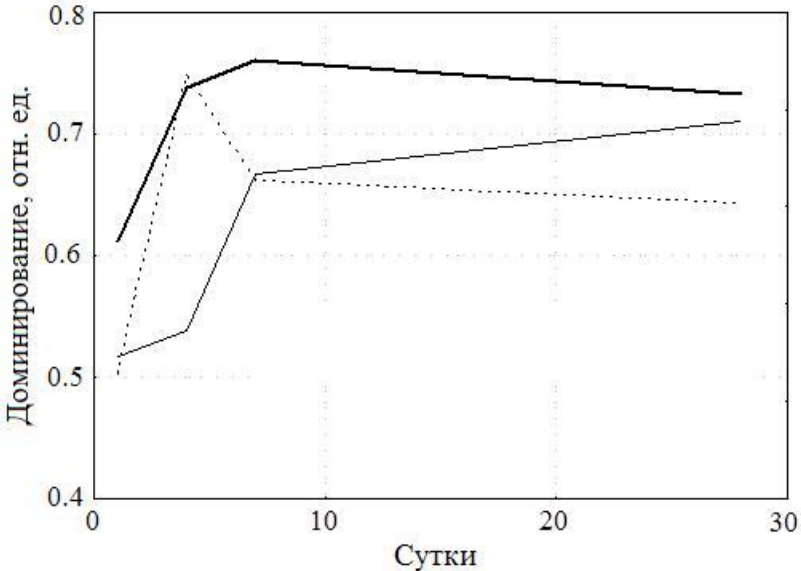


Рис. 2. Динамика индексов разнообразия (а) и доминирования (б) состава лейкоцитов белой крови карася при воздействии фенола и нафталина (по: Микряков и др., 2002).

При воздействии же нафталина интегральные характеристики структуры лейкоцитов крови к концу эксперимента не приближаются к таковым контрольных рыб. Таким образом, применение интегральных индексов позволило получить новые результаты по сравнению с ранее применяемыми методами исследования.

### Параметрический фазовый портрет структуры лейкоцитов

Информация о структуре лейкоцитов, свернутая в число с помощью предложенных индексов разнообразия или доминирования, позволяет наглядно представить реакцию двух или трех звеньев иммунной системы рыб на действие стресс-факторов с помощью двух или трех мерного фазового портрета. В экологии нередко анализируется поведение системы в фазовом пространстве (Одум, 1975). При этом фазовое пространство может быть любое. Его координатами могут быть, например, численности отдельных видов или продукция и биомасса (Gilpin et al, 1982; Knut, 1997; Portrait et al, 1999). При анализе динамики

численности двух видов если их обилие изменяется однонаправлено и синхронно, то траектория системы на фазовом портрете будет прямая линия, наклоненная под острым углом к оси абсцисс (Knut, 1997). Аналогично если изменения в обоих звеньях иммунной системы идут однонаправлено и синхронно, то на фазовом портрете будет прямая линия. Рассмотрим взаимодействие различных звеньев иммунной системы рыб, в частности, периферической крови и РЛТ селезенки. Для этого по одной из координат откладываем, например, разнообразие структуры лейкоцитов белой крови, а по другой – РЛТ селезенки. Рассмотрим результаты влияния дихлофоса на иммунокомпетентные клетки тилапии. Ранее показано, что при экспозиции рыб в растворе дихлофоса на 30-е сутки эксперимента обнаружены изменения в составе клеток белой крови и селезенки. В селезенке появились макрофаги и снизилось число миелоцитов, а в белой крови увеличилось число нейтрофилов. Через 45 суток экспозиции рыб в растворе токсиканта в селезенке и периферической крови отмечено достоверное снижение количества лимфоцитов и увеличение числа клеток миелоидного ряда: миелоцитов в селезенке и нейтрофилов в крови. Кроме того, в селезенке встречались макрофаги, а в крови возросло количество моноцитов (Балабанова, Степанова, 2000). Динамика информационных показателей отражает описанные выше перестройки в структуре лейкоцитов крови и селезенки тилапии при действии дихлофоса (Степанова, Терещенко, 2001). В ходе всего эксперимента по изучению влияния дихлофоса отмечалось увеличение различия в ответе клеточного звена экспериментальных рыб по сравнению с контрольными. При помещении рыб в чистую воду после 60 суток экспозиции в воде с токсикантом наблюдается уменьшение различия в структуре лейкоцитов опытных и контрольных рыб. При действии же нафталина различия в структуре лейкоцитов контрольных и опытных рыб невелики.

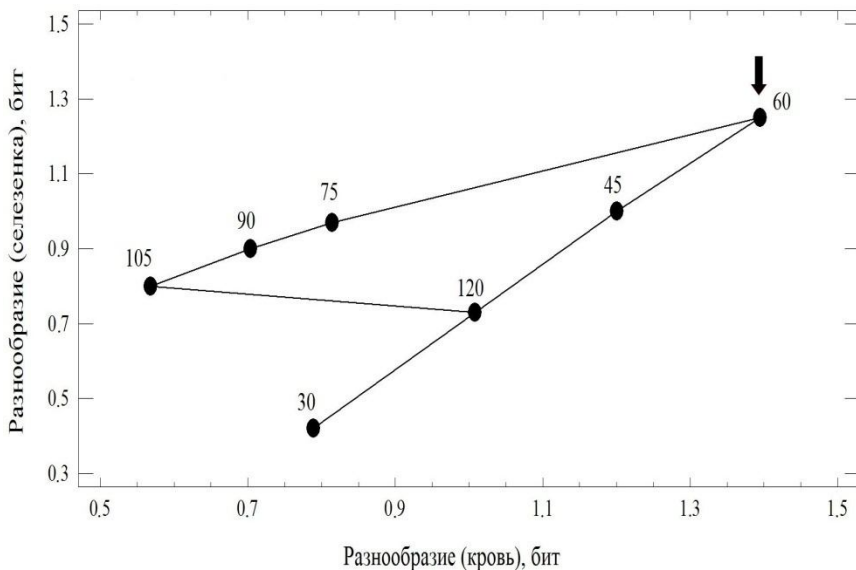


Рис. 3. Параметрический фазовый портрет изменения структуры лейкоцитов белой крови и РЛТ селезенки тилапии при действии дихлофоса. Цифры у кривой – сутки после начала эксперимента. Стрелка – время помещения рыб в чистую воду.

Однако, необходимо отметить, что при действии нафталина и дальнейшем помещении рыб в чистую воду к концу эксперимента, т.е. на 120 сутки наблюдаются различия в соотношении различных форм селезенки опытных рыб по сравнению с контрольными, тогда как после действия дихлофоса состояние иммунокомпетентных клеток крови опытных рыб к этому времени приближается к уровню значений контрольных рыб. Траектория движения иммунной системы на фазовом портрете представляет собой кривую типа «гистерезиса» (рис. 3). Траектория движения системы при действии токсиканта отличается от траектории в чистой воде. Это говорит о наличии сдвига во времени и величине в реакции белой крови и РЛТ селезенки.

Таким образом, на примере изучения влияния фенола, дихлофоса и нафталина на состав лейкоцитов периферической крови рыб показана принципиальная возможность применения интегральных индексов структуры лейкоцитов для исследования



динамики дестабилизационных процессов, происходящих в иммунной системе рыб. Какую же новую информацию дало использование структурных индексов по сравнению с ранее полученными выводами?

Обычно результаты экспериментов по изучению изменений в структуре лейкоцитов крови при действии различных факторов среды представляют в виде таблицы. Поскольку опыты проводят на нескольких рыбах, то есть возможность сравнить по критерию Стьюдента обилие различных форм лейкоцитов в эксперименте и контроле. Что исследователи и делают, отметив в таблице звездочкой достоверные различия в соотношении форм лейкоцитов. Однако при длительных экспериментах, в которых изучается влияние разных токсикантов, оперирование большим массивом информации становится затруднительным. Свернутая же информация в виде интегральных индексов структуры лейкоцитов позволяет наглядно представить ответ иммунной и кроветворной систем в виде графиков. Таким образом, использование количественных показателей, основанных на лейкоцитарной формуле крови, упрощает оперирование большим объемом информации, полученной в результате длительных экспериментов, и позволяет проводить сравнение реакции рыб при действии нескольких факторов.

Если анализировать только динамику относительной численности различных форм лейкоцитов при воздействии фенола (рис. 1), то можно сказать, что наблюдаются определенные изменения на 4 сутки эксперимента в соотношении форм лейкоцитов у опытных рыб по сравнению с контролем. Свернутая информация об их относительной численности показала, что на протяжении всего периода исследования наблюдались различия в структуре лейкоцитов опытных и контрольных рыб, причем со временем происходило монотонное уменьшение этого различия при действии фенола, а при действии нафталина уменьшения различия не произошло. Таким образом, с одной стороны применение интегральных характеристик дает более наглядный и чувствительный метод оценки различия состояния лейкоцитов, а с другой стороны позволяет получить дополнительную информацию об относительной силе воздействия

и характере реагирования клеток иммунной системы на различные воздействия. Кроме того, видно (рис. 2), что даже у контрольных рыб в течение эксперимента в составе клеток белой крови проходили определенные изменения. Первую неделю наблюдался рост индекса относительной организации и уменьшение индекса разнообразия, а в дальнейшем отмечалась стабилизация обоих индексов структуры лейкоцитов. Возможно, это связано со стрессорной реакцией, обусловленной пересадкой рыб в аквариумы, или изменения условий их содержания. Если верно первое утверждение, то можно заключить, что время адаптации рыб к условиям их содержания в первом приближении может быть оценено в 7 суток. Интересно отметить, что и по результатам исследований В.В. Хлебовича (1981) время адаптации рыб к солености укладываются в срок 1-3 недели. Более того, существует множество примеров, показывающих, что вспышки инфекционных болезней в прудах отмечаются через неделю после проведения различных рыбоводных работ в них.

Следует отметить, что оба предложенных индекса дают сходную информацию, поэтому в исследованиях можно ограничиться только одним. В случаях, когда количество форм лейкоцитов не изменяется, достаточно анализировать только индекс «относительная организация» структуры лейкоцитов или доминирования. В случаях, когда идет изменение и в количестве форм лейкоцитов, индекс «разнообразие» структуры лейкоцитов даст дополнительную информацию о состоянии кроветворной и иммунной систем. Наибольший интерес на наш взгляд представляет неожиданный вывод о том, что наибольшая разбалансировка в структуре клеток иммунной системы рыб к концу опыта вызвана действием нафталина по сравнению с действием фенола и дихлофоса. Ранее на основании проведенных экспериментов нами сделан противоположный вывод (Балабанова, Микряков, 2000). Однако, анализ динамики разнообразия форм лейкоцитов показывает, что к концу эксперимента наблюдается увеличение различия в ответе клеточного звена иммунной системы рыб при действии нафталина по сравнению со структурой лейкоцитов контрольных рыб. Это, вероятно, связано с особенностями механизма их

иммунотоксического эффекта. Известно, что токсичность нафталина вызвана главным образом действием на компоненты крови и нейросекреторные органы (Di Michele, Taylor, 1978), тогда как фенол оказывает опосредованное влияние на иммунную систему рыб (Гончаров, Микряков, 1970). Это ставит задачу более тщательного анализа действия фенола и нафталина на структурно-функциональное состояние кроветворной иммунной систем рыб, постановки дополнительных экспериментов и дальнейшего осмысления полученных результатов. В качестве гипотезы, объясняющей полученные результаты, можно предположить, что полиароматические углеводороды вызывают необратимые изменения в регуляции лейкопоэтической функции и, как следствие, дезорганизацию структурного разнообразия лейкоцитов рыб. Интересно в связи с этим отметить, что и в серии экспериментов по оценке влияния нафталина и дихлофоса после помещения рыб в чистую воду к концу эксперимента, т.е. на 120 сутки, сохраняются отличия в соотношении форм лейкоцитов в селезенке опытных рыб по сравнению с контролем. Тогда как после действия дихлофоса индексы разнообразия и относительной организации опытных рыб к этому времени приближается к состоянию характерному для таковых контрольных рыб.

Информация о структуре лейкоцитов, свернутая в число с помощью предложенных индексов, позволяет подойти к анализу взаимосвязанности различных звеньев иммунной системы. Наглядно представить их реакцию на действие стресс-факторов теперь можно с помощью параметрического фазового портрета. Следовательно, теперь можно решать такие задачи, которые при оперировании только табличными данными было весьма затруднительно.

Кроме того, полученные результаты позволяют более обоснованно подойти к планированию последующих экспериментов. Из анализа интегральных характеристик соотношения форм лейкоцитов видно, что первую неделю в составе клеток иммунной системы даже у контрольных рыб идут переходные процессы. Поэтому в дальнейшем при решении многих задач, связанных с оценкой последствий токсических и других стресс факторов на рыб, следует начинать отбор проб по

истечения этого срока. Вместе с тем для изучения природы равновесного состояния иммунной системы и ее динамики после недельной экспозиции рыб в экспериментальных условиях необходимо оперировать более дробные по времени данными о соотношении различных форм лейкоцитов в крови рыб.

Уже имеющиеся данные позволяют сделать предварительный вывод об изменении равновесного состояния (нормы) соотношения форм лейкоцитов крови рыб в связи с их систематическим положением. Для молоди карася и тиляпии «норма» индекса «относительная организация» структуры лейкоцитов соответствует значениям 0,7 - 0,75, а для сибирского осетра – 0,5 - 0,6. Для человека, судя по имеющимся данным, «норма» индекса «относительная организация» структуры лейкоцитов соответствует значению 0,4 (Сороко, 1984).

#### Список литературы

Антомонов Ю.Т. 1977. Моделирование биологических систем. Киев: Наукова думка. 248 с.

Балабанова Л.В., Микряков В.Р. 2000. Сравнительная характеристика действия нафталина и фенола на показатели белой крови карася // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре. Тезисы научно-практической конференции. М.. С 39-40.

Балабанова Л.В., Степанова В.М. 2000. Хроническое действие нафталина и дихлофоса на иммунокомпетентные клетки мозамбикской тиляпии (*Oreochromis mossambicus* (Peters)) // Биол. Внутр. Вод. № 4, С. 146-155.

Гончаров Г.Д., Микряков В.Р. 1970. Влияние малых концентраций фенола на антителообразование у карпа (*Cyprinus carpio* L). В кн.: Вопросы водной токсикологии. М., Наука. С. 171-175.9.

Джиллер П. 1988. Структура сообществ и экологическая ниша. М.: Мир. 188 с.

Микряков В.Р., Терещенко В.Г., Микряков Д.В., Балабанова Л.В. 2002. Опыт применения интегральных показателей структуры лейкоцитов для анализа динамики реакции иммунной системы рыб на токсиканты //Биология внутренних вод. № 4. С. 84-88.

Одум Ю. 1975. Основы экологии. М.: Мир. 650 с.

Сороко Е.М. 1984. Структурная гармония систем. Минск: Наука и техника. 264 с.

Степанова В.М., Терещенко В.Г. 1994. Динамика индекса разнообразия лейкоцитов мозамбикскоц тиляпии *Oreochromis mosambicus* (Peters) при хроническом действии нафталина, дихлофоса и кадмия. "Проблемы биологии, химии, экологии и экологического образования". Ярославский государственный университет 2001. с. 216-219.

Терещенко В.Т., Терещенко Л.И., Сметанин М.М. 1994. Оценка различных индексов для выражения биологического разнообразия сообщества // Биоразнообразие: Степень таксономической изученности. М. С. 86-98.

Хлебович В.В. 1981. Акклимация животных организмов. Л. Наука. 136 с.

Frumin G.T. et al., 1992. New rapid method to evaluate the median effects concentration of xenobiotics in hydrobionts // Bull. Contam. Toxicol. V. 49. P. 236-237.

Di Michele Z., Taylor M.Y. 1978. Histopathological and physiological responses of *Fundulus heteroclitus* to naphthalene exposure // J. Fish. Res. Board Can., V. 35. № 8. P. 1060-1066.

Gilpin, M., Case, T., Bender, E.A. 1982. Counterintuitive oscillations in systems of competition and mutualism. // Am. Nat. 119: P. 584-588.

Knut L. 1997. Defining and measuring species interactions in aquatic ecosystems // Can. J. Fish. Aquat. Sci. V. 54. P. 1513-1519.

Pielou E.G. 1977. Mathematical Ecology. New York. 385 p.

Portrait V., S. Gendron-Gaillard, G. Cottenceau, and A.M. Pons. 1999. Inhibition of pathogenic *Salmonella enteritidis* growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains PDF. // Can. J. Microbio. V. 45. P. 988-994.

#### **APPLICATION OF INTEGRATED INDEXES OF THE LEUCOCYTES STRUCTURE FOR DESCRIPTION OF THE PROCESSES IN FISH IMMUNE SYSTEM**

Tereshchenko V.G., Mikryakov V.R., Mikryakov D.V.

The integrated indexes («relative organization» and «diversity») of the leucocytes structure are suggested for analysis of dynamics of a response of the fish immune system to different effects. On an example study of dynamics of fish leucocytes structure caused by long-term experiments is shown, that the application of integrated structural indexes allows to obtain new information on character of the answer of cells of fish immune system on action toxicants. It is shown, that indexes of the leucocytes structure allows to show obviously on a phase portrait simultaneously a response of various links of fish immune system on an operation of stress factors.

# **СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК И ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ И ОРГАНАХ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРЕСНОВОДНЫХ И МОРСКИХ РЫБ СЕМ. ТРЕСКОВЫЕ**

Р.А. Шаяхметов<sup>1</sup>, Д.В. Микряков<sup>2</sup>, Т.А. Суворова<sup>2</sup>,  
А.С. Соколова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>МГУ имени Ломоносова, e-mail: [ranas92@yandex.ru](mailto:ranas92@yandex.ru)

<sup>2</sup>Институт биологии внутренних вод РАН, Борок Ярославской  
обл., Россия

Общеизвестно, что рыбы, обитающие в загрязненных водоемах, отличаются от таковых из чистых акваторий низкими темпами роста, высокой зараженностью паразитами, сокращением продолжительности жизни и увеличением естественной смертности (Романенко, 2004; Adams, 2001). Это обусловлено поллютантиндуцированными патологиями в функционировании иммунологических и биохимических механизмов адаптаций рыб к неблагоприятным факторам среды (Микряков и др., 2001, 2011; Руднева и др., 2005; Силкина, 2012).

В настоящее время при исследовании влияния уровня загрязнения поллютантами пресноводных и морских акваторий на популяции рыб используются иммунологические и биохимические показатели. Оценку проводят по физиологическому состоянию особей, исследуя иммунокомпетентные органы, ткани и клетки, гуморальные факторы иммунитета и состояние липидного обмена, в частности уровень окислительных процессов, содержание антиоксидантов, количество липидов и их фракционный состав в различных тканях и органах (Микряков и др., 2001, 2011, Руднева и др., 2005; Силкина и др., 2012; Kuzminova et al., 2011; Rudneva, Kuzminova, 2011). В этих работах показано, что у рыб из загрязненных акваторий зафиксировано нарушение клеточных и гуморальных факторов иммунитета, липидного обмена, динамического равновесия прооксидантно-антиоксидантной системы.

Количественные показатели происходящих изменений в организме рыб зависят от уровня антропогенного загрязнения и экологических факторов (образа жизни, кормовой базы и т.д.).

В то же время информация о реакции иммунофизиологических механизмов гомеостаза на антропогенное загрязнение у морских и пресноводных рыб одного семейства отсутствует, тогда как сравнительное исследование этих процессов важно для изучения влияния загрязнителей на гомеостатические механизмы адаптации, поиска биоиндикаторов оценки качества среды обитания, а также в экотоксикологических программах и мониторинге состояния здоровья рыб.

Цель работы – сравнительный анализ некоторых иммунобиохимических показателей морских и пресноводных рыб сем. Тресковые на примере наваги и налима.

Исследование проводили на 4 особях налима *Lota lota* L. средней массой  $728 \pm 143$  г, длиной  $45 \pm 4$  см из Рыбинского водохранилища и 5 особях наваги *Gadus navaga* Kolreuter средней массой  $87 \pm 8$  г и длиной  $247 \pm 5$  см из Белого моря. Отлов наваги проводили на Беломорской биологической станции МГУ им. Н.А. Перцова на Белом море в августе 2014 г. с помощью донных удочек с лодки. Налима отлавливали в декабре 2014 г. и январе 2015 г. на Волжском плесе Рыбинского водохранилища с помощью ставных сетей и жерлиц.

Соматические индексы (печени, почки, селезенки) рассчитывали по процентному отношению исследуемого органа к массе рыбы по формуле:  $X = A/B \times 100$ , где  $X$  – индекс органа, %;  $A$  – масса органа, г;  $B$  – масса рыбы, г.

Состав лейкоцитов определяли в мазках периферической крови и мазках-отпечатках почек и селезенки, окрашенных по Романовскому-Гимза. В каждом мазке определяли относительное количество основных типов клеток под тринокулярным световым микроскопом «Биомед-6ПР1-ФК», просчитывая по 200 клеток в каждом препарате.

Содержание ИК в сыворотке крови устанавливали спектрофотометрически при длине волны 450 нм методом селективной преципитации с 7% полиэтиленгликолем по Гриневиц 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). Содержание МДА вычисляли с учетом коэффициента молярной экстинкции МДА ( $1.56 \times 10^5/\text{М см}$ ) и выражали в наномолях на 1 г ткани.

О состоянии процессов антиоксидантной защиты (АЗ) судили по кинетике окисления субстрата восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха по общепринятой методике (Семенов, Ярош, 1985), адаптированной для рыб. Сущность метода заключается в том, что чем выше скорость окисления субстрата в присутствии биологического материала, тем ниже содержание антиоксидантов в тканях. Гомогенат получали путем растирания тканей с физиологическим раствором в соотношении 1:1. Константу ингибирования окисления субстрата (КОС), являющуюся показателем антиокислительной активности ткани, определяли относительно контроля по формуле:  $K_i = K_{\text{кон}} - K_{\text{оп}}/C$ , где  $K_{\text{кон}}$  и  $K_{\text{оп}}$  – константы скорости окисления субстрата соответственно в контроле и в опыте;  $C$  – концентрация биологического материала в кювете.

Статистическую обработку результатов исследования проводили по стандартным алгоритмам, реализованным в пакете программ (Statistica) с использованием t-теста ( $p < 0.05$ ).

У рыб одними из основных иммунокомпетентных органов, ответственных за реализацию иммунологических функций, являются почка, селезенка и печень. Они богаты клетками ретикулолимфоидной ткани, состоящими из различного типа иммунцитов, эндотелиоцитов, клеток Купфера и т.д., и выполняют разнообразные иммунологические функции: нейтрализация, разрушение и элиминация чужеродного материала, синтез специфических антител интерферона, интерлейкинов, цитотоксических факторов (Микряков, 1991; Кондратьева и др., 2001; Микряков и др., 2001).



В головном и туловищном отделах почки происходит образование всех типов иммунокомпетентных клеток лимфо-миелоидного ряда (Микряков, 1991; Иванова, 1983). Селезенку считают основным местом эритро- и тромбопоэза у рыб, но отмечают ее слабую лимфо-, грануло- и плазмопоэтическую активность (Микряков, Балабанова, 1979; Микряков и др., 2001). У рыб в паренхиме селезенки присутствуют многочисленные мелано-макрофагальные центры. Печень рыб в виде отдельного органа присутствует у всех видов рыб. Как и у млекопитающих, она многофункциональна и принимает активное участие в пищеварительных процессах, синтезе белков плазмы крови, сохранении гомеостатической функции, детоксикации, аккумуляции антигенов и выведения их из организма и т.д. (Микряков, 1991; Арцимович и др., 1992; Маянский, 1992).

Полученные данные показали, что индекс почки наваги по сравнению с налимом выше, а индекс селезенки и печени ниже. Достоверные отличия зафиксированы в индексах печени (табл. 1).

Таблица 1. Морфометрические показатели

Индекс почки	Индекс селезенки	Индекс печени
<u>0,24±0,03</u>	<u>0,10±0,03</u>	<u>2,11±0,24</u>
0,28±0,07	0,20±0,14	4,07±0,74*

Примечание. Здесь и далее в табл.: над чертой – навага, под чертой – налим. \* – достоверные отличия между разными видами рыб

Анализ полученных данных указывает на то, что у пресноводного вида печень развита сильнее. Однако степень развития печени может зависеть и от времени года, кормовой базы и уровня загрязнения водоема.

При исследовании мазков периферической крови и иммунокомпетентных органах у рыб обнаружены лимфоциты, эозинофилы, сегменто- и палочкоядерные нейтрофилы, моноциты и бластные формы клеток, а у налима еще и базофилы (табл. 2).

Полученные данные показывают, что в периферической крови и головном отделе почки наваги по сравнению с налимом выше процентное содержание бластных форм клеток и ниже лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов и эозинофилов, а в селезенке выше моноцитов, палочкоядерных нейтрофилов, эозинофилов, бластных форм клеток и ниже лимфоцитов,

сегментноядерных нейтрофилов. Достоверные отличия содержания нейтрофилов зафиксированы в периферической крови.

Таблица 2. Состав лейкоцитов в периферической крови и иммунокомпетентных органах, %

Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы		Эозинофилы	Бластные формы	Базофилы
		ПЯ	СЯ			
периферическая кровь						
$\frac{83,5 \pm 2,84}{89,5 \pm 1,6}$	$\frac{3,0 \pm 0,86}{5,0 \pm 0,76}$	$\frac{0,1 \pm 0,1}{1,16 \pm 0,16}$ *	$\frac{0,0 \pm 0,0}{0,83 \pm 0,44}$ *	$\frac{0,2 \pm 0,2}{0,33 \pm 0,16}$	$\frac{13,2 \pm 2,29}{3,16 \pm 2,18}$	$\frac{0}{0,0 \pm 0,0}$
почки						
$\frac{88,9 \pm 0,87}{89,0 \pm 3,6}$	$\frac{2,0 \pm 0,41}{4,33 \pm 1,74}$	$\frac{0,5 \pm 0,38}{1,5 \pm 1,04}$	$\frac{0,0 \pm 0,0}{0,83 \pm 0,6}$	$\frac{0,0 \pm 0,0}{0,33 \pm 0,33}$	$\frac{8,6 \pm 1,08}{4,33 \pm 1,48}$	$\frac{0}{0,16 \pm 0,16}$
селезенка						
$\frac{85,9 \pm 2,67}{92,0 \pm 3,12}$	$\frac{3,3 \pm 0,87}{3,0 \pm 0,76}$	$\frac{0,9 \pm 0,36}{0,83 \pm 0,44}$	$\frac{0,1 \pm 0,1}{0,16 \pm 0,16}$	$\frac{0,70 \pm 0,25}{0,0 \pm 0,0}$	$\frac{9,1 \pm 2,54}{1,66 \pm 0,16}$	$\frac{0}{0,33 \pm 0,16}$

Исследованиями показано, что лейкоциты рыб тонко реагируют изменением интенсивности лейкопоза, перестройкой состава и величины содержания отдельных типов клеток на изменение физико-химических характеристик воды, воздействие разных по природе и происхождению биотических и абиотических стресс факторов.

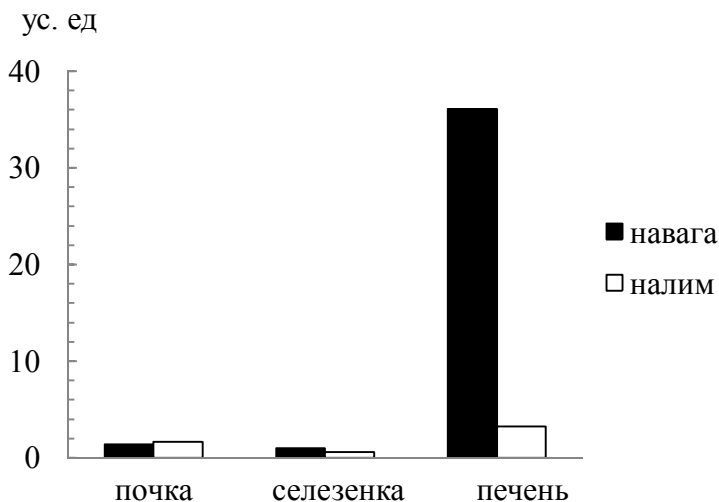


Рисунок 1. Уровень содержания ИК.

Следует также отметить, что состав лейкоцитов налима представлен такими же типами лейкоцитов, как и у других пресноводных видов рыб (Иванова, 1983), а отсутствие базофилов у наваги аналогично другим морским видам (Точилина, 1994; Гордеев и др., 2014; Barber et al., 1981). Это позволяет говорить о необходимости учета этих особенностей при возможном использовании показателей крови в системе гидробиологического мониторинга.

Полученные данные показали, что содержание ИК в печени наваги выше по сравнению с налимом, тогда как в почках и селезенке значительных различий не обнаружено (рис. 1).

Известно, что ИК состоят из антигена, антител и связанных с ними компонентов системы комплемента. Данные комплексы выполняют важную роль в процессах регуляции иммунных реакций, элиминации ксенобиотиков из организма и поддержании иммунофизиологического гомеостаза. Избыточное содержание ИК наблюдается при насыщении организма чужеродными компонентами, в том числе инфекционными и токсическими агентами, и обусловлено снижением клиринговой функции фагоцитов (Микряков, 1991; Логинов и др., 1999; Ройт и др., 2000; Микряков и др., 2001). Высокие количественные характеристики ИК в печени наваги свидетельствуют о наличии патологического процесса. Возможно, это связано уровнем антропогенного загрязнения акватории, в которой была выловлена рыба.

Полученные данные показали, что уровень содержания МДА в почке, селезенке и печени налима достоверно выше по сравнению с навагой (рис. 2).

Повышенное содержание МДА в исследуемых органах свидетельствуют об активации ПОЛ. Как известно, при неблагоприятных воздействиях в организме рыб происходит интенсификация свободно-радикальных процессов, сопровождающихся накоплением продуктов ПОЛ и дефицитом антиоксидантов (Руднева и др., 2005; Rudneva, Kuzminova, 2011). Высокое содержание продуктов перекисидации липидов у налима вероятно связано с интенсивным метаболизмом, происходящим во время нереста.

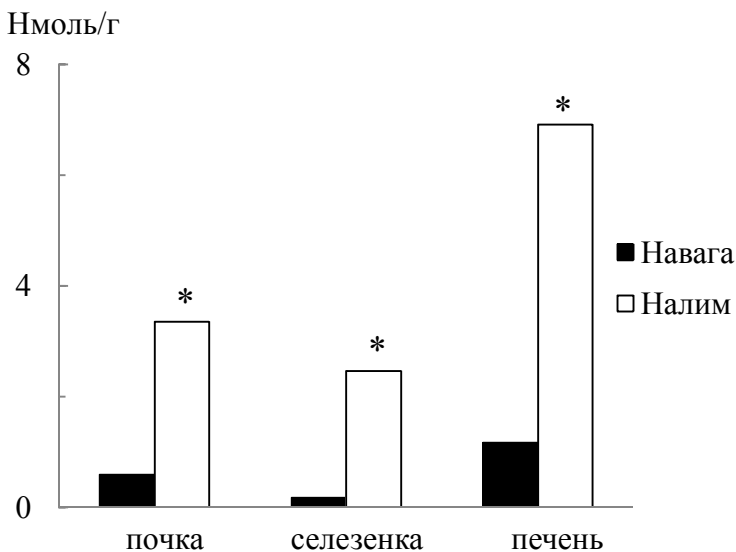


Рисунок 2. Содержание МДА.

Полученные данные показали, что показатель КОС в почке, селезенке и печени наваги выше по сравнению с налимом (рис. 3). Достоверные отличия зафиксированы в селезенке.

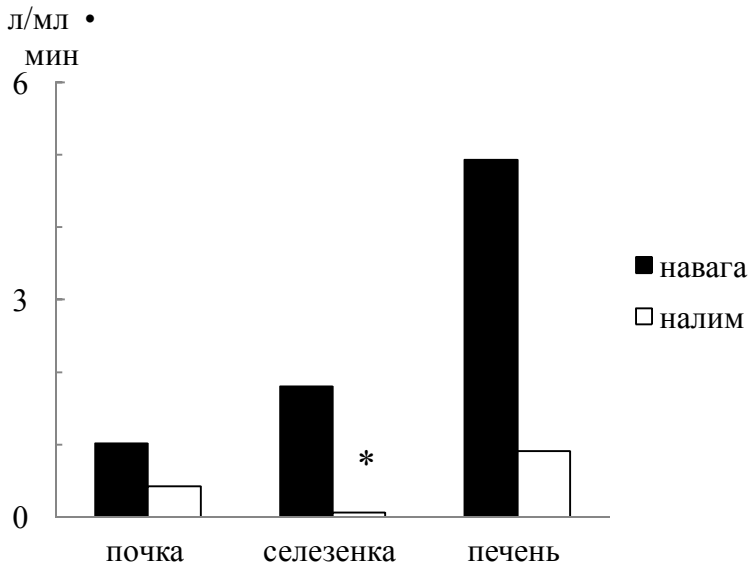


Рисунок 3. Показатель КОС.

Известно, что интенсификации процессов перекисления липидов препятствует многоуровневая система антиоксидантной защиты, состоящая из антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза) и низкомолекулярных антиоксидантных соединений (восстановленный глутатион, б-токоферол, фенольная форма коэнзима Q<sub>10</sub>, б-каротин, аскорбиновая кислота и др.) (Руднева и др., 2005; Меньшикова и др., 2008; Winston, 1991;). Антиоксидантной системе принадлежит важная роль в реализации адаптивных компенсаторных реакций в организме, поскольку компоненты этой системы участвуют в регуляции процессов метаболизма. О высоком уровне содержания антиоксидантов в тканях налима свидетельствуют низкие показатели КОС.

Изменение соотношения между ПОЛ и активностью АЗ тканей считается одним из чувствительных индикаторов, отражающих влияние неблагоприятных стресс-факторов на метаболические процессы и состояние здоровья рыб. Важный механизм регуляции метаболических процессов в любом организме – динамическое равновесие окислительно-восстановительного баланса, обеспечиваемое прооксидант-антиоксидантной системой (Барабой и др., 1992). При оптимальных условиях соотношение этих систем жизнеобеспечения поддерживается на стационарном минимальном уровне (Меньшикова и др., 2008; Winston, 1991; Fiho 1996). При действии негативных стресс-факторов происходит активация процессов окислительного стресса, которая связана с избыточным накоплением АФК и снижением активности ферментных и неферментных антиоксидантов.

Выявленные отличия между показателями у исследуемых видов рыб, вероятно, связаны с сезоном года, так как навага отловлена в нагульный период, а налимом преднерестовый – нерестовый. В нагульный период у рыб происходит накопление энергетических ресурсов, а в нерест идет активное расходование энергии на размножение. Поэтому во время нереста рыба максимально ослаблена, в том числе иммунная защита.

Все это позволяет говорить о необходимости более детальных сравнительных исследований иммунологических показателей, которые могут быть использованы в качестве биотеста при мониторинге состояния водной среды и состояния здоровья рыб.

#### Список литературы

1. Андреева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. 1988. № 11. С.41–43.
2. Арцимович Н.Г., Настоящая Н.Н., Казанский Д.Б., Ломакин М.С. Печень как орган иммунобиологической системы гомеостаза // Успехи соврем. биологии. 1992. Т. 112, № 1. С. 88-99.
3. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г. и др. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука, 1992. 148 с.
4. Гордеев И.И., Микряков Д.В., Балабанова Л.В., Микряков В.Р. Состав лейкоцитов периферической крови антарктического клыкча *Dissostichius mawsoni* Norman, 1937 (Nototheniidea) // Вопр. ихтиологии. 2014. Т. 54, № 4. С. 479-482.
5. Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело. 1981. № 8. С. 493–496.
6. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1983, 184 с.
7. Кондратьева И.А., Киташова А.А., Ланге М.А. Современные представления об иммунной системе рыб // Вест. Моск. ун-та. сер. 16. Биология. 2001. № 4. С. 11-20.
8. Логинов С.И., Смирнов П.Н., Трунов А.Н. Иммунные комплексы у животных и человека: норма и патология. Новосибирск: Сиб. отд-ние Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Россельхозакадемии. 1999. 144 с.
9. Маянский А.Н. Иммунологические свойства синусоидных клеток печени // Успехи соврем. биологии. 1992. Т. 112, № 1. С. 52-61.
10. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
11. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск. 1991. 153 с.
12. Микряков В.Р., Балабанова Л.В. Клеточные основы иммунитета у рыб // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л.: Наука, 1979. с. 57-64.
13. 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.
14. Микряков В.Р., Силкина Н.И., Микряков Д.В. Влияние антропогенного загрязнения на иммунологические и биохимические

механизмы поддержания гомеостаза у рыб Черного моря // Биология моря. 2011. Т. 37. № 2. С. 142-148.

15. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М.: Мир. 2000. 592 с.

16. Романенко В.Д. Основы гидроэкологии. Киев: Генеза, 2004. 664 с.

17. Руднева И.И., Шевченко Н.Ф., Залевская И.Н., Жерко Н.В. Биомониторинг прибрежных вод Черного моря // Вод. ресурсы. 2005. 32, № 2. С. 238-246.

18. Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Укр. биохим. журн. 1985. 57, № 3. С. 50-52.

19. Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние антропогенного загрязнения на окислительные процессы в печени рыб Рыбинского водохранилища // Экология. 2012. № 5. С. 361-365.

20. Точилина Л.В. Лейкоцитарная формула морских рыб // Гидробиол. журн. 1994. Т. 30. № 3. С. 50-57.

21. Adams S.M. Biomarker/bioindicator response profiles of organisms can help differentiate between sources of anthropogenic stressors in aquatic ecosystems // Biomarkers. 2001. № 6. 33-44.

22. Barber D.L., Westermann J.E., White M.G. The blood cells of the Antarctic icefish *Chaenocephalus aceratus* Zönnberg: light and electron microscopic observations // J. Fish Biol. 1981. V. 19. № 1. P. 11-28.

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

24. Kuzminova N., Rudneva I.I., Salekhova L. et al. State of Black Scorpion fish (*Scorpaena porcus* L., 1758) inhabited coastal area of Sevastopol region (Black Sea) in 1998-2008 // Turkish J. of Fisheries and Aquatic Sci. 2011. № 11. P. 101-111.

25. Rudneva I.I., Kuzminova N.S. Effect of chronic pollution on hepatic antioxidant system of Black Sea fish species // Int. J. of Sci. and Nature. 2011. 2, № 2. P. 279-286.

26. Winston G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Comp. Biochem. Physiol. 1991. 100, № 1-2. P. 173-176.

## **ИЗУЧЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ АЭРОМОНАД ПО СТЕПЕНИ ДНК-АЗНОЙ АКТИВНОСТИ**

Л.Н. Юхименко

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства», п. Рыбное, Россия*

Бактерии рода *Aeromonas* являются одним из компонентов бактериальной флоры воды и обнаруживаются практически во всех водоемах, особенно загрязненных органическими

веществами. В интенсивно эксплуатируемых рыбоводных прудах количество аэромонад колеблется от нескольких сотен до тысяч микробных клеток в 1 мл воды (Юхименко и др. 1987; Каховский, 1991). Благодаря биохимической активности, аэромонады способствуют разложению органических веществ и самоочищению воды. В то же время хорошо известна роль аэромонад в этиологии различных патологичтепловкровных животных, в том числе и у человека (Калина, 1974). При этом штаммы аэромонад, выделенные от здоровой и больной рыбы и из воды, различаются по вирулентности.

К факторам вирулентности у аэромонад могут быть отнесены желатиназа, казеиназа, липаза, лецитиназа, дезоксирибонуклеаза (ДНКаза), рибонуклеаза (РНКаза), гемолизины, цитотоксины и энтеротоксины.

Для изучения вирулентности бактерий было предложено множество методов: постановка биопробы, определение ДНКазной активности и так называемых ферментов патогенности, токсинов, способность к размножению в культуре клеток. Установлена взаимосвязь патогенности бактерий с белковым составом, для определения которой используется метод диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ДЭПААГ) (Смирнов, Юхименко, 1988). Благодаря этому методу, мы смогли установить три группы аэромонад.

К **первой группе** относятся облигатные патогены, высоковирулентные аэромонады, сохраняющие свою вирулентность в течение длительного времени (в нашем случае более 20 лет) и вызывающие при проведении биопробы контактным методом 100% гибель опытной рыбы. Такие штаммы были нами выделены всего три раза – в Молдавии от белого толстолобика с ярко выраженной клинической картиной, в Дагестане и Туркмении от карпа.

**Вторая группа** – это штаммы с приобретенной или индуцированной вирулентностью, которые приобретают свои свойства в результате воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды или пассирования через организм рыбы. Такие штаммы в момент выделения могут быть высоковирулентными, но в процессе хранения на искусственных



средах снижают или вообще могут потерять свою вирулентность. Биопроба контактным методом дает отрицательный результат.

**Третью группу** составляют аэромонады – представители нормального биоценоза воды или кишечника рыб, не обладающие вирулентными свойствами при первичном выделении, однако при создании соответствующих условий аэромонады третьей группы могут перейти во вторую и обратно (Юхименко, Койдан, 1997).

Сложность и трудоемкость изучения биологических свойств аэромонад путем постановки биопробы заставили нас обратиться к изысканию модели, позволяющей упростить этот вид исследований. Таковой явилась ДНКазная активность (Мессинаова, Юсупова, 1963; Jeffris, 1957).

Изучение ДНКазной активности, контролируемой постановкой биопробы на карпах, энзиматической активности и белкового спектра с помощью ДЭПААГ позволило получить более полную характеристику свойств аэромонад и подтвердить наблюдения, касающиеся патогенеза заболеваний, вызываемых аэромонадами (Юхименко, Викторова, 1987).

Культуры, образующие зону деполимеризации до 3 мм – слабовирулентные, могут не вызывать развития клинических признаков у рыб; при зоне деполимеризации до 5 мм – вирулентные и в биопробе ведут себя вариабельно; при зоне деполимеризации более 5 мм – высоковирулентные, способные вызывать признаки острого заболевания и даже гибель опытной рыбы. Первые годы проводили параллельные исследования по ДНКазной активности выделенных культур и их способности вызывать патологический процесс у рыб в биопробе. Всего параллельно было испытано около 1 500 культур аэромонад, выделенных от больной и здоровой рыбы и из воды рыбохозяйственных водоемов. При этом было выявлено, что вирулентные по ДНКазной активности аэромонады, выделенные из патматериала от рыб с острыми клиническими признаками, дают положительный ответ и при постановке биопробы на рыбах. В то же время аэромонады, выделенные от клинически здоровой рыбы и из воды, обладающие довольно высокой ДНКазной активностью, примерно в 30% случаев давали отрицательный

результат, т.е. не всегда вызывали развитие клинических признаков у рыб или их гибель.

С целью изучения эпизоотической роли авирулентных аэромонад в лабораторных условиях был проведен эксперимент. Для этого отобрали 6 штаммов, выделенных от здоровой рыбы и из воды прудов, с ДНКазной активностью: -, -, -, ±, +, ++ и авирулентных в биопробе. Все штаммы было решено пропассировать через организм рыб. Для контроля реизоляции получили тетрациклинустойчивые мутанты путем культивирования их на питательной среде, содержащий тетрациклин с нарастающей концентрацией. Предварительные исследования показали, что на среде с концентрацией тетрациклина 1:400 ничто не растет, и отобранные штаммы адаптировали к этой концентрации. Для этого потребовалось от 9 до 13 пассажей. После получения тетрациклинрезистентных мутантов начали пассирование их через организм карпов. Каждую культуру вводили 3 карпам, через 2 суток проводили реизоляцию аэромонад с последующим заражением трех рыб. Параллельно с повышением вирулентности культур аэромонад увеличивалась и зона деполимеризации ДНК - до 5-7 мм. После 3-4 пассажей они вызывали острые клинические проявления и гибель рыб. Интересно отметить, что индуцированная ДНКазная активность у аэромонад второй группы, выделенных из воды или от здоровых рыб, иногда достигала 13-15 мм, однако в биопробе они не вызывали развития клинических признаков. Однако достаточно было небольшого «толчка», и они уже ничем не отличались от облигатных патогенов. Таким пусковым механизмом являлись стрессирующие факторы среды (перепад температур, недостаток кислорода, токсичные формы азота, органика и др.), а также длительное применение антибактериальных препаратов и т.д. Повышение агрессивности среды вызывает ответную реакцию со стороны микроорганизма, вынуждая его мобилизовать все факторы защиты и агрессии. Чтобы не провоцировать подобные ситуации, необходимо регулярно проводить санитарно-гигиенические мероприятия, не допускать бесконтрольного длительного использования антибиотиков (особенно с профилактической целью), повышать резистентность рыб

экологически чистыми средствами – пробиотиками и вакцинами. Именно из штамма *Aeromonas sobria* 77-18, изолированного от белого толстолобика с острыми клиническими проявлениями в Молдавии (1983 г.) и относящегося к первой группе аэромонад, методом гель-хроматографии на Сефадексе G- 100 была выделена фракция 2 (56 кДа). В ходе экспериментальной проверки фракция 2 обеспечивала высокий уровень защиты от заболевания и была запатентована как вакцина ВЮС 2 (Юхименко, Смирнов, 1997). Исследование иммуногенных свойств фракции 2 показало, что она активирует такие факторы иммунитета у рыб, как антителообразование, синтез лизоцима, адгезию бактериальных патогенов в эпидермальной слизи, миграцию макрофагов в конечный отдел кишечника рыб, фагоцитоз (Гусева, 1998). Белки этой фракции защищали карпов как от гомологичных, так и от гетерологичных штаммов подвижных аэромонад, стимулировали высокий уровень напряженности иммунитета у лососевых рыб к фурункулезу (*A. salmonicida*) и к вибриозу (*Vibrio anguillarum*), обеспечивая в последнем случае 70% защиту при последующем заражении. Защитное действие фракции 2 продемонстрировано также на канальных сомах при энтеросептической инфекции смешанной этиологии, вызванной представителями семейств *Vibrionaceae* и *Enterobacteriaceae*.

При сравнении различных по патогенности штаммов аэромонад первой и второй групп в электрофоретических белковых спектрах было обнаружено до 40 индивидуальных полос. Молекулярные массы (Мм) фракций находились в диапазоне 12-136 кДа. Количество белков с Мм ниже 40 и выше 60 кДа практически одинаково у исследованных штаммов. Специфические отличия у разных по вирулентности штаммов выражались в различной интенсивности окраски белковых зон в диапазоне 47-55,6 кДа. У штамма *A. sobria* 77-18 концентрация этих белков была значительно выше, чем у остальных, что и объясняло широкий диапазон его иммуногенной активности. Именно тем, что многие исследователи пытались создавать вакцины против подвижных аэромонад – штаммов, относящихся ко второй группе, объясняется их низкая эффективность против гетерологичных штаммов.

Таблица 1. Этиологическая структура ДНКазоположительных аэромонад, выделенных от рыб и из воды

Аэромонады	Зоны деполимеризации ДНК (мм)								Всего	
	0 - 1.5		2.0 - 3.5		4.0 - 5.5		6.0 - 13.0			
	N %		N %		N %		N %		N %	
<i>A. sobria</i>	198	17.5	275	24.3	324	28.6	335	29.6	1132	43.4
	231	17.0	291	23.3	385	30.8	361	26.4	1250	44.4
<i>A. eucrenophila</i>	16	35.6	8	17.8	13	28.8	8	17.8	45	1.7
	56	50.5	11	9.9	26	23.4	18	16.2	111	3.9
<i>A. hydrophila</i>	39	16.9	60	25.9	67	29.0	65	28.2	231	8.9
	20	17.2	31	26.7	30	25.9	35	30.2	116	4.1
<i>A. caviae</i>	34	20.9	52	32.1	47	29.1	29	18.0	162	6.2
	26	21.3	33	27.0	37	30.3	26	21.3	122	4.4
A. sp	7	38.9	2	11.1	6	33.3	3	16.7	18	0.7
	13	17.6	14	33.3	27	36.5	20	27.0	74	2.6
A. sp.1	10	12.7	21	26.6	30	37.9	18	22.8	79	3.0
	10	9.1	30	27.3	45	40.9	25	22.7	110	3.9
A. sp.2	36	22.1	43	26.4	44	26.9	40	24.6	163	6.3
	37	26.4	33	23.6	38	27.1	32	22.9	140	4.9
A. sp.3	21	24.4	33	38.4	11	12.8	21	24.4	86	3.3
	25	21.2	42	35.6	20	16.9	31	26.3	118	4.3
A. sp.4	29	20.6	47	33.3	47	33.3	18	12.8	141	5.4
	35	25.7	43	31.6	43	31.6	15	11.1	136	4.8
A. sp.5	71	26.5	75	27.9	82	30.6	40	15.0	268	10.3
	66	33.3	44	22.2	60	22.4	29	22.1	198	7.1
A. sp.6	0	0	2	28.6	1	14.3	4	57.1	7	0.3
	0	0	23	41.8	22	40.0	10	18.2	55	1.9
A. sp.7	19	33.3	29	50.9	3	5.3	6	10.6	57	2.2
	39	41.5	34	36.2	12	12.8	9	9.5	94	3.3
A. sp.8	25	25.8	41	42.3	23	23.7	8	8.2	97	3.7
	32	31.4	44	43.0	15	14.7	11	10.8	102	3.6
A. sp.9	6	31.6	5	26.3	6	31.6	2	10.5	19	0.7
	5	18.5	9	33.3	11	40.7	2	7.5	27	0.9
A. sp.10	0	0	0	0	1		0	0	1	0.4
	0	0	0	0	6		0	0	6	0.2
A. sp.11	32	34.0	28	29.8	28	29.8	6	6.4	94	3.6
	57	39.6	39	27.1	35	24.3	13	9.0	144	5.2
A. sp.12	3	37.5	3	3.5	2	25.0	0	0	8	0.26
	5	38.5	4	30.8	3	23.1	1	7.6	13	0.5
Всего	546	20.9	724	27.8	735	28.2	603	23.1	2608	
	639	22.7	725	25.7	815	28.9	638	22.7	2816	

Примечание: белая строка - культуры, выделенные от рыбы; серая строка - культуры, выделенные из воды

В практических лабораториях нет возможности изучать электрофореграммы выделенных аэромонад. Однако проверка их

биологических свойств путем постановки биопробы контактным методом позволит дать правильную оценку их эпизоотической значимости. При выделении аэромонад первой группы следует накладывать карантин, а во всех остальных - карантинные ограничения, проводить санитарно-гигиенические мероприятия и повышать культуру рыбоводства.

В лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ "ВНИИПРХ" за период с 1980 по 2014 г. по ДНКазной активности было проверено 2608 штаммов аэромонад, выделенных от рыб, и 2816 штаммов, выделенных из воды. Все штаммы относились к 4 видам и 13 биоварам (табл.1). В дальнейшем в соответствии с данными, приведёнными в Определителе бактерий Берджи (1997), биовары *A. sp.* 4 и *A. sp.* 5 соответственно были отнесены к видам *Aeromonas veronii* и *A. schubertii*.

Как показали наши исследования, проведенные в разных зонах, среди культур, выделенных от рыбы и из воды, преобладали *A. sobria*. Реже всего выделялись (по нисходящей) *A. eucrenophila* (1.7% из рыбы и 3.9% из воды), *A.sp.* (0.7% - 2.6%), *A.sp.9* (0.7% - 0.9%), *A.sp.6* (0.3% - 1.9%), *A.sp.10* (0.4% - 0.2%) и *A.sp.12* (0.26% - 0.5%) соответственно.

По степени вирулентности среди культур, выделенных из рыбы, наиболее вирулентными (ДНКазная активность 4 - 13 мм) оказались аэромонады *A. sp.6* (71.4%), *A.sp.1* (60.7%), *A. sobria* (58.2%), *A. hydrophila* (57.2%), *A.sp.2* (51.5%), *A. sp.*(50.0%). Менее 50 % – *A. caviae*, *A. eucrenophila*, *A.sp.4*, *A.sp.5*, *A.sp.9* (47.1 - 42.1%), менее 40% - *A.sp.3*, *A.sp.11*, *A.sp.8* (37.2-31.9%). Высоковирулентные культуры *A.sp.12* от рыб выделялись в 25% случаев.

Из воды наиболее часто выделялись высоковирулентные аэромонады биоваров *A. sp. 1* и *A.sp.* (63.6 -63.5%), более 50% было среди *A.sp. 6*, *A. sobria*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A.sp. 2* (58.2-57.2-56.1-51.6-50.0%). Менее 50% от общего количества ДНКазоположительных культур с высокой вирулентностью было среди биоваров *A. sp. 9*, *5*, *3*, *4* (48.2 - 44.5 - 43.2 - 42.7%). Суммарно среди аэромонад, выделенных от рыбы, 51.3% были высоковирулентны, а среди аэромонад, выделенных из воды, 51.6%. Кроме трёх штаммов, выделенных от рыб в Молдавии,

Дагестане и Туркмении, и отнесённых к первой группе, все остальные были отнесены ко второй группе, хотя после выделения при постановке биопробы они вызывали острые клинические проявления: язвы, экзофтальмию, кровоизлияние в глазном яблоке, ерошение чешуи и асцит. При проведении биопробы с культурами первой группы у рыб отмечалось нарушение координации, судорожные волнообразные сокращения поверхности тела, рыба опускалась на дно и в течение одного-двух часов погибала.

Изучение вирулентности аэромонад имеет большое значение, т.к. позволяет дать правильную оценку эпизоотической ситуации в хозяйстве и грамотно провести соответствующие противоэпизоотические мероприятия. В случае выделения аэромонад первой группы необходим карантин, тогда как при вспышке, вызванной аэромонадами второй группы, достаточно применения карантинных ограничений, курса лечения, а самое главное – проведения санитарно-гигиенических мероприятий. В настоящее время не во всех лабораториях есть возможность изучения электрофореграмм выделенных культур, поэтому наиболее доступным методом исследования является биопроба. При внутрибрюшинном заражении свежевыделенной бульонной культурой 1-й группы гибель рыбы наступает в течение нескольких часов.

Обширная информация отечественных и зарубежных авторов свидетельствует об эпидемиологическом значении аэромонад, поэтому, работая с патологическим материалом, всегда следует очень строго соблюдать правила техники безопасности и личной гигиены.

#### Список литературы

Гусева Н.В. Иммунный ответ рыб – объектов аквакультуры на вакцинацию против бактериальных заболеваний // Диссерт. на соиск. канд. биол. наук. М., 1998. с. 189.

Йоргенсен Дж.Х., Пфаллер М.А. Микробиологический справочник для клиницистов: пер. с англ. М.: Мир. 2006. с. 14-15.

Калина Г.П. Микроорганизмы рода *Aeromonas*, патогенность для человека, патогенез и эпидемиология (обзор зарубежной литературы) // ЖМЭИ, 1974. № 10. с. 105-109.

Каховский А.Е. Профилактика болезней рыб бактериальной этиологии в интенсивно эксплуатируемых прудах // Автореф...канд. дисс. М.: 1991. 20 с.

Мессина О.В., Юсупова Д.В. Дезоксирибонуклеазы патогенных бактерий (обзор литературы) // ЖМЭИ, 1966. № 3. с. 39-43.

Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности // Сб. инструкций по борьбе с болезнями рыб. Ч. 1. М.: Отдел маркетинга АМБ-агро. 1999. 150 с.

Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта и др. М.: Мир, 1997. 800 с.

Смирнов Л.П., Юхименко Л.Н. Временные методические рекомендации по сравнительному анализу штаммов аэромонад методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия // М.: 1988. 14 с.

Юхименко Л.Н. Проблема аэромоназа: итоги исследования //Болезни рыб: Тр.ВНИИПРХ. вып.79. М.: Компания Спутник +. 2004. с. 206-215.

Юхименко Л.Н., Викторова В.Ф., Федорченко В.И. Выделение аэромонад из воды рыбоводных прудов // Болезни рыб и водная токсикология: Тр. ВНИИПРХ. Вып. 50. 1987. с. 37-46.

Юхименко Л.Н., Койдан Г.С. Современное состояние проблемы аэромоназа рыб // Ж.Рыбное хозяйство, серия: Аквакультура. Болезни рыб. М.: ЭКИНАС, 1997, вып.2, с.1-9.

Юхименко Л.Н., Харитонов С.Н., Староверова Г.С. и др. Материалы к изучению роли аэромонад в патологии человека // ЖМЭИ. 1977. № 7. с. 143.

Jeffris C., Holtman D., Puse D. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acid // J.Bacteriol. 1957.v/73. №4. P. 590-591.

## **STUDY OF AEROMONADES VIRULENCE BY DNASA'S ACTIVITIES LEVEL**

L.N. Yukhimenko

Information on biological properties of motility aeromonades isolated from fishes and water of fishfarming reservoirs as well as on epizootical significance of different virulent aeromonades species and biovars. Three groups of aeromonades are characterized on the level of their DNAsa's activities.

## СЕКЦИЯ II. ПРОБЛЕМЫ ОБЩЕЙ И ЧАСТНОЙ ПАТОЛОГИИ

### ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ КЛЕТОК КРОВИ РЫБ В ОЦЕНКЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ОЗЕРА "ТИХОЕ"

Е.В. Барбухо<sup>1</sup>, Н.П. Килочицкая<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Черниговский экономический колледж Национальной академии статистики, учета и аудита, Чернигов, Украина*

<sup>2</sup>*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, УНЦ «Институт биологии», Киев, Украина, e-mail: lena-gun@mail.ru, kilochytska@ukr.net*

При оценке экологического состояния водоемов гематологические показатели имеют очевидные преимущества, так как непосредственно отражают ответ «биоты» на загрязнение. Вместе с тем известно, что неблагоприятное состояние водной среды вызывает различные изменения клеток крови рыб, в частности, нарушение морфологической организации эритроцитов (Лугаськова, 1992; Николаева, 1987; Cavas, 2003; Alkindi et al., 2005). Форменные элементы крови при интоксикации подвергаются дистрофии и некробиозу, в эритроцитах регистрируют анизоцитоз, пойкилоцитоз, шистоцитоз, полихромазию и другие патологические изменения.

Озеро "Тихое" – водоем (1,6 км<sup>2</sup>) из группы Деснянских озер, расположенный в Сосницком районе Черниговской области (Костюшин, 2010). Учитывая многофакторное антропогенное воздействие в бассейне Десны в последние годы (Барбухо, 2014), закономерен вопрос о проведении мониторинговых наблюдений, с целью оценки экологических условий, сложившихся в озере "Тихое". В данном случае, гематологические показатели рыб, в частности различные морфологические изменения клеток крови, в виду своей информативности, могут быть использованы как критерий оценки загрязненности и нарушения качества водной среды.



Целью данного исследования было оценить долю патологически измененных клеток крови у рыб и проанализировать полученные данные для оценки экологического состояния озера "Тихое" за период 2010 года. Материалом для исследования послужили популяции массовых видов рыб половозрелого возраста (щука, судак, окунь, ерш, густера, плотва, лещ, чехонь). Кровь отбирали у живых, внешне здоровых рыб путем пункции сердца. Мазки крови готовили непосредственно на месте сбора ихтиологического материала. Окрашивание мазков проводили по Паппенгейму с использованием красителя-фиксатора Мая-Грюнвальда и рабочего красителя Гимзы-Романовского (Серпунин, 1986). Изучение мазков крови, а также их фотографирование проводилось под цифровым микроскопом Gemoscan Mono (США). Процентное соотношение патологических эритроцитов вычисляли из расчета на 500 эритроцитов. Также определяли процентное соотношение ядерных теней путем их подсчета исходя из 200 клеток.

Исследование мазков крови показало, что ярко-выраженных отклонений в морфологической организации клеток крови рыб не отмечено. В большинстве случаев наблюдались здоровые эритроциты, имеющие правильную (эллипсоидную) форму, одинаковые размеры, цитоплазму серого цвета, равномерную по окраске и плотное удлиненное сине-фиолетовое ядро (рис. 1, I).

Среди выявленных патологий клеток следует отметить пойкилоцитозные (отличающиеся по форме), анизоцитозные (разноразмерные) и гипохромные эритроциты (клетки с просветленными участками цитоплазмы), ядерные тени (клетки с разрушенным ядром в виде розовых овалов с неровными, шершавыми краями), клетки со смещенными ядрами (рис. 1, II), но в процентном соотношении их количество было незначительно. Как видно из табл. 1 более высокая частота встречаемости таких клеток наблюдается у густеры, плотвы и леща, как в весенний так и осенний сезоны, что может свидетельствовать о видоспецифичности изменений в морфологии клеток крови рыб, связанных с индивидуальными адаптивными реакциями и положением видов в трофической цепи. В крови судака, окуня, ерша, щуки и чехони эритроциты с

различными патологическими изменениями их морфологической организации были отмечены единично или вообще отсутствовали, за исключением незначительного увеличения доли пойкилоцитозных эритроцитов у двух последних видов. Данное увеличение числа пойкилоцитов следует рассматривать как компенсаторное явление, способствующее увеличению поверхности эритроцита, участвующей в обмене веществ.

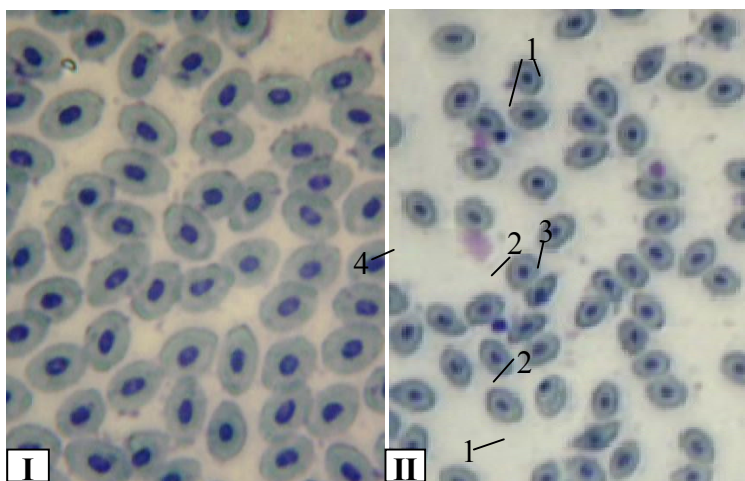


Рис. 1. Клетки крови плотвы:

I – эритроциты в норме ( $\times 3000$ ); II – патологически измененные клетки ( $\times 1250$ ):

- 1 – пойкилоцитоз эритроцитов 2-смещение ядер эритроцитов 3 - выступы на оболочке
- 4 - ядерные "тени"

Известно, что ухудшение условий водной среды вызывает изменение наиболее стабильных характеристик организма рыб, выражающееся в существенном повышении в кровяном русле доли патологически измененных клеток. Результаты полученные нами указывают на то, что физиологическое состояние исследованных рыб в целом было нормальным, а экологическая обстановка в оз. "Тихое" являлась благоприятной.

Обобщая полученные данные можно отметить, что нарушений в показателях крови рыб, связанных с токсическим стрессом не обнаружено. Экологические условия, сложившиеся в

озере "Тихое" за период 2010 года можно определить как благополучные.

Таблица 1. Доля патологически измененных клеток крови у рыб из озера "Тихое" ( $M \pm m$ )

Сезон	Рыба		Параметры				
			Анизоцитоз, %	Пойкилоцитоз, %	Гипохромия, %	"Тени" ядер, %	Смещение ядер, %
Весна (2010)	щука (n=27)		0,00	0,37±0,09	0,02±0,01	0,08±0,04	0,05±0,02
	судак (n=27)		0,09±0,02	0,00	0,04±0,02	0,00	0,04±0,02
	окунь n=31	n=31	0,06±0,02	0,00	0,03±0,01	0,03±0,01	0,09±0,02
	ерш		0,03±0,01	0,08±0,03	0,00	0,01±0,009	0,00
	густера		0,35±0,08	0,18±0,04	0,41±0,07	0,33±0,07	0,15±0,03
	плотва (n=23)		0,24±0,05	0,17±0,05	0,03±0,02	0,29±0,06	0,32±0,06
	лещ (n=19)		0,16±0,05	0,04±0,02	0,13±0,05	0,10±0,03	0,33±0,07
	чехонь (n=17)		0,05±0,02	0,15±0,04	0,00	0,05±0,02	0,09±0,03
Температура воды, °С		7,0–13,1					
Осень (2010)	щука		0,02±0,01	0,00	0,25±0,05	0,07±0,02	0,00
	судак		0,09±0,03	0,00	0,00	0,01±0,01	0,03±0,01
	окунь		0,08±0,03	0,09±0,03	0,05±0,02	0,006±0,006	0,06±0,02
	ерш		0,097±0,03	0,05±0,02	0,01±0,009	0,00	0,08±0,02
	густера		0,12±0,03	0,01±0,009	0,33±0,05	0,12±0,03	0,13±0,03
	плотва		0,17±0,05	0,24±0,07	0,07±0,03	0,09±0,03	0,28±0,06
	лещ		0,07±0,03	0,13±0,04	0,06±0,03	0,13±0,04	0,27±0,06
	чехонь		0,07±0,03	0,13±0,04	0,00	0,02±0,02	0,04±0,02
Температура воды, °С		8,6–15,2					

#### Список литературы

Николаева И.Ф. Морфологическое изменение крови рыб как метод диагностики при отравлении нитробензольными соединениями // Методы ихтиотоксикологических исследований. 1987. С. 109-110.

Лугаськова Н.В. Гематологическая характеристика рыб в условиях техногенного загрязнения водоемов Уральского региона // Изучение экологии водных организмов Восточного Урала. 1992. С. 116-127.

Cavas T. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells /Cavas T., Ergene-Gzukara S. / Mutation research. Vol. 534. P. 93-99.

Endocrine, osmoregulatory, respiratory and hematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil / Alkindi A., Brown J.A., Waring C., Collins J.// Journal of Fish Biology. 2005. P. 361-366.

Барбухо Е.В. Экотоксикологическая оценка влияния глифосата (препарат "Раундап") на рыб и их микробоценозы: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.16 / Барбухо Елена Владимировна. К., 2014. 24 с.

Деснянський екологічний коридор: научне видання / Під ред. В. Костюшина, Є. Прекрасної. Київ : НЕЦУ, 2010. 164 с.

Серпунин Г.Г. Физиология рыб. Методические указания к лабораторным работам по разделу «Физиология крови рыб» / Г.Г. Серпунин, В.А. Аминаева. Калининград, 1986. 36 с.

## RESEARCH OF THE PATHOLOGICALLY CHANGED CAGES OF BLOOD OF FISHES IN ESTIMATION OF THE ECOLOGICAL STATE OF LAKE "TYCHE"

Barbukho O.V., Kilochytska N.P.

The results of observations pathologically changed blood cells of fish lake "Tyche"(pike, pikeperch, perch, ruffe, silverbreem, roach, bream, ziege) for the period 2010 is presented. It is shown that in all examined samples of fish species the percentage of abnormal red blood cells is insignificant. Changes associated with toxic stress are not detected. Water quality in the lake "Tyche" is assessed as safe.

## НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА АНТАРКТИЧЕСКОГО КЛЫКАЧА *DISSOSTICHUS MAWSONI* (NOTOTHENIIDEA)

И.И. Гордеев<sup>1</sup>, Д.В. Микряков<sup>2</sup>, Н.И. Силкина<sup>2</sup>, А.С. Соколова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии г. Москва, ул. Верхняя Красносельская, д.17, Россия, e-mail: [gordeev\\_ilya@bk.ru](mailto:gordeev_ilya@bk.ru)

<sup>2</sup>Институт биологии внутренних вод РАН, Борок Ярославской обл., Россия, e-mail: [daniil@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:daniil@ibiw.yaroslavl.ru)

Антарктический клыкач *Dissostichus mawsoni* Norman, 1937 из семейства Нототениевые (Nototheniidae) – один из самых крупных представителей глубоководной ихтиофауны Антарктики и суб-Антарктики и один из наиболее ценных промысловых видов этого региона. Его распространение циркумполярно, а ареал обитания включает как зоны шельфа, где происходит развитие ювенильных особей, так и континентальный склон Антарктики, и

отдельно-стоящие подводные поднятия в суб-Антарктике (Петров, Татарников, 2010). Особи достигают возраста более 30 лет, длины до 2 м и массы до 120 кг. (Промысловые рыбы..., 2006). При питании клыкач образует нагульные скопления на глубине 600-1800 метров, питаясь преимущественно различными видами кальмаров и костистых рыб, в первую очередь *Macrourus whitsoni* (Петров, 2011; Петров, Истомин, 2010; Петров, Татарников, 2011). Широко известно наличие у некоторых глубоководных антарктических рыб отличительных особенностей физиологии, в силу крайне высокой растворимости кислорода в постоянно холодных водах Антарктики. В частности, в силу возможности насыщения организма кислородом так же через всю поверхность тела, у белокровок (сем. Channichthyidae) в крови отсутствует гемоглобин. Однако в настоящее время биохимический статус клыкача не исследован.

Данная работа посвящена изучению особенностей биохимических процессов в крови и иммунокомпетентных органах Антарктического клыкача.

Рыб отлавливали в январе – феврале 2012 г. в море Росса (статистический подрайон 88.1) на глубине от 690 до 1183 м. Материал для исследования брали у неполовозрелых особей (6 самцов и 5 самок) средней массой 21.4 кг и длиной 114 см непосредственно после поимки.

Анализ биохимических показателей осуществляли в тканях почки, селезенки, печени и плазме крови по содержанию общих липидов (ОЛ) и их фракционному составу, продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровню антиокислительной защиты (АЗ).

Соматические индексы органов рассчитывали согласно общепринятой методике (Правдин, 1966). Липиды из тканей экстрагировали и определяли стандартным гравиметрическим методом по Фолчу (Folch et al., 1957). Фракционный состав липидов выявляли стандартными методами тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» (Кейтс, 1972). Об интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях 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). Содержание МДА вычисляли с учетом коэффициента молярной экстинкции МДА ( $1.56 \times 10^5 / \text{M см}$ ) и выражали в наномолях на 1 г ткани. Уровень АЗ оценивали по кинетике окисления субстрата восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха по общепринятой методике (Семенов, Ярош, 1985), адаптированной нами для рыб. Сущность метода заключается в том, что чем выше скорость окисления субстрата в присутствии биологического материала, тем ниже содержание антиоксидантов в тканях. Гомогенат получали путем растирания тканей с физиологическим раствором в соотношении 1:1. Константу ингибирования окисления субстрата (КОС), являющуюся показателем антиокислительной активности ткани, определяли относительно контроля по формуле:  $K_i = K_{\text{кон}} - K_{\text{оп}}/C$ , где  $K_{\text{кон}}$  и  $K_{\text{оп}}$  – константы скорости окисления субстрата соответственно в контроле и в опыте;  $C$  – концентрация биологического материала в кювете.

Результаты исследований статистически обработаны при помощи стандартного пакета программ (приложение Statistica) с использованием  $t$ -теста,  $p \leq 0.05$ .

Сравнительный анализ полученных результатов показал, что рыбы, отловленные в море Росса отличались по величине исследуемых биохимических показателей в различных тканях, достоверных различий между самцами и самками не выявлено (см. табл).

Максимальный уровень соматического индекса отмечен в печени, а минимальный – в селезенке. Отличия величин соматических индексов отражают структурно-функциональные особенности разных органов и тканей. Печени, по сравнению с другими иммунокомпетентными органами, как известно, свойственны основные функции по нейтрализации, разрушению и элиминации из организма чужеродных тел (Арцимович и др., 1992.).

Таблица

Показатели	Кровь (а)	Почка (б)	Селезенка (в)	Печень (г)
Соматический индекс		$0,21 \pm 0,01$ $0,17 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,02$ $0,15 \pm 0,01$	$2,13 \pm 0,24$ $2,05 \pm 0,30$
ОЛ	$1363 \pm 19$ $1349 \pm 8$	$2793 \pm 26$ $2844 \pm 14^a$	$1887 \pm 12$ $1904 \pm 7^{ab}$	$3632 \pm 26$ $3595 \pm 28^{ab}$
Ф	$36,50 \pm 0,20$ $36,10 \pm 0,13$	$35,19 \pm 0,08$ $35,06 \pm 0,19^a$	$48,18 \pm 0,12$ $47,87 \pm 0,15^{ab}$	$38,25 \pm 0,14$ $38,23 \pm 0,08^{ab}$
Х	$10,79 \pm 0,19$ $10,95 \pm 0,09$	$15,07 \pm 0,08$ $15,18 \pm 0,14^a$	$8,62 \pm 0,11$ $8,64 \pm 0,10^{ab}$	$9,95 \pm 0,13$ $10,03 \pm 0,13^{ab}$
НЭЖК	$6,28 \pm 0,38$ $6,43 \pm 0,22$	$3,08 \pm 0,15$ $3,01 \pm 0,13^a$	$2,73 \pm 0,03$ $2,57 \pm 0,13^{ab}$	$3,44 \pm 0,06$ $3,46 \pm 0,08^{ab}$
Т	$40,07 \pm 0,34$ $40,34 \pm 0,33$	$39,87 \pm 0,11$ $40,07 \pm 0,16$	$34,96 \pm 0,18$ $35,37 \pm 0,13^{ab}$	$42,35 \pm 0,37$ $42,48 \pm 0,22^{ab}$
ЭС	$4,89 \pm 0,14$ $4,77 \pm 0,11$	$6,21 \pm 0,07$ $6,08 \pm 0,05^a$	$4,67 \pm 0,05$ $4,72 \pm 0,06^b$	$4,64 \pm 0,11$ $4,58 \pm 0,11^c$
У	$1,34 \pm 0,06$ $1,39 \pm 0,04$	$0,56 \pm 0,04$ $0,57 \pm 0,01^a$	$0,81 \pm 0,03$ $0,80 \pm 0,07^{ab}$	$1,35 \pm 0,116$ $1,18 \pm 0,03^b$
МДА	$1,73 \pm 0,07$ $1,70 \pm 0,03$	$8,87 \pm 0,09$ $8,84 \pm 0,08^a$	$2,38 \pm 0,05$ $2,14 \pm 0,08^{ab}$	$6,84 \pm 0,08$ $6,93 \pm 0,09^{ab}$
КОС	$1,14 \pm 0,05$ $1,11 \pm 0,02$	$4,10 \pm 0,13$ $4,03 \pm 0,10^a$	$1,31 \pm 0,03$ $1,25 \pm 0,02^{ab}$	$3,16 \pm 0,09$ $3,16 \pm 0,06^{ab}$

Примечание: над чертой самки, под чертой самцы. <sup>абв</sup> – достоверные отличия показателей между различными органами.

В печени клыкача зафиксирован наиболее высокий уровень ОЛ, а в крови – наиболее низкий. Качественный состав липидов в разных тканях был однородным, но количество относительного содержания отдельных липидных фракций было неодинаковым. Максимальное содержание структурных фосфолипидов отмечено в селезенке, а наиболее низкое – в почке. Повышенная доля фосфолипидов в селезенке может быть связана с образованием или поступлением в этот орган рыб липотропных веществ (холин, метионин и др.). Известно, что при их высоком уровне значительно усиливается синтез фосфолипидов из нейтрального жира (глицерина и жирных кислот) (Гершанович и др., 1991; Шатуновский, 1980). Относительное содержание основных запасных липидов – триацилглицеридов было наиболее высоким в печени, что свидетельствует о нормальном протекании процессов липидного обмена в разных органах рыб (Лапин, Шатуновский, 1981; Сидоров, 1983). Выявленные отличия уровня отдельных липидных фракций в разных тканях отражают биохимические особенности липидного обмена, протекающего в них

(Гершанович и др., 1991; Лапин, Шатуновский, 1981; Шатуновский, 1980).

У антарктических рыб в исследуемых органах установлен также разный баланс прооксидантно-антиоксидантной системы. Это подтверждается данными анализа показателей МДА и КОС: все исследуемые ткани отличались по содержанию конечных продуктов перекисления липидов и уровню антиоксидантов. Повышенный показатель МДА и КОС отмечен в тканях почки, а наиболее низкие уровни зафиксированы в крови. Оптимальный баланс процессов ПОЛ ↔ АЗ способствует реализации компенсаторных реакций в разных органах и организме в целом, поскольку компоненты этой системы участвуют в осуществлении многих важнейших физиолого-биохимических и иммунологических процессов организма (Барабой и др., 1992; Барабой, Сутковский, 1997; Winston, 1991). Оптимальное соотношение различных структур системы, характерное для каждого вида ткани, препятствует активации окислительных процессов, понижению содержания антиоксидантов, что характеризует высокий адаптационный потенциал организма клыкача.

Таким образом, анализ полученных данных выявил отличия исследуемых признаков в разных тканях, отражающие особенности их структуры и специфику функций, выполняемых ими в организме рыб.

#### Список литературы

Андреева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. Лаб. дело, 1988, 11: 41-43.

Арцимович Н.Г., Настоящая Н.Н., Казанский Д.Б., Ломакин М.С. Печень как орган иммунобиологической системы гомеостаза // Успехи соврем. биол. 1992. Т. 112. № 1. С. 88-99.

Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г и др. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука, 1992. 148 с.

Барабой В.А., Сутковский Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. Киев: Чернобыльинтеринформ. 1997. 340 с.

Гершанович А.Д., Лапин В.И., Шатуновский М.И. Особенности обмена липидов у рыб // Успехи соврем. биологии. 1991. Т. 3. Вып. 2. С. 207-219.

Кейтс М. Техника липидологии. М.: Наука, 1972. 300 с.



Лапин В.И., Шатуновский М.И. Особенности состава, физиологическое и экологическое значение липидов рыб // Успехи совр. биологии. 1981. Т.1. С.380-394.

Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. 154 с.

Петров А.Ф. Антарктический Клыкчач - *DISSOSTICHUS MAWSONI* NORMAN, 1937 (Распространение, биология и промысел). Автореф. дисс. канд. биол. наук. Москва. 2011.

Петров А.Ф., Татарников В.А. 2010. Новые данные о миграциях антарктического клыкчача *Dissostichus mawsoni* в море Дюрвиля в сезоне 2008/09 гг. // Вопр. ихтиологии. Т. 50. Вып. 1. С. 143-144.

Петров А.Ф., Татарников В.А. Результаты исследований питания антарктического клыкчача *Dissostichus mawsoni* (Nototheniidae) в море Лазарева // Вопр. ихтиологии. 2011. Т. 51. Вып. 1. С. 140-144

Петров А.Ф., Истомин К.Г. Питание и пищевые взаимоотношения антарктического клыкчача *Dissostichus mawsoni* Norman (Perciformes, Nototheniidae) в приматериковых морях Индоокеанского сектора Антарктики и на банке Банзарэ // Вопросы рыболовства. 2010. Том 11. №4 (44). С. 817-830.

Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных). М.: Пищевая промышленность, 1966. 376 с.

Промысловые рыбы России. В двух томах / Под ред. О.Ф. Гриценко, А.Н. Котляра и Б.Н. Котенёва. М.: изд-во ВНИРО, 2006. Т. 2. 624 с.

Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала. Укр. биохим. журн., 1985, 57(3): С. 50-52.

Сидоров В.С. Экологическая биохимия. Липиды. Л.: Наука. 1983. 240 с.

Силкин Н.Ф., Стефани Д.В, Виноградова Т.В. Методика определения концентрации циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови рыб. Экологическая физиология и биохимия рыб. Тез. докл. VII Всесоюзной конф. Ярославль, 1989. С. 141-143.

Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 1980. 238 с.

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. P. 497-509.

Miller P., Wallin H., Knudsen L.E. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors // Chemico-Biological Interactions. 1996. V. 102. P. 17-36.

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

## LIPID METABOLISM FEATURES OF ANTARCTIC TOOTHFISH *DISSOSTICHUS MAWSONI* (NOTOTHENIIDAE)

Gordeev I.I.<sup>1</sup>, Mikryakov D.V.<sup>2</sup>, Silkina N.I.<sup>2</sup>, Sokolova A.S.<sup>2</sup>

Lipid metabolism and oxidation processes indices obtained by processing of specimens of Antarctic toothfish *Dissostichus mawsoni* (Perciformes: Nototheniidae) caught in the Ross Sea are given. Blood plasma, tissues mesonephric kidney, liver and spleen were studied for the content of total lipids and lipid composition, products of lipid peroxidation and level of antioxidant protection. Biochemical status of immune organs, depending on the structural and functional characteristics of tissues was established.

## **ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ВОЛЖСКОЙ СЕЛЬДИ**

М.П. Грушко, А.А. Айтимова

*Астраханский государственный технический университет,  
Астрахань, Россия, mgrushko@mail.ru*

Экологическое неблагополучие рыбохозяйственных водоемов часто связано с наличием в них токсических веществ, которые могут оказывать прямое и опосредованное влияние на морфофункциональные характеристики внутренних органов. Многие загрязняющие вещества, поступающие в водоемы со стоками промышленных и сельскохозяйственных предприятий, обладают биологической активностью и способны аккумулироваться в тканях гидробионтов. Они могут привести к серьезным изменениям физиологических показателей, заболеваниям и патологиям различных систем организма (Голованова, 2011; Грушко, Федорова, 2008). Гистологический метод оценки состояния рыб давно используется в водной токсикологии и связан с проведением лабораторных исследований. Он показателен для выявления патологий и дисфункций органов и тканей рыб, так как гистологические изменения являются следствием нарушений деятельности организма на физиологическом и биохимическом уровне. Гистологические исследования важны для дифференциальной диагностики токсикозов рыб и инфекционных (особенно вирусных), алиментарных и иных патологий (Аршаница, Стекольников, 2011). Объектом исследования являлись половозрелые особи сельди-черноспинки, выловленные в р. Волге, во время нерестового хода. Это – полупроходной вид

Волго-Каспийского бассейна, который имеет важное промысловое значение. Для анализа были отобраны кусочки почек селезенки, кишечника, печени сельди. Материал обрабатывался методами классической гистологии (Волкова, Елецкий, 1982). Ткани органов были фиксированы в жидкости Буэна. Материал заливали в парафин, делались срезы толщиной 4-5 микрометров, гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Микроскопирование фиксированных и окрашенных препаратов осуществлялось с помощью светового микроскопа «МИКОМЕД-2» с применением иммерсии. Микрофотосъемка срезов органов производилась при помощи фотонасадки SONIDSC-W7.

Исследование мезонефроса сельди показало, что как мелкие, так и крупные сосуды органа были сильно расширены и переполнены форменными элементами крови. Почечные тельца характеризовались отсутствием мочевого пространства, из-за утолщения капилляров клубочков.

Канальца почек также были подвержены изменениям. На срезе встречались как гипертрофированные канальца так и отдельные атрофированные канальца. Эпителиальные клетки канальцев были гиперемированы и за счет этого у всех почечных канальцев был резко сужен просвет. Для эпителия всех канальцев была характерна дистрофия, т.е. все эпителиальные клетки содержали нехарактерную зернистость. Часть клеток канальцев была атрофирована, иногда отмечались участки, где полностью или частично канальцы были подвержены некрозу. Межканальцевая ткань была представлена ретикулярными клетками, между которыми были рассредоточены развивающиеся кроветворные элементы.

На срезах выявлялись небольшие округлые участки скопления клеток интерренальной ткани.

У отдельных особей в межканальцевой ткани фиксировались небольшие кровоизлияния и участки отложения гемосидерина.

Строма селезенки не имела четкого разделения на корковое и мозговое вещество. Снаружи орган был покрыт тонкой соединительнотканной капсулой. Белая и красная пульпы четко не визуализировались. Строма органа была пронизана

соединительнотканными трабекулами. Было отмечено, что сосуды органа были переполнены ФЭК. У части особей трабекулы были сильно утолщены. У этих же особей было отмечено утолщение стенок крупных кровеносных сосудов, вследствие чего был сужен их просвет, иногда вообще отсутствовал. Среди элементов ретикулярной ткани выявлялись элементы крови всех рядов на разных стадиях развития. На срезах выявлялись участки скопления гемосидерина. У части особей на периферии органа отмечено большое количество мелких кровоизлияний.

#### Пищеварительная система.

Отмечено, что в среднем отделе кишечника исследуемых особей собственная пластинка слизистой оболочки была интенсивно инфильтрирована лимфоцитами, что может свидетельствовать о воспалительном процессе. Эпителиальная выстилка кишечных ворсинок имела участки подверженные некротическим изменениям. Отмечено, что капилляры стромы кишечных ворсинок, были сильно расширены и заполнены форменными элементами крови. Кровеносные сосуды собственной пластинки были утолщены. В собственной пластинке слизистой оболочки регистрировались участки разрастания соединительной ткани – фиброз.

Изучение печени исследуемых видов сельди показало, что балочная структура органа была нарушена. На срезе регистрировались участки ткани, подверженные некрозу, мелкие кровоизлияния, участки отложения гемосидерина. Было отмечено утолщение стенок сосудов печени. У всех особей была отмечена крупно-капельная жировая дистрофия гепатоцитов. У отдельных особей для 20% гепатоцитов на срезе был характерен кариорексис ядер гепатоцитов, при этом ядра имели неправильную форму. У части особей отмечено разрыхление (диссоциация) ядрышек.

Таким образом, в изученных органах основным изменения были связаны с нарушением кровообращения, обменных процессов, наличием воспалительных процессов.

#### Список литературы

Аршаница Н.М., Стекольников А.А. Диагностика токсикозов рыб и оценка среды их обитания. Расширенные материалы III Международной конференции, Борок. М.: Изд-во РГАУ МСХА имени К.А. Тимирязева. 2011. С. 269-274.

Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой, 20-е изд. М.: Медицина 1982. 304 с.

Голованова И.Л. Влияние органических загрязнителей на пищеварение у рыб // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширенные материалы III Международной конференции, Борок. М.: Изд-во РГАУ МСХА имени К.А. Тимирязева, 2011. С. 14-18.

Грушко М.П., Федорова Н.Н. Морфофункциональные особенности селезенки каспийской воблы (*Rutilus rutilus caspicus*) // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. 2008. №4. С. 77-79.

## **НАРУШЕНИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКУНЯ *PERCA FLUVIATILIS* В ВОДОЕМАХ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ ЗОНЫ ОТЧУЖДЕНИЯ**

Д.И. Гудков<sup>1</sup>, В.Р. Микряков<sup>2</sup>, Д.В. Микряков<sup>2</sup>, Н.Л. Поморцева<sup>1</sup>,  
А.Е. Каглян<sup>1</sup>, А.Б. Назаров<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Институт гидробиологии НАН Украины, Киев, Украина,  
digudkov@gmail.com;*

<sup>2</sup>*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,  
Борок, Россия;*

<sup>3</sup>*Государственное специализированное предприятие  
«Чернобыльский спецкомбинат», Чернобыль, Украина*

Изменение гематологических показателей является одним из наиболее важных критериев физиологического состояния живого организма. Кроветворная система – наиболее чувствительна к действию ионизирующего излучения, а структурно-функциональные изменения форменных элементов крови при хроническом радиационном воздействии свидетельствуют о нарушениях процесса кроветворения на различных этапах онтогенеза. В результате катастрофы на Чернобыльской АЭС (ЧАЭС) водоемы, расположенные в зоне аварийных выбросов станции, подверглись интенсивному радионуклидному загрязнению. Однако гематологические исследования рыб, испытывающих повышенные хронические дозы ионизирующего излучения в водоемах Чернобыльской зоны отчуждения (ЧЗО), крайне немногочисленны. Изучение морфологических нарушений элементов крови, а также оценка их функциональных изменений

является важным элементом мониторинга состояния популяций рыб, как в рыбоводной практике, так и при прогнозировании последствий антропогенного воздействия на аборигенную ихтиофауну природных водоемов. Таким образом, всесторонние исследования в этой области позволяют выявить ряд интегральных показателей для оценки физиологического состояния организма при диагностике и прогнозировании развития патологии у рыб в условиях хронического воздействия малых доз ионизирующего излучения.

Объектом исследований был окунь обыкновенный *Perca fluviatilis* L. Сбор материала проводили в сентябре 2014 г. в оз. Глубокое, Яновском затоне и водоеме-охладителе (ВО) ЧАЭС, расположенные в ЧЗО. Водоемом сравнения (контролем) служило Каневское водохранилище (залив Оболонь) с фоновым уровнем радионуклидного загрязнения.

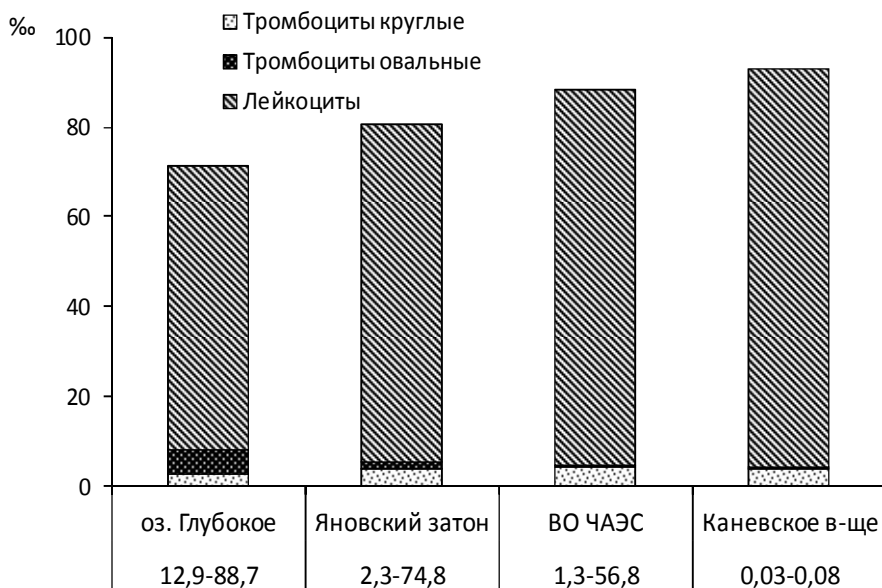
Измерение удельной активности основных дозообразующих радионуклидов в образцах рыб проводили при помощи методов, описанных в публикациях (Гудков и др., 2008; Кузьменко и др., 2009). Оценку мощности поглощенной дозы выполняли для пелагических видов рыб при помощи программного обеспечения ERICA Assessment Tool 1.0 (Version March 2014).

Гематологические исследования выполняли на живых, внешне здоровых и неповрежденных особях. Кровь отбирали из гемального канала хвостового стебля. Препараты периферической крови готовили на месте вылова рыб, высушивали на воздухе и фиксировали в 99,8% метаноле. Мазки окрашивали аzur-эозином по Паппенгейму. В мазках проводили подсчет лейкоцитов (миелобластов, промиелоцитов, метамиелоцитов, миелоцитов, нейтрофилов палочко- и сегментоядерных, псевдоэозинофилов, псевдобазофилов, моноцитов, лимфоцитов), а также различных форм тромбоцитов. Клетки крови и их патологические изменения идентифицировали согласно (Иванова, 1983; Житенева и др., 1989). Лейкоцитарную формулу определяли при подсчете 200 клеток белой крови. Количество лейкоцитов и тромбоцитов рассчитывали на 1000 эритроцитов. Тромбоциты разделяли на овальные и круглые. Частоту встречаемости клеток с

морфологическими и цитогенетическими изменениями оценивали на 3000 эритроцитов.

Величина мощности поглощенной дозы для окуня исследованных водоемов ЧЗО отмечена в диапазоне 1,3–88,7 мкГр/ч. Максимальными значениями этого показателя характеризовались рыбы оз. Глубокое. В водоеме с фоновым уровнем радионуклидного загрязнения дозовая нагрузка на рыб не превышала 0,08 мкГр/ч.

Установлено, что у рыб из водоемов ЧЗО отмечаются значительные количественные и качественные изменения во всех ростках кроветворения. Результаты анализа содержания тромбоцитов и лейкоцитов приведены на рис. 1. Отмечено, что у окуня из водоемов с высоким уровнем радионуклидного загрязнения содержание лейкоцитов достоверно ниже по сравнению с рыбами из контрольного водоема, а число тромбоцитов наоборот – выше контрольных данных. Следует также отметить, что у окуня из оз. Глубокое отмечено увеличенное содержание овальных форм тромбоцитов. Известно, что при развитии заболеваний рыб, вызванных интоксикацией и сопровождающихся гемолизом эритроцитов, количество овальных преобладает над круглыми тромбоцитами (Житенева и др., 1989). Возможно, что регистрируемые эффекты обусловлены в определенной мере эндогенной интоксикацией, развивающейся при действии ионизирующего излучения, особенно с учетом высоких уровней содержания радионуклидов в органах и тканях рыб.



Водоем; Мощность поглощенной дозы, мкГр/ч

Рис. 1. Соотношение лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови рыб.

У рыб ЧЗО были также зарегистрированы следующие формы деструктивных нарушений эритроцитов согласно (Житенева и др., 1989): различные типы деформаций ядер; пристеночные ядра; пикноз; микроциты; лизис и некоторые другие (рис. 2).

Разнообразие форм патологических изменений структуры клеток крови, в основном эритроцитов, у исследованных рыб, может свидетельствовать о снижении генетической стабильности рыб в условиях повышенной мутагенности и генотоксичности среды обитания. Согласно (Бак, Александер, 1963; Кудряшов, 2004), ионизирующее излучение вызывает нарушение липидной структуры биологических мембран (например, лизосом), а также их барьерных функций, обеспечивающих компартментализацию клетки. Это приводит к нарушению пространственной изоляции ферментов от их субстратов, высвобождению ферментов и к дальнейшему разрушению макромолекул и внутриклеточных структур. Вследствие этого происходят изменения не только в



цитоскелете, но и в нормальном функционировании всех органелл клетки.

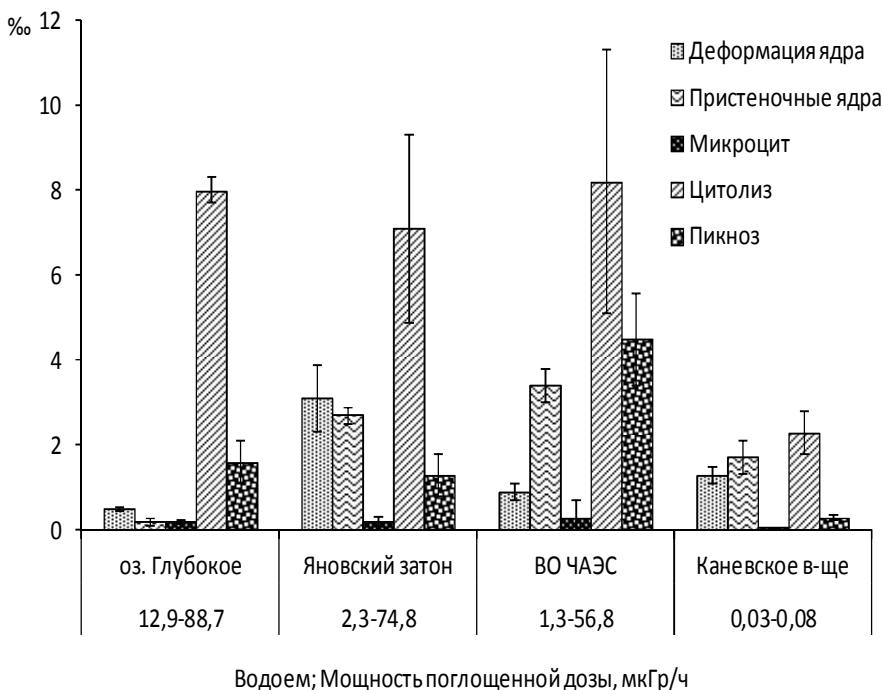


Рис. 2. Структурные нарушения эритроцитов в периферической крови рыб.

Как видно на рис. 2, в периферической крови окуня из водоемов ЧЗО преобладали такие нарушения морфологии эритроцитов как деформация ядер, пристеночные ядра, микроциты, пикноз и лизис. Их общее количество в 2–3 раза превышает контрольные уровни. Отмечено увеличение различных морфологических изменений клеток у окуня, обитающего в ВО ЧАЭС, характеризующегося в настоящее время сравнительно невысоким уровнем дозовых нагрузок для представителей ихтиофауны в ЧЗО, но в тоже время достаточно высоким по сравнению с контролем. Так, частота встречаемости клеток с пикнозом и пристеночными ядрами в ВО ЧАЭС была в 3 раза выше по сравнению с рыбами из более загрязненных водоемов ЧЗО.

Исследования показали, что общее количество структурных нарушений клеток периферической крови окуня составило в оз. Глубокое – 10,5%, в Яновском затоне – 14,4%, в ВО ЧАЭС – 17,3%, и в контрольном водоеме – 5,6%. Можно предположить, что сравнительно невысокие дозовые нагрузки для рыб в ВО ЧАЭС приводят к выходу большего числа структурных нарушений в клетке, а при более высокой мощности дозы облучения к их элиминации (рис. 3).

Для клеток системы крови рыб, как и других животных, типичным является митотический способ деления клетки. Однако в условиях воздействия различных абиотических факторов описаны случаи увеличения прямого деления эритроцитов в периферической крови – количества амитозов, а также возникновение их патологических форм – двуядерных эритроцитов (Молдавская и др., 2003; Моисеенко и др., 2005). Нарушения пролиферации клеток эритроцитов, в основном амитоз и двуядерные эритроциты, были зарегистрированы нами, соответственно, на уровне 0,2% и 0,1% у рыб оз. Глубокое.

Оценить степень радиационного воздействия на структуру хромосом и выявить генетические изменения у особи позволяет учет частоты образования микроядер. Микроядра служат индикатором грубых повреждений хромосом, а также существенных нарушений в структуре центромеры или митотического веретена деления. Проведенный анализ показал наличие микроядер в клетках периферической крови окуня из водоемов ЧЗО, с максимальными значениями в оз. Глубокое (см. рис. 3). В белой крови также были отмечены дегенеративные формы лейкоцитов – двуядерные лимфоциты, которые наблюдали у рыб из оз. Глубокое – 0,5 % и Яновском затоне – 0,3%.

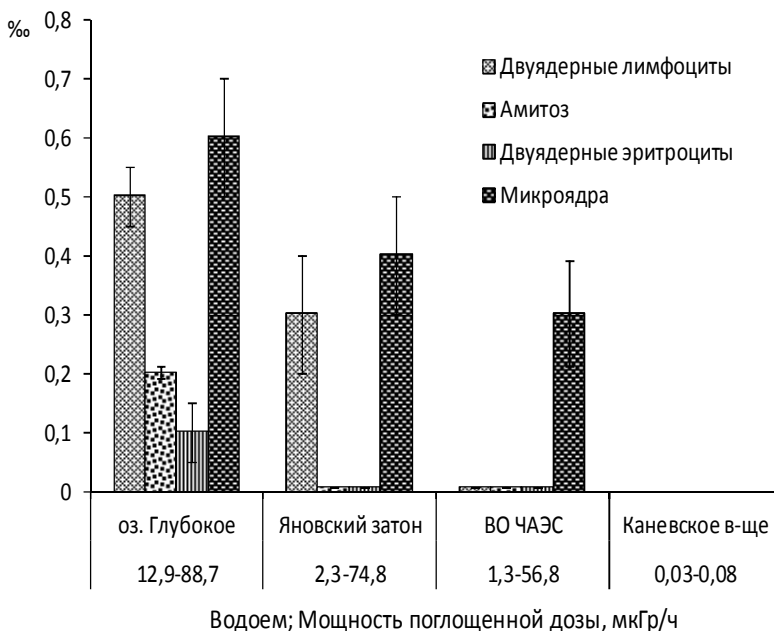


Рис. 3. Нарушения пролиферации клеток в периферической крови рыб.

Периферическая кровь, как и система крови в целом, обладает ярко выраженной трофической и защитной функцией. Благодаря нейрогуморальной регуляции и другим факторам клеточный состав периферической крови поддерживается на определенном уровне и в определенных соотношениях. Изменения в системе крови являются ответной реакцией организма рыб на изменения внешних и внутренних факторов. Таким образом, морфологический анализ крови является одним из наиболее чувствительных и объективных методов контроля за физиологическим состоянием организма (Пучков, 1954). В этой связи значение морфологических показателей крови в определении физиологического состояния организма рыб представляется крайне важным.

Анализ лейкограмм окуня показал, что лимфоциты составляют наибольший пул клеток, на долю которых приходится в среднем до 93,4% состава всех лейкоцитов, тогда как число моноцитов колеблется в пределах 1,3–0,9%, нейтрофилов – 12,7–4,5%, а клеток бластных форм 0,4–1,6% (Таблица).

Таблица 1. Лейкограмма окуня в водоемах ЧЗО, % (M±m)

Форменные элементы крови	Озеро Глубокое	Яновский затон	ВО ЧАЭС	Каневское в-ще
Бластные формы	1,2±0,2	1,6±0,4	0,4±0,1	1,1±0,3
Лимфоциты	83,4±5,9	88,5±8,2	91,5±11,4	93,4±5,4
Моноциты	1,3±0,2	0,7±0,2	0,6±0,2	0,9±0,2
Псевдоэозинофилы	1,4±0,2	–	0,5±0,2	0,1±0,2
Псевдобазофилы	–*	–	–	–
Нейтрофилы	12,7±5,5	9,2±5,5	7,0±2,1	4,5±0,6

\* – не зарегистрированы

Количественные характеристики отдельных пулов лейкоцитов в периферической крови окуня свидетельствуют о достоверных отличиях для рыб, обитающих в различных по уровню радионуклидного загрязнения водоемах, и характеризующихся, по сравнению с контрольным водоемом, низкими средними показателями содержания лимфоцитов и высокими – нейтрофилов. Увеличение доли нейтрофилов у рыб из водоемов ЧЗО, основной ролью которых является освобождение организма от деструктивных и омертвевших клеток организма, может быть показателем высокого уровня накопления разрушенных клеток в организме, которые мы наблюдали при исследовании цитогенетических и структурных нарушений в периферической крови окуня из водоемов ЧЗО. Низкое содержание лимфоцитов в крови рыб обусловлено высокой чувствительностью лимфоцитов к радиационному воздействию.

#### Список литературы

Бак З., Александер П. Основы радиобиологии. М.: Изд-во иностранной литературы, 1963. 500 с.

Гудков Д.И., Каглян А.Е., Киреев С.И., Назаров А.Б., Кленус В.Г. Основные дозообразующие радионуклиды в рыбе зоны отчуждения Чернобыльской АЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т. 48, № 1. С. 48–58.

Житенева Л.Д., Полтавцева Т.Г., Рудницкая О.А. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб. Ростов-на-Дону: Ростовское книжное издательство, 1989. 111 с.

Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 184 с.

Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М.: Физматлит, 2004. 448 с.

Кузьменко М.И., Гудков Д.И., Киреев С.И. и др. Техногенные радионуклиды в пресноводных экосистемах. Киев: Наукова думка, 2010. 262 с. (на украинском).

Моисеенко Т.И. Гашкина Н.А., Шарова Ю.Н., Поковса А.Г. Экотоксикологическая оценка последствий загрязнения вод р. Волги // Водные ресурсы. 2005. Т. 32, № 4. С. 410–424.

Молдавская А.А. Морфо-функциональные аспекты появления токсикоза у рыб (экспериментальные и природные наблюдения). Астрахань, 2003. 182 с.

Пучков Н.В. Физиология рыб М.: 1954. 371 с.

ERICA Assessment Tool 1.0 (Version March 2014). The integrated approach seeks to combine exposure/dose/effect assessment with risk characterisation and managerial considerations (<http://www.ERICA-tool.com>).

### **DAMAGES OF HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF THE PERCH *PERCA FLUVIATILIS* IN WATER BODIES WITHIN THE CHERNOBYL EXCLUSION ZONE**

Gudkov D.I., Mikryakov V.R., Mikryakov D.V., Pomortseva N.L.,  
Kaglyan A.Ye., Nazarov A.B.

The data about state of basic cellular parameters of peripheral blood of the perch *Perca fluviatilis* L., dwelling in the lakes within the Chernobyl exclusion zone with highest levels of radioactive contamination, are resulted. The ratio of erythroid, leukocytic and thrombocytic blood cell groups as well as rate of atypical shape of red blood cells is analysed.

### **ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ И ОРГАНАХ РЫБ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ ЧЕРВЕЙ Р. *EUSTRONGYLIDES***

Н.Б. Есипова, В.С. Сидоренко

Днепропетровский национальный университет  
им. Олеса Гончара, Украина, e-mail: [nesa@list.ru](mailto:nesa@list.ru)

В последние годы многие авторы отмечают факты распространения и высокой инвазии рыб паразитическими нематодами р. *Eustrongylides* (Мошу, Стругуля, 2009; Квач, 2005; Ибрагимова, 2008; Есипова, 2013; Ibiwoye et al., 2004). Цикл развития данного паразита достаточно хорошо изучен. Известно, что рыбы являются промежуточными хозяевами и заражаются, поедая инвазированных олигохет. Окончательным хозяином

служат рыбоядные птицы. Паразит заражает многие виды рыб, локализуясь в брюшной полости и мышцах, и относится к потенциально опасным видам для млекопитающих и человека. Однако остаются слабоизученными вопросы патогенеза при инвазии рыб эустрогилидесами. Наша работа посвящена исследованию цитологических изменений в органах и тканях рыб под воздействием личинок нематод р. *Eustrongylides*.

Исследования проводились на разных участках Запорожского (Днепровского) водохранилища в весенне-летний период 2012–2014 гг. Запорожское водохранилище является предпоследним в каскаде из 6 днепровских водохранилищ. Имеет площадь 24,6 тыс. га и характеризуется повышенными антропогенными нагрузками, следствием которых является возрастающая эвтрофикация водоема, сверхнормативное содержание в воде нефтепродуктов и некоторых тяжелых металлов.

Паразитологические исследования проводили по классическому методу полного паразитологического вскрытия рыб. Для цитологического анализа готовили парафиновые срезы тканей с последующей окраской их гематоксилином и эозином. При микроскопии срезов использовали фотографическую насадку марки Digital Camera for Microscope и программу Science Lab DSM 820. Рыб на анализ отбирали во время проведения научно-исследовательских ловов. Паразитологическому анализу подвергались 18 видов рыб, относящихся к промыслового комплексу.

Следует отметить, что на территории Украины природные очаги распространения паразитических нематод р. *Eustrongylides* сосредоточены в акватории лиманов Причерноморья, Одесской затоки, Бугского и Днепро-Бугского лиманов. Здесь расположены многочисленные колонии водоплавающих птиц – окончательных хозяев паразита. В лиманах эустронгилид обнаруживали у многих видов рыб, но самый высокий процент заражения (до 50 %) отмечался у бычков (Квач, 2005; Моргун, 2012).

В Запорожское и вышерасположенные водохранилища паразит, судя по всему, проник относительно недавно. Так, по сведениям Л.М. Анцышкиной (1971, 1977) в 70-80-е годы

прошлого столетия у рыб Днепродзержинского и Запорожского водохранилищ р. *Eustrongylides* не встречался. В начале 2000-х годов мы впервые стали обнаруживать *Eustrongylides excisus* у отдельных экземпляров окуня в Запорожском водохранилище. В последующие годы паразит стал стремительно наращивать свою численность и расширять круг хозяев (рис. 1). В 2015 г. экстенсивность инвазии (ЭИ) и интенсивность инвазии (ИИ) рыб составляла: окуня – ЭИ 80 %, ИИ  $18,4 \pm 1,44$  экз./рыбу; судака – ЭИ 46 %, ИИ  $6,3 \pm 0,96$  экз./рыбу; сома речного – ЭИ 12 %, ИИ  $24,0 \pm 2,44$  экз./рыбу; бычка песочника – ЭИ 36 %, ИИ  $3,2 \pm 0,23$  экз./рыбу; густеры – ЭИ 4 %, ИИ  $1,2 \pm 0,14$  экз./рыбу.

Наибольшая концентрация зараженных рыб отмечалась в нижней приплотинной части водохранилища, где сложились подходящие условия для развития олигохет – первых промежуточных хозяев паразита. На этом участке донные отложения представлены заиленными песками, богатыми органикой, что является благоприятной для них средой. Биомасса олигохет-губифицид в этой части водохранилища достигает  $24 - 79$  г/м<sup>2</sup>. Переносчиком эустронгилидеса из днепровских лиманов в водохранилища стали, очевидно, рыбадные птицы – чайки, бакланы.

При вскрытии зараженных рыб мы обнаруживали личинок *E. excisus* как в свободном, мигрирующем, так и в капсулированном состоянии в печени, почках, гонадах, брюшных и спинных мышцах.

Было установлено, что у половозрелых окуней при высокой концентрации *E. excisus* (более 10 экз./рыбу) отмечалось отставание в развитии половых продуктов (рис. 2). Так, гонадосоматический индекс у здоровых самок окуня на IV стадии зрелости составлял в среднем  $15,2 \pm 0,98$ , у инвазированных самок –  $10,4 \pm 1,12$  ( $p \leq 0,05$ ).

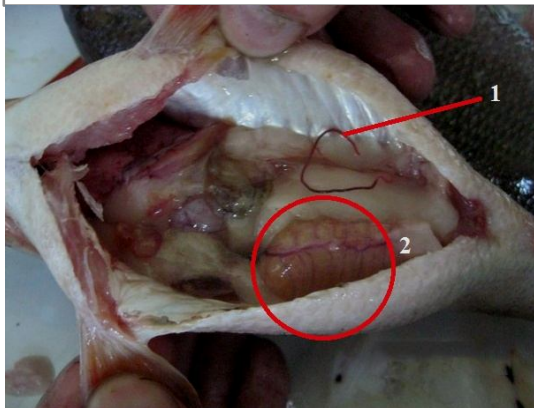
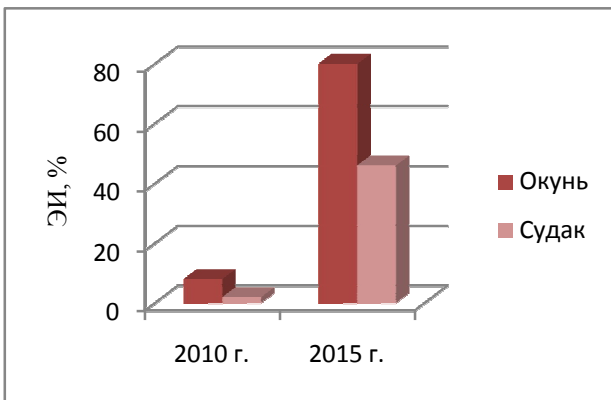


Рис. 1. Динамика зараженности окуня и судака *Eustrongylides excisus* в Запорожском водохранилище

Рис. 2. Вскрытие  
1 – *Eustrongylides*  
2 – недоразвитые гонады.

Изучение возрастной структуры зараженных рыб показало, что инвазия происходит уже на ранних стадиях и увеличивается по мере роста рыб. Так, в мальковых популяциях сеголетки бычка песочника имели показатели ЭИ 5 – 12 %, двухлетки – 7 – 32 %.



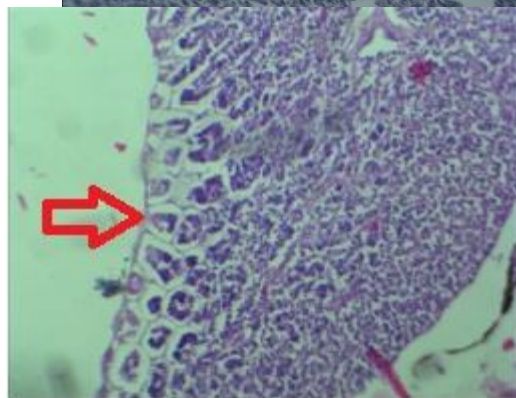


Рис. 3. Печень судака, инвазированного песочника,

*E. excisus*: 1- разрыв ткани на пути миграции

личинки, 2 – капсула с паразитом (Ув. 8<sup>x</sup>).

Рис. 4. Печень бычка

инвазированного *E. excisus*

На гистологических препаратах печени судака, пораженного *E. excisus*, видны обширные участки некроза на пути миграции личинок паразита (рис. 3). При прохождении личинок нарушается целостность кровеносных сосудов, в результате чего форменные элементы крови выходят в ткань. В гепатоцитах, граничащих с капсулой паразита, отмечаются кариопикноз и кариолизис.

У инвазированных сеголеток бычка песочника в печени, в приграничных с паразитарной капсулой районах, хорошо заметна гиперплазия гепатоцитов и лизис ядер (рис. 4). Картина печени зараженных и незараженных сеголеток заметно отличается еще и избыточным накоплением жира. У инвазированных рыб

паренхима более рыхлая, с большим содержанием жировых вакуолей. Нарушение липидного обмена в гепатоцитах явилось, вероятно, следствием токсического воздействия метаболитов паразита.

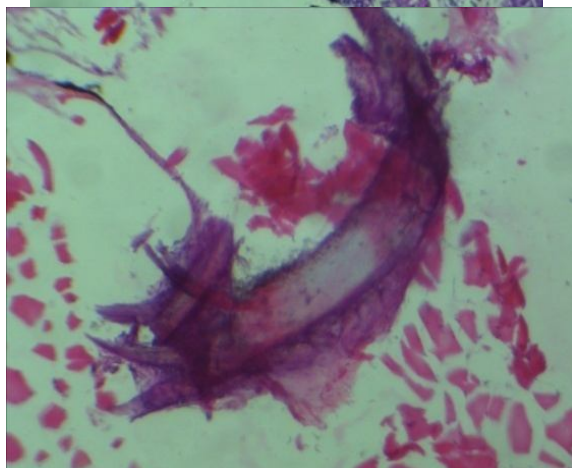
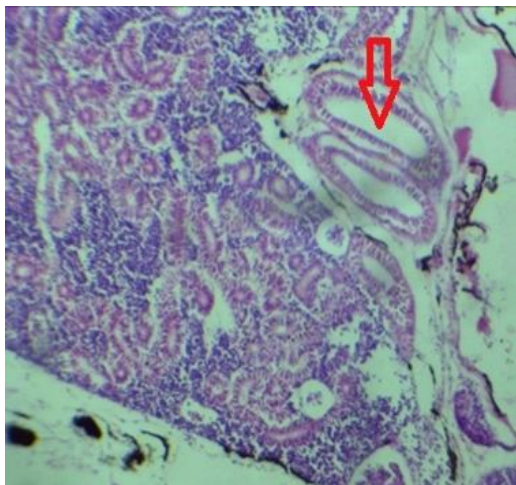


Рис. 5. Увеличение почечных канальцев бычка песочника при инвазии *E. excisus* (Ув. 40<sup>x</sup>).

Рис. 6. Фрагмент *E. excisus* в бычка песочника (Ув. 40<sup>x</sup>).

Почки рыб, пораженных *E. excisus*, отличались деструкцией и некрозом эпителия почечных канальцев, их гигантским

разрастанием и очагами кровоизлияния, которые были вызваны механическим разрывом кровеносных сосудов при продвижении гельминтов (рис. 5). Локализация паразитов в мышечной ткани приводила к деструкции и разрыхлению мышечных волокон, некрозу ткани в зоне локализации паразита, стазу крови в кровеносных сосудах (рис. 6).

Таким образом, личинки *Eustrongylides excisus*, проникая в ткани рыб, оказывают механическое и токсическое воздействие, проявляя при этом высокую патогенность. Об этом можно судить по существенным гистопатологическим изменениям даже при заражении единичными экземплярами паразита. К аналогичным выводам пришли другие авторы, изучая влияние *E. excisus* на гематологические показатели рыб (Movahed et al., 2012). Было показано, что у 4-х летних судаков, зараженных *E. excisus*, достоверно снижалось количество лимфоцитов и почти в 3 раза увеличивалось количество нейтрофилов в крови по сравнению с незараженными рыбами, что свидетельствует о воздействии паразита на иммунную систему рыб даже при невысокой степени инвазии.

Учитывая большие адаптационные возможности паразита и его патогенность, считаем необходимым привлечь внимание ученых и практиков в области ихтиопатологии и ветеринарной медицины к дальнейшему изучению биологических и патогенных особенностей *Eustrongylides excisus* с целью разработки противоэпизоотических мероприятий.

#### Список литературы

1. Мошу А., Стругуля О. Распространенность возбудителей гельминтозоонозов у рыб Кучурганского водохранилища / Международное сотрудничество и управление трансграничным бассейном для оздоровления реки Днестр // Материалы Международной конференции. Одесса, 30 сентября – 1 октября 2009 г. Одесса: Черноморский женский клуб. С. 313–318.
2. Ibiwoye T.I. I. Determination of the densities of *Eustrongylides* in mudfish *Clarias gariepinus* and *C. anguillaris* from Sida floodplain of Nigeria. // Journal of Applied Science and Environmental Management. 2004. Vol. 8 (1), in press.
3. Квач Ю.В. Гельмінти бичків (Gobiidae) та інших фонових видів риб Одеської затоки та лиманів Північно-Західного Причорномор'я (фауна, екологія): Автореф. дис. ... канд. біол. наук К.: 2005. 22 с.
4. Ибрагимова Н.Е. К изучению паразитов рыб Еникендского водохранилища // Мат. IV Всероссийского съезда Паразитологического

общества «Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения», 20-25 октября 2008 г. С.-Петербург: Лема, 2008. Т. 2. С. 3–6.

5. Есипова Н.Б. Распространение паразитической нематоды *Eustrongylides excises* у рыб Запорожского (Днепровского) водохранилища // Сучасні проблеми теоретичної та практичної іхтіології: Матеріали VI Міжнар. іхтіол. наук. – прак. конф. Тернопіль, 2013. С. 86–89.

6. Моргун О.А. Зараженность бычковых рыб (Gobiidae) нематодами *Eustrongylides excises* (Nematoda: Dioctophymidae) в Бугском и Днепро-Бугском лиманах и низовье Южного Буга // Морський екологічний журнал № 4, Т. XI. Севастополь, 2012. С. 64–66.

7. Анцышкина Л.М. Фауна паразитов рыб Запорожского водохранилища и ее особенности / Л.М. Анцышкина // Сб. НИИ биологии ДГУ. Днепрпетровск, 1977. С. 59–69.

8. Movahed R., Khara H., Hayatbakhsh M.R., Rahbar M. Some Haematological Changes of Zander (*Sander lucioperca*) In Relation to Age and Its Relationship with Parasitic Infection // Fisheries and Aquaculture Journal. 2012. FAJ-47. P. 1–7.

#### **PATHOLOGY OF TISSUES AND INTERNAL ORGANS OF FISH DURING INFECTION WITH PARASITIC WORMS P. *EUSTRONGYLIDES***

Yesipova N.B., Sidorenko W.S.

Contamination of fish in the Zaporozhye Reservoir nematode *Eustrongylides excises* acquires the character of an epizootic. The parasite in fish tissues (liver, kidneys, muscle) causes mechanical damage to cells and toxicity, which manifests itself in karyolysis, karyopyknosis, inflammation, necrosis.

#### **ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОГО НАГРЕВА И ПЕСТИЦИДА РАУНДАП НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГОЛОВЕШКИ-РОТАНА**

Е.А. Заботкина, В.К. Голованов, И.Л. Голованова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанкина РАН, пос. Борок, Россия, e-mail: [zabel@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:zabel@ibiw.yaroslavl.ru)*

Потепление климата, согласно данным Росгидромета, опубликованным в 2014 году, в России идет в 4 раза быстрее, чем в целом по планете (<http://www.rg.ru/2015/03/20/climat.html>). Это создает преференции для теплолюбивых и термоустойчивых видов, возможность расширения ареалов обитания уже существующих, и вселение чужеродных видов. Головешка-ротан *Percottus glenii* относится к видам-вселенцам для водоемов бассейна Верхней Волги. Его природный ареал расположен на

Дальнем Востоке, в Китае и Северной Корее, в настоящее время он широко распространен в водоемах Северной Евразии (Решетников, 2009). Ротан хорошо адаптируется к действию природных и антропогенных факторов (Голованова и др., 2009; Каранова, 2009; Голованов и др., 2013), угнетая популяции аборигенных видов рыб. По температурным характеристикам ротан относится к наиболее теплолюбивым видам рыб, обитающих в пресных водоемах России (Голованов и др., 2013).

Раундап, созданный на основе синтезированного в 1971 году неселективного системного гербицида глифосата, применяется в сельском хозяйстве более 40 лет, в том числе более 25 лет – в России. Сочетание высокой эффективности в сельском хозяйстве с низкой токсичностью для млекопитающих ( $LC_{50} > 5$  г/кг) делает его крайне привлекательным для применения. Раундап является наиболее широко применяемым гербицидом в мире на площади посевов более 70 млн га (Спиридонов и др., 2010). Раундап также активно применяется также для уничтожения растительности в мелиоративных сооружениях и каналах (Брежнев, 2004). Для рыб 96 ч значения  $LC_{50}$  варьируют от 2 до 55 мг/л в зависимости от вида, стадии жизненного цикла и условий эксперимента (Giesy et al., 2000).

Раундап и его действующее вещество глифосат вызывают повреждение митохондрий в клетках жабр, печени, почек рыб, и как следствие – нарушение процессов окислительного фосфорилирования, оксидативный стресс в тканях, гиалиновую дистрофию почек, повреждение генетического аппарата клеток, в том числе половых (Harayashiki et al., 2013; Moreno et al., 2014; Braz-Mota et al., 2015). В острых опытах по влиянию различных концентраций Раундапа показано увеличение гематокрита и угнетение иммунных функций, в том числе фагоцитоза (Annett et al., 2014). Однако хроническое действие Раундапа и последующего повышения температуры среды на гематологические характеристики ротана-головешки ранее не исследовалось.

Цель работы – изучить хроническое действие сублетальной концентрации гербицида Раундап и нагрева на некоторые

характеристики клеток красной и белой крови молоди головешкиротана.

Исследовали сеголеток ротана, отловленных в водоеме Некоузского района Ярославской области. Рыб предварительно акклимировали к лабораторным условиям в течение 1 месяца в 200 л аквариумах с постоянной аэрацией, 12-часовым периодом освещения, при температуре воды  $15.5 \pm 1.0$  °С. Масса рыб составила  $3.1 \pm 0.2$  г, длина тела –  $5.4 \pm 0.1$  см. Затем контрольную группу рыб (50 экз.) поместили в аквариум с чистой водой, а вторую опытную группу (50 экз.) – в аквариум с водой, содержащей Раундап в концентрации 2 мкг/л (2 ПДК). Смену воды в аквариумах производили 2 раза в неделю без отсадки рыб.

По истечении 30 суток по 12 экз. из контрольной и опытной групп были взяты для анализа гематологических показателей, по 12 экз. были посажены в аквариумы, температуру воды в которых повышали со скоростью 8 °С/ч до потери рыбами равновесия (переворот на бок). Сублетальное значение температуры фиксировали как критический термический максимум (КТМ). Более подробно методика определения температурных характеристик описана ранее (Голованов и др., 2013). В период акклимации, во время эксперимента с Раундапом рыб кормили 1 раз в сутки личинками хирономид из расчёта 4 % от общей массы тела.

Для анализа гематологических показателей методом каудэктомии отбирали кровь из хвостовой вены и приготавливали мазки периферической крови, которые затем окрашивали краской Романовского-Гимза по стандартной методике (Иванова, 1983). На мазках периферической крови подсчитывали относительное количество эритробластов, незрелых и зрелых эритроцитов (%), амитозов (%), микроядер (%), соотношение лейкоцитов (%). Исследования проводили под микроскопом Keyence VHX-1000, с использованием окуляров Z-500 R. Результаты исследования выражали в виде среднего  $\pm$  ошибка среднего, оценивали уровень достоверности отличий результатов при  $p \leq 0.05$ .

Результаты исследования показали, что Раундап и нагрев воды оказали влияние на параметры как красной, так и белой крови. Следует отметить, что ни один из факторов, ни их

совместное действие не оказали существенного влияния на соотношение зрелых и незрелых эритроцитов. Нагрев вызвал достоверное увеличение количества амитозов в крови рыб, Раундап, напротив, вызвал уменьшение как доли амитозов, так и микроцитов (Рис. 1). Совместное действие этих факторов оказало разнонаправленное действие: доля амитозов достоверно уменьшилась, тогда как доля микроцитов возросла. Вместе с тем, относительное количество микроядер колебалось от 0 до 2%, что не превышало уровень спонтанного мутагенеза, выявленного у плотвы (Изюмов и др., 2003).

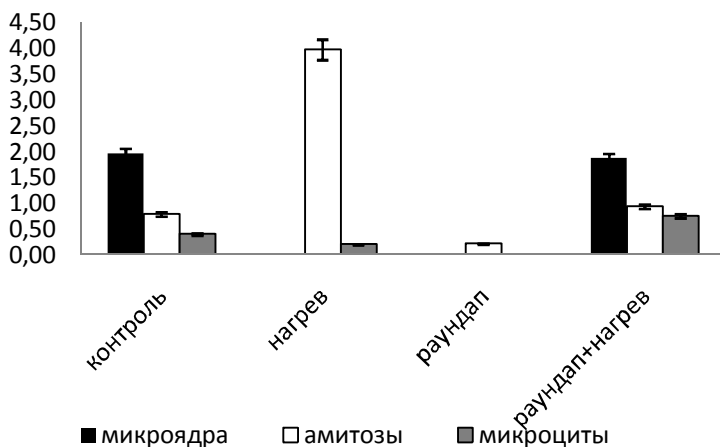


Рис. 1. Соотношение патологических нарушений в эритроцитах: микроядра (%), амитозы (%), микроциты (%).

Указанные изменения свидетельствуют о том, что Раундап, как и нагрев воды, не оказали генотоксического действия на клетки, но нагрев вызвал компенсаторную реакцию организма на кратковременную гипоксию – быстрое увеличение переносчиков кислорода в крови путем амитоза эритроцитов, тогда как Раундап в сочетании с нагревом уменьшал способность рыб компенсировать гипоксию.

Ранее некоторые авторы отмечали, что дополнительное введение в среду антропогенных факторов, таких как пестициды на основе глифосата, может привести к тому, что компенсаторные реакции станут критичными по отношению к нормальной функции и будут приводить к нарушениям как на клеточном,

организменном, так и на популяционном уровнях (Guilherme et al., 2012; Hued et al., 2012).

Анализ лейкоцитарной формулы показал, что в контроле лейкоциты ротана представлены в основном лимфоцитами и палочкоядерными нейтрофилами (Рис. 2). Доля бластных клеток, моноцитов, незрелых форм нейтрофилов (миелоцитов и метамиелоцитов), сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов колебалась в пределах 0-2%. При нагреве достоверно возрастала доля лимфоцитов и незрелых форм нейтрофилов, тогда как относительное количество бластных клеток и зрелых нейтрофилов уменьшалось. При действии Раундапа отмечали лимфопению и нейтрофилию (в основном за счет резкого увеличения количества метамиелоцитов), а также возрастание доли бластных клеток (Рис. 2).

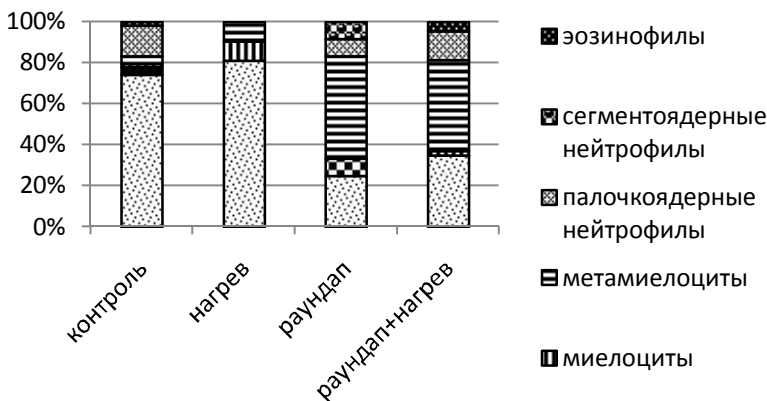


Рис. 2. Изменение лейкоцитарной формулы при действии Раундапа и нагрева воды.

Совместное действие Раундапа и нагрева приводит к увеличению доли лимфоцитов и уменьшению суммарной доли гранулоцитов в крови, но общая тенденция изменения соотношения клеток остается характерной для действия токсиканта.

В острых опытах по влиянию различных концентраций Раундапа показано увеличение гематокрита и угнетение иммунных функций, в том числе фагоцитоза (Annett et al., 2014).



При хроническом действии сублетальной концентрации пестицида нами обнаружено увеличение относительного количества потенциальных фагоцитов в периферической крови. В целом реакция лейкоцитов крови на действие гербицида носит неспецифический характер, характерный для реакции на большинство токсикантов (Заботкина, Лапилова, 2004).

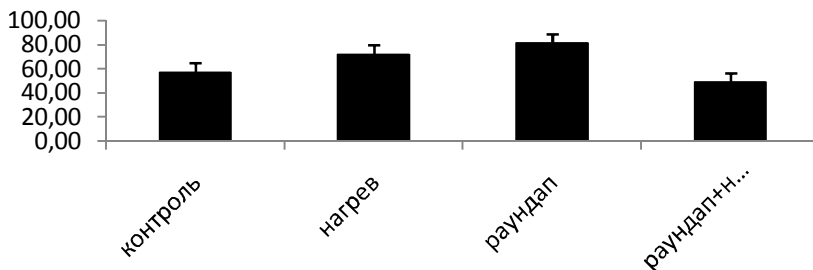


Рис. 3. Изменение доли тромбоцитов в периферической крови ротана при действии раундапа и нагрева воды.

Анализ относительного количества тромбоцитов показал достоверное увеличение количества этого типа клеток, как при действии нагрева, так и гербицида, тогда как при действии гербицида и нагрева относительное количество клеток не отличалось от контроля. По-видимому, в данном случае нагрев и токсическое влияние раундапа оказывают антагонистическое влияние, и нивелируют негативное влияние на данный показатель.

Таким образом, повышение температуры воды и хроническое действие гербицида Раундап в сублетальной концентрации, а также совместное действие этих факторов, оказывают влияние на показатели как красной, так и белой крови. По отдельности нагрев и гербицид оказывали противоположное влияние на количество амитозов в эритроцитах и соотношение лейкоцитов, а совместное действие факторов вызывало антагонистический эффект. В отношении микроцитов, напротив, каждый фактор по отдельности оказывал супрессивное влияние на данный показатель, а их совместное действие вызвало повышение доли этих клеток среди эритроцитов. В отношении эритроцитов данные факторы при совместном действии выступили антагонистами.

### Список литературы

1. Брежнев В.И. Механизированный способ борьбы с сорной растительностью на открытых мелиоративных каналах гербицидом Раундап. Автореф. дисс.... уч. степ. к.т.н. Новочеркасск, 2004. 24 с.
2. Голованов В.К., Капшай Д.С., Герасимов Ю.В., Голованова И.Л., Карабанов Д.П., Смирнов А.К., Шляпкин И.В. Термоустойчивость молоди головешки-ротана *Perccottus glenii* в осенний сезон года // Вопр. ихтиологии. 2013. Т. 53, № 2. С. 246-250.
3. Голованова И.Л., Смирнов А.К., Шляпкин И.В. Влияние температуры на активность пищеварительных карбогидраз ротана *Perccottus glenii* Dyb. в зимний период // Биол. внутр.вод. 2009. № 2. С. 90-92.
4. Голованова И.Л., Аминов А.И. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз молоди рыб и их кормовых объектов при различных значениях температуры и рН // Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер.: Рыбное хозяйство. 2013. № 1. С. 129-134.
5. Голованова И.Л., Аминов А.И., Капшай Д.С., Голованов В.К. Физиолого-биохимические и температурные характеристики сеголетков ротана при хроническом действии Раундапа // Вестник АГТУ: Рыбное хозяйство. 2013. № 3. С. 98-104.
6. Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б. Влияние пестицидов на иммунофизиологическое состояние рыб // Успехи соврем. биологии. 2004. Т. 124, № 4. С. 361-368.
7. Изюмов Ю.Г., Таликина М.Г., Чеботарева Ю.В., Чуйко Г.М. 2003. Влияние Ароклора 1254 на эмбриональную гибель, количество микроядер и митоз в родительском и первом поколениях плотвы *Rutilus rutilus* (L.) // Биол.внутр.вод. № 4. С. 85-91.
8. Каранова М. В. Состав свободных аминокислот крови и мышц ротана *Perccottus glenii* в период подготовки и завершения гибернации // Журнал эволюц. биохимии и физиол. 2009. Т. 45, № 1. С. 59-67.
9. Решетников А. Н. Современный ареал ротана *Perccottus glenii* Dybowski, 1877 (Odontobutidae, Pisces) в Евразии // Российский журнал биологических инвазий. 2009. № 3. С. 22-35.
10. Спиридонов Ю.Я., Ларина Г.Е., Протасова Л.Д., Абубикеров В.А., Жариков М.Г. Многолетнее применение общеистребительного гербицида Раундап в Центральном регионе Нечерноземья // Агрехимия. 2010. № 2. С. 29-36.
11. Annett R., Habibi H.R., Hontela A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment // J. Appl. Toxicol. 2014; 34: 458-479.
12. Braz-Mota S., Sadauskas-Henrique H., Duarte R.M., Val A.L., Almeida-Val V.M.F. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum* // Chemosphere. 2015. V. 135. P. 53-60.
13. Giesy J.P., Dobson S., Solomon K.R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 2000. V. 167. P. 35-120.

14. Guilherme S, Gaivao I, Santos MA, Pacheco M. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress // Mut. Res. - Gen. Toxicol. Environ. Mutagen 2012. Vol. 743/ P. 1-9.

15. Harayashiki C.A.Y., Varela J.A.S., de Souza M.A.A., da Costa L.C., Primeld E.G., Bianchinib A., Corcinie C.D. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water // Aquatic Toxicology. 2013. V. 142–143. P. 176-184.

16. Hardell L., Eriksson M. A Case-Control Study of Non-Hodgkin Lymphoma and Exposure to Pesticides // CANCER. 1999. Vol.85, No.6. P. 1353-1360.

17. Hued AC, Oberhofer S, Bistoni MD. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2012.62(1): 107–117.

18. IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization (March 20, 2015).

19. Moreno N.C., Sofia S.H., Martineza C.B.R. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus* // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2014. V. 37, I. 1. P. 448-454.

### **THE EFFECT OF TERM HEATING AND ROUNDUP ON HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF AMUR SLEEPER *PERCOTTUS GLENII* DUB.**

E.A. Zobotkina, V.K. Golovanov, I.L. Golovanova

The effect of chronic sublethal concentration of the Roundup (2 µg/l) and heating, as well as their joint action on some hematological parameters of *Amur sleeper* were studied. The influence of these factors on red and white blood were showed. Individually, The heating and toxicant were opposite impact on the amount amitosis in erythrocytes and leukocytes ratio, and the combined effect of factors showed antagonistic effect. With regard microcytes each factor separately provided suppressive effect on this figure, and their joint action caused the rise in the proportion of these cells include red blood cells. With respect to red blood cells, these factors had joint action antagonists.

# РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКОЛОГО-ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ХАРИУСА ЕВРОПЕЙСКОГО (*THYMALLUS THYMALLUS*) БАССЕЙНА РЕКИ СУДА В 2014 ГОДУ

А.С. Кириш

Государственный научно-исследовательский институт озерного  
и речного рыбного хозяйства, Санкт-Петербург, Россия, e-mail:  
ixora\_91@mail.ru

Паразитофауна хариуса европейского (*Thymallus thymallus*) слабо изучена. В настоящее время опубликованы данные всего по нескольким водоемам, в которых проводились исследования его паразитов, это водоемы Карелии и Кольского полуострова (Румянцев и др., 2005; Барская, Иешко, 2005; Митенев, Шульман, 2005), бассейн Камского водохранилища (Михеева, Михеев, 2014), бассейны С. Двины, Печоры, Кары (Степанов, 2007). Ранее подобных исследований паразитофауны хариуса европейского в Вологодской области не проводилось. Скорее всего, это связано с невозможностью использования промыслового лова для данного вида рыбы и занесения хариуса европейского в Красную книгу РФ по статусу - 2: сокращающиеся в численности популяции широко распространенного вида (Красная книга РФ, 2001). В Красной книге Вологодской области хариусу присвоен 3й статус, статус редкого, уязвимого вида (Красная книга Вологодской области, 2010).

Работы были начаты ещё в 2013 году, но тогда было исследовано всего 13 экз. рыб. Учитывая малочисленность материала за 2013 год, данные по заражённости хариуса за 2013 – 2014 годы включены в одну сводную таблицу. Сбор материала проводился в период июль 2013 - октябрь 2014 года. Вылов рыбы производился в трех реках: р. Колошма близ деревни Аганино, р. Суда – деревни Шома, Нижний Конец, Никольское, р. Колпь около деревни Заполье. Колошма берет начало в оз. Нижнем на Вепсовской возвышенности, течет по моренной холмистой, местами заболоченной равнине, длина реки 68 км. При слиянии с р. Ножеймой образует реку Суду. Суда протекает в Бабаевском и

Кадуйском районах и впадает в Рыбинское водохранилище. Её длина — 184 км. Река Колпь является притоком р. Суды, длина реки 254 километра. Колпь вытекает из озера Екшозеро на Вепсовской возвышенности на востоке Ленинградской области. Колпь впадает в р. Суду недалеко от деревни Усть-Колпь Кадуйского района, в 20 км выше посёлка Кадуй и в 57 км от устья Суды (Вологодская энциклопедия, 2006).

Рыбу для исследования получали от рыбаков любителей, которые ловили рыбу на искусственную приманку (нахлыст). За период 2013-2014 годов нами было исследовано 105 экземпляров хариуса, с общей длиной тела от 11,3 до 28,5 см (табл.1).

Учитывая особенности взятия материала, изучалась снулая рыба, спустя 1-3 часа после отлова, другая часть рыб просматривалась уже после заморозки, поэтому паразитологическое вскрытие было частичным, без учета кожных эктопаразитов и кровепаразитов (Догель, 1933, Быховская – Павловская, 1969).

Таблица 1. Места и время отлова хариуса европейского за 2013-2014гг.

Время отлова	Река Колошма	Река Суды	Река Колпь	Всего
Июль 2013г	-	4	-	4
Сентябрь 2013г	-	9	-	9
Июнь 2014г	10	21	-	30
Июль 2014г	-	11	3	14
Август 2014г	-	23	-	23
Сентябрь 2014г	-	8	7	15
Октябрь 2014 г	-	10	-	10
Всего	10	86	10	105

Всего за период исследования в 2013-2014 гг. было обнаружено 15 видов паразитов, относящихся к 6 систематическим группам (табл.2).

Принимая во внимание особенность лова и транспортировки хариуса европейского, кожная паразитофауна могла быть утеряна и в наших исследованиях не рассматривалась. Эктопаразиты представлены двумя видами жаберных моногеней *Discocotyle lesagittata* и *Tetraonchus borealisf. minor*, а также редкими находками *Glochidium sp.* В желудочно-кишечном тракте хариуса

найжены три вида нематод, один вид трематод и один вид цестод. На других внутренних органах были обнаружены многочисленные цисты с личинками нематоды *Raphida scarisacus*. В глазах паразитируют метацеркарии двух видов трематод рода *Diplostomum*, *Phyllodistomum sp.* в почках, плероцеркоиды *Trianaophoru nodulosus* на печени и миксоспоридии рода *Mухobolus* в головном мозгу и в мышцах.

Паразитофауна хариуса в целом очень обедненная, что связано с образом жизни на течении, а не в зарослях водных растений, на что указывает низкая зараженность метацеркариями *Diplostomum*. Хариус чаще стоит за камнями, охотится на открытых участках реки. В его желудочно-кишечном тракте в основном присутствовали мелкие водные беспозвоночные: личинки, нимфы и взрослые формы амфибиотических насекомых – веснянок, поденок, ручейников, хирономид. В летнее время наряду с водными беспозвоночными в пищевом рационе хариуса резко возростала доля наземных насекомых. В период, когда над водоемом наблюдается массовый лет насекомых, хариус начинает на них целенаправленно охотиться, съедать как насекомых, попавших в воду, так и, выпрыгивая, схватывать их на лету.

Более всего хариус европейский инвазирован кишечной нематодой *Cystidicoloide sephemeridarum*, что связано с преобладанием в спектре питания личинок и имаго поденок. В реке Суда отмечено почти 100% заражение хариуса европейского этим паразитом, причем интенсивность инвазии достигает до 277 червей на одну рыбу.

Таблица 2. Видовой состав обнаруженных у хариуса паразитов с указанием локализации, мест вылова и зараженности.

Вид паразита	Локализация	Р. Колошма	Р. Суда	Р. Колпь
Кл. Mухosporaea 1. <i>Mухobolus sp.</i>	Мышцы	70,0/160(112)	31,4/77(24,16)	-
2. <i>Mухobolus neurobius</i>	Спинальный мозг Головной мозг (споры) Почки (споры)	-	1,2/2(0,02) 2,3/1(0,02) +	-
Кл. Monogenea 3. <i>Discocotylea gittata</i>	Жабры	-	1,2/1(0,01)	-
4. <i>Tetraonchus borealis f. minor</i>	Жабры	30,0/2,7(0,8)	15,1/2,6(0,4)	-
Кл. Trematoda	Пилорические			

5. <i>Crepidostomu msp.I</i>	отростки	10,0/1(0,1)	8,1/3(0,2)	-
6. <i>Crepidostomu msp.II</i>	Желчный пузырь	-	1,2/1(0,01)	-
7. <i>Diplostomum sp. I</i>	Хрусталик глаза	10,0/3(0,3)	5,8/3(0,2)	-
8. <i>Diplostomum sp. II</i>	Стекловидное тело	10,0/1(0,1)	2,3/1(0,02)	-
9. <i>Phyllodistomu msp.</i>	Почки	-	5,8/1,4(0,08)	-
Кл. Cestoda 10. <i>Triaenophorus nodulosus</i>	Печень	-	4,65/1,75(0,08)	-
11. <i>Proteocephalus sp.</i>	кишечник	-	1,2/2(0,02)	-
Кл. Nematoda 12. <i>Cystidicoloides phemeridarum</i>	Пищевод	-	25,6/4,9 (1,3)	-
	Желудок	80,0/12,9(10,3)	96,5/32,4(31,3)	-
13. <i>Raphidascaris sacus</i>	Желудок (взрослые)	-	16,3/4,7(0,8)	10,0/2(0,2)
	Личинки в цистах:			
	Кишечник	20,0/1,5(0,2)	52,3/4,4(2,3)	80,0/8,7(7)
	Печень	-	18,6/1,3(0,2)	-
	Пилорические отростки	20,0/1(0,2)	34,8/1,9(0,7)	40,0/2,7(1,1)
	Стенка желудка	10,0/1(0,1)	5,8/1,2(0,07)	30,0/2,7(0,8)
	Жировые скопления	-	8,1/1,3(0,1)	-
	Плавательный пузырь	-	2,3/1(0,02)	-
14. <i>Capillariasalvelini</i>	желудок	-	8,1/2(0,2)	-
15. Семейство Unionidae	Жабры	-	2,3/3,5(0,08)	-

*Примечание.* В числителе – экстенсивность заражения (%), в знаменателе – интенсивность заражения, в скобках – индекс обилия.

Широко распространённым паразитом оказался и *Raphidascaris sacus*. Причем, наличие как личинок, в цистах на различных внутренних органах, так и взрослых форм этой нематоды объясняется присутствием в спектре питания хариуса европейского молоди различных видов рыб.

Также установлен высокий процент заражения хариуса ранее не отмеченной для этого вида рыб мышечной миксоспоридией *Muxobolus sp.* Информация о подобном паразите

в литературе отсутствует, и не исключено, что он является новым видом.

В целом паразитофауна хариуса европейского бассейна реки Суды значительно беднее водоемов Кольского региона (Митенев, Шульман, 2005). В наших исследованиях обнаружено 15 видов, тогда как в Кольском регионе 49. В ходе изучения паразитофауны хариуса рек северо-востока европейской части России (Степанов, 2007), в частности рек Илыч и Б. Макариха (бассейн Печоры) обнаружено 10 видов паразитов, из которых общими с нашими исследованиями являются 6 видов. К различиям следует отнести находки в хариусах реки Суды двух видов цестод, отсутствующих в исследованиях В.Г.Степанова. Это свидетельствует как о питании хариуса бассейна реки Суды циклопами, так и присутствии в реке щуки. Сравнение мы считаем возможным только с этими реками в работе В.Г. Степанова, т.к. по ним приведены сведения о возрастной динамике паразитофауны хариуса европейского, и эти данные совпадают с возрастным диапазоном хариусов в нашей работе.

Исследование паразитофауны хариуса европейского (*Thymallus thymallus*) нами будет продолжено, предполагается определение видовой принадлежности всех найденных паразитов, а также планируется увеличение района исследования.

#### Список литературы

Барская Ю.Ю., Иешко Е.П. Формирование паразитофауны лососевидных рыб озерно-речной системы Паанаярви-Оланга // Паразитология. 2005. Т. 39, вып. 1. С.25-37.

Быховская–Павловская И.Е. Паразиты рыб. Руководство по изучению. Ленинград: Наука, 1969. 121 с.

Вологодская энциклопедия. Вологда: ВГПУ, изд-во «Русь», 2006. 608 с, илл.

Догель В.А. Проблемы исследования паразитов рыб. Методика и проблемы ихтиопаразитологических исследований. // Тр. Лен. общ-ва естествоиспытателей, вып.3. Ленинград. 1933. 268 с.

Красная книга Вологодской области. Том 3. Животные / Отв. ред. Н.Л. Болотова, Э.В. Ивантер, В.А. Кривохатский. Вологда: ООО ПФ «Полиграф-Книга», 2010. 216 с.

Красная книга Российской Федерации (животные) / РАН; Гл. редкол.: В. И. Данилов-Данильян и др. М.: АСТ: Астрель, 2001.



Митенев В.К., Шульман Б.С.. Паразитофауна хариуса *Thymallus thymallus* (L.) водоемов Кольского региона // Лососевидные рыбы Восточной Фенноскандии. Петрозаводск, 2005. С. 90-96.

Михеева О.И., Михеев П.Б.. Предварительные данные по паразитофауне рыб Бассейна Камского водохранилища Часть 2. Обсуждение // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. Т. 16, № 5(1). С. 582-587.

Румянцев Е.А., Иешко Е.П., Шульман Б.С. Паразиты лососевидных рыб (Salmonoidei) европейского севера России // Лососевидные рыбы Восточной Фенноскандии. Петрозаводск, 2005. С. 116-130.

Степанов В.Г., 2007. Экология паразитов гольяна *Phoxinus phoxinus* (L.) и хариуса *Thymallus thymallus* (L.) и их компонентные сообщества в бассейнах рек северо-востока европейской части России: Автореф. дис.... канд. биол. наук. Борок: ИБВВ.

### THE RESULTS OF ECOLOGICAL-PARASITOLOGICAL RESEARCH OF THE EUROPEAN GRAYLING (*THYMALLUS THYMALLUS*) IN THE RIVER BASIN OF THE SUDA IN 2014

Kirish A.S.

Data on a parasite fauna of the European grayling (*Thymallus thymallus*) from the Suda`sriver basinare given.15 species of parasites were detected including 2 species of Mухosporеа, 2 Monogenea, 2 Cestoda, 5 Trematoda, 3 Nematoda and 1 species of Unionidae.

### ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ КИШЕЧНИКА РЫБ

Е.А. Куливацкая<sup>1</sup>, Е.Л. Грачева<sup>2</sup>, В.В. Чиркова<sup>2</sup>, В.В. Кузьмина<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина  
РАН, 152742. п. Борок Ярославской обл., e-mail:

[vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru)

<sup>2</sup>ФГБОУ Ярославский государственный университет  
им. П.Г. Демидова, 150000. Ярославль

Хорошо известно, что состояние иммунной системы в значительной мере зависит от эффективности питания рыб (Микряков, 1991). При этом активность ферментов, обеспечивающих гидролиз различных компонентов пищи, может значительно снижаться в результате загрязнения водоемов отходами промышленного производства. В водные экосистемы ежегодно попадает около 300 мил. тонн синтетических

соединений (Clayton., Clayton, 1994). В их число входят фенолы, которые в значительных концентрациях поступают в воду со стоками предприятий нефте- и сланцеперерабатывающей, коксо- и лесохимической, а также химической промышленности (Орлов и др., 2002; Michałowicz, 2007). При значительном увеличении концентрации фенола и его производных в воде они становятся опасными. Известно о негативном влиянии фенола на различные системы организма рыб (Лукьяненко, 1983; Алабастер, Ллойд, 1984; Флеров, 1989; Michałowicz, 2007). Вместе с тем сведения о влиянии фенола и его производных на активность пищеварительных гидролаз у рыб в доступной литературе фактически отсутствуют. Известно лишь об ингибирующем влиянии фенола и его производных (4-хлорфенола, 4-нитрофенола и 2,4-динитрофенола) в концентрации 1 ммоль на активность гемоглобинлитических протеаз слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб разных видов (Кузьмина и др., 2014). Данные, касающиеся влияния фенолов на активность гликозидаз, в литературе не найдены. Вместе с тем от эффективности функционирования ферментных систем пищеварительного тракта в значительной степени зависит физиолого-биохимический статус рыб, в том числе состояние их иммунной системы.

Цель работы – изучение влияния различных концентраций фенола и 4-нитрофенола на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника у рыб разных таксономических и экологических групп.

Объекты исследования: взрослые особи леща *Abramis brama* (L.)г, синца *Abramis ballerus* (L.), густеры *Blicca bjoerkna* (L.), плотвы *Rutilus rutilus*, речного окуня *Perca fluviatilis* L., судака *Zander lucioperca* (L.) и налима *Lota lota* (L.) из Рыбинского водохранилища. Рыб в течение 1-2 ч после поимки доставляли в лабораторию. Сразу проводили биоанализ, изымали пищеварительный тракт и замораживали. Для получения ферментативно активных препаратов кишечник рыб помещали на ледяную баню, очищали от жира, разрезали вдоль, изымали содержимое и специальным скребком снимали слизистую оболочку медиального отдела кишечника. Слизистую оболочку тщательно перемешивали. Затем отбирали требуемое количество

материала для приготовления исходного гомогената. Пробы гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с небольшим количеством раствора Рингера для холоднокровных животных (103 мМ NaCl, 1.9 мМ KCl, 0.45 мМ CaCl<sub>2</sub>) при температуре 1-2°C. Для этого стеклянный гомогенизатор помещали в стакан со льдом. Затем полученный гомогенат дополнительно разводили раствором Рингера до конечного разведения – от 1:39 до 1:799.

Для оценки влияния фенола и 4-нитрофенола на активность гликозидаз пищеварительного тракта рыб 0.25 мл гомогената и 0.25 мл одного из токсикантов в концентрации от 0.06 до 1.0 ммоль/л (после разведения гомогенатом – 0.03 до 0.5 ммоль/л) инкубировали в течение 1 ч. После этого в пробирки добавляли 0.5 мл субстрата и смесь инкубировали еще 30 мин. Все операции проводили при температуре 20°C и непрерывном перемешивании. Активность гликозидаз (суммарная активность  $\alpha$ -амилазы, КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы, КФ 3.2.1.3 и ферментов группы мальтаз, КФ 3.2.1.20) оценивали по увеличению концентрации гексоз методом Уголева и Иезуитовой (1969). В качестве субстратов использовали 1% раствор растворимого крахмала (рН 7.4). Активность ферментов определяли в 4–5-ти повторностях с учетом фона (количество гексоз в исходном гомогенате). Об уровне ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата с учетом фона (количество тирозина в исходном гомогенате) в расчете на 1 г сырой массы ткани, мкмоль/(г·мин). Интенсивность окрашивания определяли на фотоколориметре (КФК-2) при красном светофильтре,  $\lambda=670$  нм. Результаты обработаны статистически при помощи стандартного пакета программ (Microsoft Office 95, приложение Excel). Степень различия между средними арифметическими ( $M \pm m$ ) оценивали с помощью критерия Стьюдента при  $p \leq 0.05$ –  $p < 0.001$ .

Активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника у рыб разных видов существенно различается. Вместе с тем эффекты фенола и 4-нитрофенола, как правило, не зависят от уровня ферментативной активности. Действительно, в группе бентофагов, относящихся к сем. карповых Cyprinidae (рис. 1, 2)

наиболее близкие значения ферментативной активности отмечены у леща и густеры.

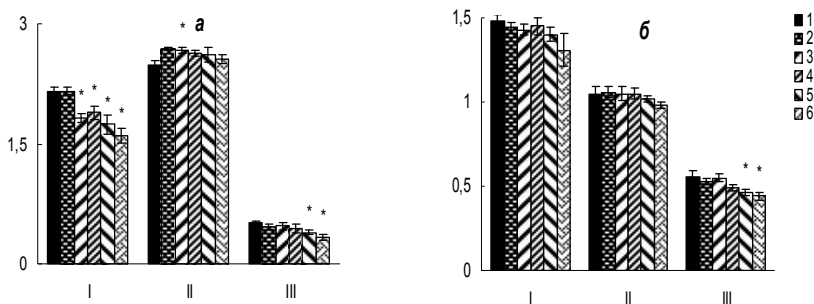


Рис. 1. Влияние фенола (а) и 4-нитрофенола (б) на амилолитическую активность слизистой оболочки кишечника у леща, густеры и синца. Обозначения: по оси абсцисс – виды рыб: I – лещ; II – густера; III – синец. По оси ординат активность гликозидаз, мкмоль/(г·мин). 1-6 – концентрация фенолов: 1 – 0; 2 – 0.03; 3 – 0.06; 4 – 0.125; 5 – 0.25; 6 – 0.5, ммоль/л.

Вместе с тем фенол значительно снижает активность гликозидаз у леща (максимум на 26 % по сравнению с контролем) и незначительно увеличивает таковую у густеры. У плотвы, отличающейся наиболее высоким уровнем гликозидаз, ферментативная активность, как и у леща, снижается, но лишь в пределах 15% по сравнению с контролем. Важно отметить, что 4-нитрофенол не действует на ферменты леща и густеры, но последовательно и достоверно ( $p < 0.05$ ) снижает активность гликозидаз у плотвы (максимум на 45% по сравнению с контролем). У планктофага синца, близкого в систематическом отношении к лещу, активность гликозидаз значительно ниже, чем у бентофагов. При этом под влиянием обоих токсических веществ уровень ферментативной активности у рыб этого вида снижается в пределах 36% (фенол) и 22% (4- нитрофенол) по сравнению с контролем.

В группе ихтиофагов наименьшая активность гликозидаз у типичного ихтиофага судака и близкая – у факультативных ихтиофагов окуня и налима, несмотря на то, что два первых вида

относятся к сем. окуневых Percidae, в то время как третий вид – к сем. налимовых Lotidae (рис. 2, 3). При этом у налима активность гликозидаз в присутствии фенола не изменяется, в присутствии 4-нитрофенола незначительно снижается, максимум на 14% ( $p < 0.05$ ).

У судака фенол достоверно ( $p < 0.05$ ) снижает активность гликозидаз слизистой оболочки (максимум на 55%) по сравнению с контролем. В присутствии 4-нитрофенола уровень ферментативной активности также последовательно снижается (максимум на 52%), достоверно при всех концентрациях ( $p < 0.05 - p < 0.001$ ). Оба исследованных вещества фактически не влияют на активность гликозидаз слизистой оболочки у окуня.

При обсуждении полученных результатов следует отметить зависимость активности гликозидаз, функционирующих в кишечнике, от характера питания рыб. Действительно, уровень активности ферментов слизистой оболочки у моллюскоеда плотвы значительно выше, чем у других бентофагов (лещ, густера) и, особенно у факультативных (окунь, налим) и типичных (судак) ихтиофагов. Эти данные хорошо согласуются с ранее полученными результатами (Уголев, Кузьмина, 1993).

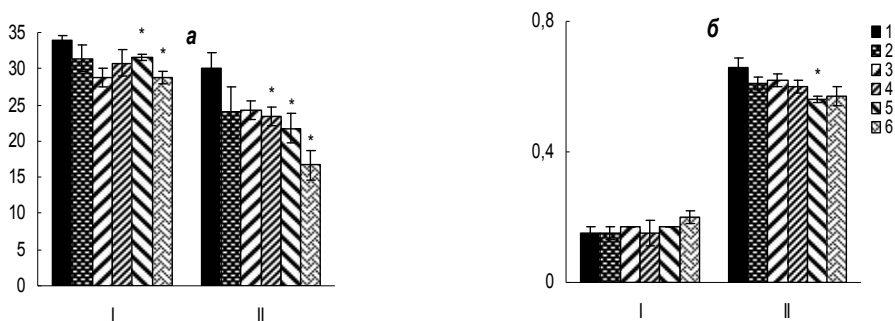


Рис. 2. Влияние фенола (I) и нитрофенола (II) на амилолитическую активность слизистой оболочки кишечника плотвы (а) и налима (б).

Обозначения: по оси абсцисс: I – фенол, II – 4-нитрофенол. По оси ординат активность гликозидаз, мкмоль/(г·мин). 1–6 концентрация фенолов: 1 – 0; 2 – 0.03; 3 – 0.06; 4 – 0.125; 5 – 0.25; 6 – 0.5 ммоль/л.

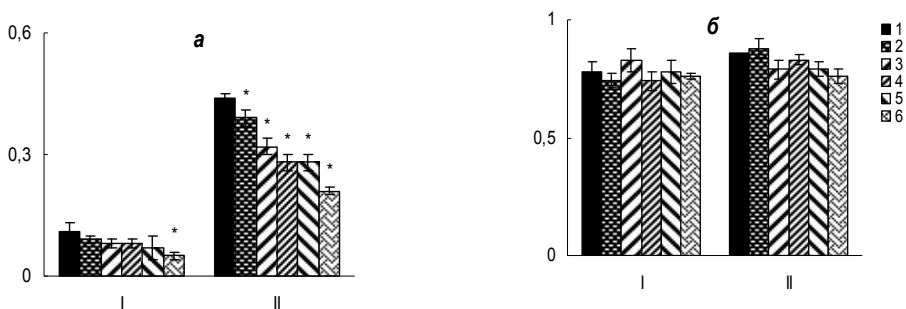


Рис. 3. Влияние фенола (I) и нитрофенола (II) на амилолитическую активность слизистой оболочки кишечника судака (а) и окуня (б).  
Обозначения, как на рис. 2.

При обсуждении данных, касающихся влияния фенола и 4-нитрофенола, важно подчеркнуть, что исследованные концентрации фенола 0.03-0.5 ммоль/л или 2.8-47.1 мг/л сопоставимы с концентрациями, наблюдающимися при антропогенном загрязнении водоемов (Michałowicz, Duda, 2007).

Кроме того, важно отметить, что в гастроэнтерологии модификаторные эффекты, не превышающие 15%, не принято рассматривать, как значимые. В связи с этим даже при наличии достоверных изменений уровня ферментативной активности по сравнению с контролем, наблюдаемые эффекты не принимаются во внимание. Особое внимание необходимо обратить на разную чувствительность отдельных видов рыб к фенолу. У рыб, близких по типу питания (лещ, густера), эффекты фенолов различны, в то время как у рыб, различающихся по характеру питания, но наиболее близких в систематическом отношении представителей рода *Abramis* (бенитофаг лещ и планктофаг синец) – сходными: наблюдается эффект торможения активности гликозидаз. Наиболее чувствительными к действию фенола оказались ферменты судака, синца и леща, наиболее устойчивыми гликозидазы густеры, налима и окуня. Данные, касающиеся влияния фенола на активность гликозидаз у леща и окуня, близки таковому протеиназ (Кузьмина и др., 2014). 4-нитрофенол

фактически не действует на ферменты леща и густеры, незначительно снижает активность гликозидаз у налима и синца, резко снижает у судака и плотвы.

Важно отметить, что характер влияния обоих токсикантов на гликозидазы у всех видов рыб в значительной степени совпадает. Так, у леща, синца, плотвы и судака наблюдается снижение или тенденция к снижению ферментативной активности в присутствии фенола и 4-нитрофенола, у густеры, налима и окуня эффект фактически отсутствует. Ранее высказывалось предположение о том, что различная степень влияния фенола и его производных на гемоглобинлитические (химотрипсиноподобные) протеиназы у рыб одного и того же вида обусловлена их взаимодействием с разными регуляторными сайтами ферментов, у разных видов – различиями в аминокислотном составе и структуре белковых глобул ферментов. При этом указанные вещества, влияя на регуляторные центры протеиназ, способны изменять конформацию их активных центров, в результате чего снижается эффективность взаимодействия ферментов и субстратов (Кузьмина, 2014). Вместе с тем разная степень снижения уровня ферментативной активности в присутствии этих веществ может быть в значительной мере обусловлена разной чувствительностью к фенолам разных ферментов цепи гликозидаз ( $\alpha$ -амилазы и мальтазы).

Таким образом, в условиях *in vitro* фенол в концентрациях 0.03–0.5 ммоль/л значительно снижает активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника у судака, синца и леща, 4-нитрофенол – у судака и плотвы. Гликозидазы густеры, окуня и налима устойчивы к действию этих токсических веществ.

#### Литература

1. Алабастер Дж., Ллойд Р. Критерии качества воды для пресноводных рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1984. 344 с.
2. Кузьмина В.В., Грачева Е.Л., Тарлеева А.Ф., Тажимуратова У.Ж. Влияние фенола и его производных на активность гемоглобинлитических протеаз слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб разных видов // Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы. Матер. V всерос. конф. по водной экотоксикологии, посвященной памяти Б.А.Флерова. 2014. ч. 2. С. 62-66.

3. Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология. М.: Легкая и пищевая промышленность 1983. 320 с.
4. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. 153 с.
5. Орлов Д.С., Садовникова Л.К., Лозановская И.Н. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении. М.: Высшая школа, 2002. 334 с.
6. Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных // СПб. Наука. 1989. 144 с.
7. Уголев А.М., Иезуитова Н.Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. Л.: Наука. 1969. С. 169-173.
8. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеоиздат. 1993. 238 с.
9. Clayton G.D., Clayton F.E. Patty's industrial hygiene and Toxicology. New York: John Wiley & Sons inc. 1994. 132 p.
10. Michałowicz J., Duda W. Phenols – Sources and Toxicity // Polish J. Environ. Stud. 2007. V. 16, N. 3. P. 347–362.

## **ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПСЕВДОМОНАД, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДЫ И СУДАКА (*SANDER LUCIOPERCA*) И ИХ ПАТОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ В ДЕЛЬТЕ Р. ВОЛГИ**

Л.В. Ларцева<sup>1</sup>, О.В. Обухова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет»,  
Астрахань, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный технический  
университет», Астрахань, Россия, e-mail: [obuhowa-ov@yandex.ru](mailto:obuhowa-ov@yandex.ru)

В связи с интенсивным биологическим загрязнением гидросферы открытых водоемов создаются условия, благоприятные для развития и накопления условно – патогенных микроорганизмов, в частности, псевдомонад. Их важнейшие биологические свойства – наличие адаптационного потенциала, отражающегося качественными и количественными проявлениями ферментативной активности. Особое значение имеет свойство этих бактерий продуцировать ферменты защиты и агрессии, участвующие в процессах адгезии и инвазии (Бухарин, 1999; 2012). Как все возбудители сапронозных инфекций людей, псевдомонады способны быстро адаптироваться к постоянно



меняющимся условиям окружающей среды и при массовом развитии могут обуславливать различные патологические процессы у людей. Эволюционным проявлением этих бактерий является освоение ими новых биотопов в организме человека - ожоговых, операционных ран, поражений кожи, глаз, ушей, мозговых оболочек, органов дыхания (Покровский и др., 2011; Холодок и др., 2014). Широко распространенные в гидроэкосистемах, различные виды псевдомонад могут инициировать заболевания рыб и других гидробионтов. Они способны контаминировать рыбу и рыбопродукты и процессе хранения на холоде превалировать над другой микрофлорой (Долганова и др., 2005; Ларцева и др., 2008).

Ранее в Волго – Каспийском бассейне псевдомонады доминировали в микробном пейзаже воды и промысловых видах рыб, уступая по частоте встречаемости только энтеробактериям и аэромонадам (Ларцева, 1998; Обухова, 2004). В Каспийском море бактерии этого рода инфицировали воду, бычков, осетров, желтелых гребневигов (Лисицкая, 2008).

В связи с этим, изучение факторов патогенности псевдомонад, циркулирующих в воде и рыбе в условиях антропогенеза, сегодня является актуальным и своевременным.

Материалом для исследований служили 375 проб воды и 447 экз. судака, собранные посезонно с 1995 по 2010 гг. в дельте р. Волги – в районах Главный, Гандуринский банки, р. Бузан. У рыб анализировали жабры, кровь, кишечник, паренхиматозные органы, мышцы. За этот период проанализировано более 3-х тысяч бактериальных культур. Из воды было выделено 375; из рыбы – 720 штаммов, идентифицированных как *Pseudomonas* (Берджи, 1997). Персистентные свойства изучали по общепринятым методам (Бухарин, 1999).

Статистическую обработку проводили с использованием компьютерных программ Statistica for Windows. Значимые различия при  $P < 0,05$ .

Результаты проведенного анализа показали, что псевдомонады в удельном весе всей выделенной микрофлоры составляли в воде  $30,4 \pm 0,6$ ; в рыбе –  $20,8 \pm 0,6$  % проб. В структуре рода в обоих эконишах доминировали штаммы *Ps.*

*alcaligenes* и *Ps. fluorescens* (табл.1). Эпидемически значимая *Ps. aeruginosa* была зарегистрирована в воде жарким летом 2010г. единичными штаммами. Основными биотопами выделенных нами псевдомонад были желудочно-кишечный тракт, жабры и почки, в которых содержание этих бактерий было выше ( $P < 0.05$ ;  $r = 0,81$ ), чем в крови и мышцах. Значительное обсеменение желудочно-кишечного тракта рыб бактериями этого рода отмечено ранее (Ларцева, 1998; Обухова, 2004; Лисицкая, 2008).

Таблица 1. Удельный вес псевдомонад, выделенных из воды и рыбы (в структуре рода)

Виды псевдомонад	Процент штаммов	
	вода	рыба
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	41,1±0,7	36,5±0,6
<i>Ps. alcaligenes</i>	33,2±0,9	36,1±0,7
<i>Ps. syringae</i>	13,7±0,7	16,9±0,9
<i>Ps. putida</i>	10,5±0,9	10,3±0,8
<i>Ps. aeruginosa</i>	1,6±0,9	-

Существенных различий в микробном пейзаже воды и судака по районам исследований нами не выявлено. Однако эти бактерии имели сезонную цикличность с подъемами своего развития весной и осенью, совпадающие с промысловым периодом в дельте р. Волги.

Таблица 2. Средние данные по факторам патогенности у тестируемых псевдомонад

Тести-руемые микро-организмы	биотоп	Рост при +37°C	протеаза	лецитиназа	гемолизин	Ката-лаза
		процент позитивных штаммов				
<i>Pseudomonas spp.</i>	рыба	28,6	27,0	57,8	37,1	59,6
	вода	33,7	30,6	67,5	38,8	81,4
<i>Ps.alcaligenes</i>	рыба	73,9	93,7	16,7	70,1	77,3
	вода	79,8	98,2	20,8	83,4	89,6
<i>Ps. fluorescens</i>	рыба	54,6	96,3	46,6	16,7	55,6
	вода	69,6	100,0	54,2	17,3	73,5
<i>Ps. putida</i>	рыба	10,6	-	-	-	26,1
	вода	14,0	-	-	-	28,4
Средние значения	рыба	42,0	54,3	30,3	31,0	54,7
	вода	48,3	57,2	35,6	34,9	68,2

Фактические материалы, приведенные в табл. 2 свидетельствуют о том, что все виды и штаммы, выделенные из воды и рыбы, со значительной долей вариабельности обладали набором факторов патогенности. Однако все тестируемые штаммы псевдомонад были инертны по отношению к реакции Фогес-Проскауэра и наличию уреазы, что, по-видимому, обусловлено биохимическими свойствами этих бактерий.

Максимальные значения маркеров патогенности отмечены у водных и рыбных штаммов *Ps. alcaligenes* и *Ps. fluorescens*; минимальные – у *Ps. putida*. Штаммы последнего вида были инертны по протеазе, лецитиназе, гемолизину (табл. 2). Во всех случаях, у водных штаммов показатели всех тестируемых факторов патогенности в среднем были в 1,1-1,2 раза выше, чем у рыбных ( $P < 0,05$ ;  $r=0,89$ ), что согласуется с ранее проведенными исследованиями в этом регионе (Ларцева, 1998; Обухова, 2004; Лисицкая, 2008).

Анализ материала показал существенную гетерогенность всех испытываемых нами маркеров патогенности у бактерий этого рода.

Возможность роста условно-патогенных микроорганизмов при  $+37^{\circ}\text{C}$  свидетельствует о высокой экологической пластичности псевдомонад и их эпидемической опасности для людей. Именно этим биологическим свойством, по-видимому, можно объяснить «уход» и «приход» водных сапронозов в разные сезоны года (Бухарин, 1999; 2012; Яковлев, 2011).

У водных штаммов псевдомонад способность роста при  $+37^{\circ}\text{C}$  в среднем была выше, чем у рыбных в 1,2 раза ( $P < 0,05$ ;  $r=0,91$ ). Максимальные значения этого признака были отмечены у *Ps. alcaligenes* и *Ps. fluorescens*; минимальные – у *Ps. putida*. Анализ полученных данных показал, обратную зависимость общего вегетирования бактерий этого рода в воде и рыбе по сезонам года и способности их роста при  $+37^{\circ}\text{C}$ . На фоне снижения их встречаемости в этих биотопах летом, отмечен подъем их роста при  $+37^{\circ}\text{C}$  в воде и рыбе в 1,7 и 2,1 раза, соответственно, по сравнению с весной. Осенью вновь происходило снижение способности вегетирования в воде и рыбе в 1,4 и 1,6 раза ( $P < 0,05$ ;  $r=0,81$ ), соответственно. В связи с этим возможно

предположить наличие у псевдомонад различных биоваров с повышенной «летней» ферментативной активностью, что придает им определенную эпидемиологическую значимость.

В пользу этого свидетельствуют данные по протеолитической и лецитиназной активности, которые обуславливают расщепление белков, лизис мышечной ткани, автолиз и порчу рыбы вследствие проникновения псевдомонад в ее организм (Долганова и др., 2005). Показатели этих признаков у анализируемых бактерий, выделенные из воды и рыбы, имели динамичный рост от весны к осени в 1,3 раза. Исключением были водные и рыбные штаммы *Ps. putida*, которые были инертны по отношению протеазы и лецитиназы.

Гемолитическая активность бактерий (феномен Канагава) – показатель способности гемолизировать эритроциты человека. Является важным фактором патогенности многих микроорганизмов. Гемолизин обуславливает продукцию цитолизина, который оказывает повреждающее действие на клеточные мембраны, поэтому может служить критерием эпидемиологического благополучия исследуемого биоценоза. Этот персистентный признак был зарегистрирован у всех выделенных нами псевдомонад, за исключением штаммов *Ps. putida*. Средние данные без учета сезонной динамики свидетельствуют о небольших различиях наличия гемолизина у рыбных и водных штаммов ( $P < 0,05$ ;  $r=0,82$ ). Весной процент гемолизинпозитивных штаммов в воде и рыбе составлял  $25,8 \pm 0,6$  и  $21,2 \pm 0,8$ ; летом –  $36,7 \pm 0,7$  и  $34,2 \pm 0,5$ ; осенью –  $42,1 \pm 0,4$  и  $37,5 \pm 0,8\%$ , соответственно. При этом, максимальные показатели этого признака отмечены у водных и рыбных штаммов *Ps. alcaligenes*; минимальные – *Ps. fluorescens*. Сезонная динамика гемолитической активности по своим значениям показала динамичный рост от весны к осени, как у водных в 1,2 раза, так и рыбных штаммов. *Ps. aeruginosa*, зарегистрированная нами единичными штаммами только летом 2010 г. в воде, во всех случаях обладала гемолизином. Ранее существенных различий у гемолитически активных штаммов псевдомонад, выделенных из воды и судака, не было отмечено (Обухова, 2004). Следовательно, полученные данные по наличию гемолизина у псевдомонад,

персистирующих в гидроэкосистеме дельты р. Волги, свидетельствуют о ее эпидемиологическом неблагополучии.

Каталазная активность – как защитная функция бактерий, весьма зависимая от растворенного в воде кислорода и температурного режима гидроэкосистем, была зарегистрирована практически у всех анализируемых видов и штаммов псевдомонад, за исключением изолятов *Ps. putida* в летний сезон. Максимальными значениями этого признака в обоих биотопах обладали штаммы *Pseudomonas spp.*; минимальными – *Ps. putida*. Сезонная периодичность каталазной активности у всех видов и штаммов псевдомонад характеризовалась значительными подъемами в весенний (водные штаммы –  $76,8 \pm 0,8$ ; рыбные –  $62,6 \pm 0,7\%$ ) и особенно в осенний сезоны (водные штаммы –  $81,0 \pm 0,6$ ; рыбные –  $65,9 \pm 0,7\%$ ) и резким спадом в летний период (водные штаммы –  $46,9 \pm 0,6$ ; рыбные –  $35,5 \pm 0,8\%$ ) ( $P < 0,05$ ;  $r = 0,89$ ). Наиболее четко выраженными сезонными колебаниями каталазы характеризовались водные и рыбные штаммы *Ps. alcaligenes*. Весной и осенью водные и рыбные штаммы по каталазе были позитивны в  $100 \pm 0,9$ ;  $88,4 \pm 0,8$  и  $86,1 \pm 0,8\%$  случаях, соответственно. Летом показатели этого признака у штаммов, изолированных в этих биотопах, снижалась в 1,5 раза ( $P < 0,05$ ;  $r = 0,91$ ). Отмечена прямая зависимость встречаемости всех видов псевдомонад в обоих биотопах; увеличения или ослабления экспрессии каталазы в зависимости от таких абиотических факторов среды как температурный и кислородный показатели, которые определяют детоксикацию перекиси водорода. Видимо, поэтому показатели каталазы у псевдомонад значительно снижались в летний сезон в обоих биотопах. В связи с этим можно предположить, что сезонная летняя «депрессия» этих бактерий связана в определенной мере с падением их каталазной активности, которая играет существенную роль в саморегуляции микробных сообществ.

Условно-патогенные псевдомонады, как возбудители сапронозных инфекций людей, весьма адаптивны к различным экологическим нишам благодаря своим персистентным свойствам. При смене биотопов: вода – фито-, зоопланктон – рыба – человек у микроорганизмов будут появляться или усиливаться

биологические свойства (факторы патогенности/персистенции), облегчающие им адаптацию к новым условиям обитания.

Анализ фактического материала показал, что обитающие в воде и рыбе псевдомонады обладали определенным набором факторов патогенности: способностью роста при +37°C, протеазой, лецитиназой, гемолизином и каталазой. Во всех случаях штаммы этих бактерий, выделенных из воды, имели патогенные признаки в среднем в 1,2 раза выше, чем изолированные из рыбы. Как правило, грамотрицательные неферментирующие псевдомонады показали обратную зависимость их встречаемости в воде и рыбе с показателями факторов патогенности, за исключением экспрессии каталазы, которая имела максимальные показатели весной и осенью. Наиболее четко и выражено они проявлялись у штаммов *Ps. alcaligenes* и *Ps. fluorescens*. Способность роста при +37°C у анализируемых псевдомонад с максимальными значениями отмечена летом, с небольшим спадом осенью. По другим тестируемым факторам патогенности (протеазе, лецитиназе и гемолизину) отмечен динамичный рост цифровых показателей от весны к осени.

Таким образом, приведенные данные многолетнего фактического материала свидетельствуют о широком распространении псевдомонад в дельте р. Волги и о наличии у них важных персистентных/патогенных свойств, обуславливающих экологическую и эпидемиологическую напряженность гидросистемы, особенно в летне-осенний сезоны.

#### Список литературы

- Берджи. Определитель бактерий. М.: Мир, 1997. 799 с.
- Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. 336 с.
- Бухарин О.В. От персистенции к симбиозу//Микробиология. 2012. №4. С. 4-9.
- Долганова Н.В., Першина Е.В., Хасанова З.К. Микробиология рыбы и рыбных продуктов. М.: Мир, 2005. 224 с.
- Ларцева Л.В. Гигиеническая оценка по микробиологическим показателям рыбы и рыбных продуктов Волго-Каспийского региона: Автореф. дис. ... докт. биол. наук, Москва, 1998. 44 с.

Ларцева Л.В., Обухова О.В., Лисицкая И.А. Микрофлора рыб и других гидробионтов. Учебное пособие. // Астраханский издательский дом «Астраханский гос. ун-т». 2008. 108 с.

Лисицкая И.А. Бактериальные сообщества некоторых компонентов экосистемы дельты Волги и Северного Каспия: Автореф. дис. ... канд. биол. наук, Астрахань, 2008. 23 с.

Обухова О.В. Бактериоценоз воды и судака (*Stizostedion lucioperca*) в дельте Волги: Автореф. дис. ...канд. биол. наук, Москва, 2004. 23с.

Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И., Брусина Е.Б. Внутрибольничные инфекции: новые горизонты профилактики // Эпидемиол. и инфекц. болезни. 2011. №1. С.4-8.

Холодок Г.Н., Алексеева И.Н., Стрельников Н.В., Козлов В.К. Колонизационные свойства условно-патогенных бактерий, изолированных при пневмониях детей // Микробиол., эпидемиол. и иммунол. 2014. №2. С. 17-25.

Яковлев А.А. Экологическое направление в эпидемиологии // Эпидемиол. и инфекц. болезни. 2011. №3. С. 58-62.

#### **PATHOGENICITY FACTORS OF BACTERIA OF PSEUDOMONAS, ISOLATED FROM WATER AND PERCH (*SANDER LUCIOPERCA*) AND THEIR PATHOGENIC POTENTIAL IN THE VOLGA DELTA**

Analysis of long-term microbiological material (1995 - 2010) showed frequent occurrence of conditionally - pathogenic bacteria of the genus *Pseudomonas* in water and fish of the delta of the Volga River. It was found that they had a set of pathogenicity factors: high temperature adaptation protease lecithinase, catalase, hemolysin. An increase of these traits in bacteria isolated from water and fish in the fall season, which coincides with the fishery, which determines their epidemiological significance.

### **ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ОЦЕНКЕ СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ РЫБ ПРИ ИСКУССТВЕННОМ ВЫРАЩИВАНИИ**

М.С. Мельникова

*Государственный научно-исследовательский институт озерного и речного рыбного хозяйства, 199053, Санкт-Петербург, наб. Макарова д.26, Россия, e-mail: [cova1991@bk.ru](mailto:cova1991@bk.ru)*

Естественные условия среды значительно отличаются от условий, в которых производится промышленное разведение рыбы по многим параметрам: в их числе не только качество воды, но и режим/характер питания, плотность посадки рыбы и ограниченность пространства, вследствие чего рыба не имеет

возможности избежать влияния повреждающего фактора. Искусственные условия содержания и выкармливания рыбы накладывают отпечаток на морфофункциональные особенности развития и функционирования внутренних органов. Изучение проблематики развития патологий, вследствие недостаточно качественных заводских условий или их нарушения, необходимо для современного рыбоводства.

Гистопатологический анализ – метод для обнаружения патологических изменений микроскопической структуры тканей органов в организме рыб на начальной стадии болезни, при хроническом ее течении или нарушениях обмена веществ, когда внешних проявлений еще не наблюдается и рыба выглядит вполне здоровой и активной. Раннее диагностирование нарушений способствует своевременному устранению вызывающих их неблагоприятных факторов и полному восстановлению организма без последствий.

С декабря 2014 по июнь 2015 года был отобран материал на различных рыбоводных предприятиях (табл.1) Объектом исследования стала молодь лососевых и сиговых рыб. Всего было исследовано 49 экземпляров молоди лососевых рыб.

Таблица 1. Объекты гистопатологического исследования рыбоводных хозяйств

Наименование рыбоводного хозяйства	Дата сбора	Вид рыбы	Количество, шт
Федеральное государственное учреждение "Чегемский форелевый завод"	25.11.2014	кумжа	4
Тепловодное хозяйство на Кольской АЭС	04.12.2014	каамлукс	3
ЗАО Кала-Ранта	18.12.2014	форель	6
ФГБУ Федеральный селекционно-генетический центр рыбоводства	07.03.2015	сиг/паляя/кумжа	3/3/1
	30.03.2015	паляя	5
Лужский производственно-экспериментальный лососевый завод	11.03.2015	лосось/кумжа	9/6
Свирский рыбоводный завод	20.04.2015	кумжа	5
Невский рыбоводный завод	12.05.2015	лосось	4

Для гистопатологического анализа у всех отловленных особей в смеси Буэна проводилась фиксация органов-индикаторов: печень, жабры, почки, селезенка. При дальнейшей обработке материала для изготовления препаратов тканей использовались методики классической гистологии (Волкова



О.В., Елецкий Ю.К., 1989), окраска гематоксилином-эозином. Полученные препараты изучали на микроскопе Lomo при увеличениях 40×, 100×, с помощью цифровой фотокамеры Levenhuk были получены микрофотографии данных препаратов.

**Печень.** Благодаря высокой функциональной специализации, печень играет значительную роль в поддержании гомеостаза организма. У костистых рыб печень является не только депо питательных веществ, но и выполняет основную детоксикационную функцию. Изменения в её структуре имеют высокое значение в оценке здоровья рыб: анализ доли липидных включений позволяет оценить энергетические резервы организма, своевременно выявить нарушения обмена веществ. По степени и характеру изменений структуры ткани и клеток печени можно судить о различных процессах, происходящих в организме рыбы, как адаптивно-компенсаторных, так и патологических – острого или хронического течения.

В результате исследования было установлено, что у половины изученных рыб присутствует липоидная дистрофия печени различной степени выраженности, вплоть до липоидной дегенерации тканей с последующим некробиозом. Некротические участки от мелких до обширных были выявлены у 60% рыб, часто локализуясь вокруг кровеносных сосудов. В местах некроза наблюдались активная пролиферация клеток лимфоцитарного ряда и образование каверн с клеточным детритом. В разрушенных участках отмечалось образование соединительной ткани у 22% рыб, были выявлены фиброэластозные явления вокруг кровеносных сосудов и желчных протоков. У 63% рыб наблюдалось нарушение балочной структуры, причиной которого может являться не только накопление клетками липидов, но и отечность ткани, выявленная у 23% рыб. Гепатоциты при отеке без четких границ, увеличенные в размерах, с пенистой структурой цитоплазмы, выглядели «размазанными» и набухшими, пространства Диссе не просматривались. Так же у 36% рыб были обнаружены отклонения циркуляторного характера – васкуляризация, гиперемия, расширение кровеносных синусов, диапедез эритроцитов через стенки сосудов в ткани печени.

**Почки.** Почки играют большую роль в поддержании гомеостаза, выполняя выделительную и осморегуляторную функцию. Кроме того, ретикулярная ткань почек принимает участие в гемопоэзе. В связи с этим, морфологические и функциональные нарушения в почках могут привести к дисфункции разных систем органов рыб и, как следствие, к снижению общей резистентности (Гамбарян, 1985).

В почках изученных рыб был обнаружен ряд различных типов патологий. Гемосидериоз – повышенное скопление гранул пигмента гемосидерина, указывающий на протекание воспалительных или инфекционных процессов в органе, был обнаружен у 60% исследованных рыб. Дегенеративные процессы в разной степени встречались достаточно часто: атрофия почечных телец – у 43%, деструкция эпителия почечных канальцев – у 39%, некротические явления в ретикулярной ткани – у 39% рыб. В связи с этим почечные канальцы нередко были заполнены тканевым детритом. У 61% рыб в просветах канальцев обнаруживались кристаллы оксалатов, у некоторых в значительном количестве, заполняя извитые канальцы. У отдельных групп рыб (39%) в почках отмечены ярко-выраженные отечные явления – отеки почечных телец, сопровождающиеся уменьшением мочевого пространства вплоть до полного его исчезновения в капсуле за счет отека мезангиального пространства, или наоборот – сильным увеличением, вследствие накопления экссудата в капсуле. Кроме того, были отмечены отеки канальцевого эпителия с волокнисто-нитчатой структурой: экссудат скапливался по краям клетки, сдавливая ядро в центре, или смещая к внутреннему краю. Обводнение тканей и образование оксалатов являются явными признаками нарушения ионного обмена в почках. У 14% рыб были обнаружены белковая или жировая дистрофия канальцевого эпителия и массовая его деструкция, вследствие острого нарушения обмена веществ. В почках с признаками деструктивных процессов зачастую можно было встретить полигломерулярные или дольчатые почечные тельца и расширенные просветы извитых канальцев, свидетельствующие об интенсивных компенсаторных процессах для увеличения производительности нефронов. А так же у 16%

рыб были обнаружены разрастания соединительной ткани в виде крупных кист или тяжей вокруг мочевыводящих каналов.

**Жабры.** В жаберном эпителии осуществляются не только процессы дыхания, но и процессы поддержания осмотического и кислотно-щелочного балансов, обмен ионов и удаление продуктов метаболизма. Вследствие постоянного контакта с окружающей водной средой, жабры являются главной мишенью находящихся в воде токсикантов. В связи с этим происходят нарушения ряда физиологических процессов, что приводит к патологическим изменениям в структуре дыхательной поверхности жабр.

При гистопатологическом изучении жабр было установлено, что именно жабры, в сравнении с другими органами-маркерами, имеют наибольшее разнообразие патологических отклонений. У 73% рыб были обнаружены процессы тканезамещения нормальной жаберной ткани на соединительную и мышечную, вследствие деструктивных процессов в жаберном эпителии – отеков, цитолиза, десквамации клеток эпителия. Зачастую этот процесс сопровождался бурной гиперплазией клеток ткани вокруг поврежденного участка. Разрастание жаберной ткани и срастание ламелл в конгломераты было выявлено у 63% изученных рыб, варьируя от совсем небольших участков до срастания всей поверхности филламента в единый слой ткани с редукцией ламелл. У одной из групп палии, находящейся в состоянии болезни, был отмечен процесс разрушения клеточных связей в жаберной ткани, приводящего к «рассыпанию» клеток вставочного эпителия и полному оголению хрящевых основания с последующей их деструкцией. Так же одними из самых распространенных патологий были: отеки – у 65%, гипертрофия клеток дыхательного эпителия - у 76%; и циркуляторные нарушения в виде гиперемии, аневризм и кровотечений – у 30% изученных рыб.

Ранее схожие данные о морфофункциональных изменениях в тканях рыб были представлены и в других работах по изучению рыб, выращиваемых в искусственных условиях, например при афлотоксикозе - поражении микотоксинами, образующихся в длительно хранящихся недоброкачественных кормах (Шарова, Лукин, 2007). При воздействии токсикантов различной природы,

при изменении минерализации или кислотности среды характер повреждения тканей внутренних органов в принципе сходен, различна лишь степень регистрируемых изменений, игнорирование которых может привести к возникновению хронических заболеваний или массовой гибели рыбы. Огромное влияние на морфофункциональную структуру печени оказывает не только внешняя среда, но и характер питания, качество корма, правильный его подбор и сбалансированность. Во многих исследованиях было показано (Валова, 2011; Алымов и др., 2012), что неправильный подбор корма и его низкое качество приводили к серьезным изменениям печеночной ткани и значительному нарушению ее функциональности.

В результате исследования было показано, что наибольшее разнообразие патологических изменений происходит в жабрах вследствие прямого контакта с водой. Однако стоит отметить, что большинство этих патологий имеют адаптивно-приспособительный характер и при изменении условий в лучшую сторону жабры быстро восстанавливаются. Печень и почки являются менее лабильными органами. Структурные изменения в их тканях имеют более сложный характер и оказывают огромное влияние на общий обмен веществ, размерно-весовые показатели рыб, их выживаемость и резистентность к инфекционным болезням и другим неблагоприятным факторам среды, важные как для индустриального рыбоводства, так и для дальнейшей жизни рыб при переходе в естественную среду обитания.

#### Список литературы

Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина, 1989. С. 142–256.

Гамбарян С.П. Микродиссекционное исследование почек осетровых рыб (Acipenseridae) бассейна Каспийского моря // Вопросы ихтиологии. 1985. Т. 25, Вып. 4. С. 647–651.

Валова В.Н. Физиологическое состояние молоди амурских осетровых рыб, выращиваемых в условиях лососевого рыбоводного завода // Известия ТИПРО: Аквакультура. 2011. том 167. С. 207-222.

Алымов Ю.В. Влияние различных комбикормов на морфологические показатели молоди русского осетра, выращенной садковым методом // Ю.В. Алымов., А.А. Кокоза, О.Н. Загребина, Б.В. Блинков / Фундаментальные исследования: Биологические науки. 2012. № 4. С. 167-171.

Шарова Ю.Н. Лукин А.А. Патологии рыб при афлатоксикозе // Расширенные материалы Международной научно-практической конференции, Борок: Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов-2. 2007. С. 82-85.

## **HISTOPATHOLOGICAL TECHNIQUES IN ASSESSING THE HEALTH OF FISH IN ARTIFICIAL CULTIVATION**

Melnikova M.S.

The using of histopathological techniques for assessing of fishes health that were grown in artificial conditions can help in detecting of invisible externally pathological deviations in their tissues. Early detection of tissue abnormalities and the elimination of negative factors can help avoid mass deaths of fish, keep it healthy and merchantability. Besides it can help increase of survival after release into the natural conditions.

## **ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЕ $\beta$ -КАРОТИНА В ОРГАНИЗМЕ *Lymnaea stagnalis* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ФЕНОЛА**

Л.В. Музыка, Г.Е. Киричук

*Житомирский государственный университет имени  
Ивана Франко ул. Б. Бердичевская, 40, Житомир, Украина, 10008  
Lidiya.Muzyka@ukr.net*

Хозяйственная деятельность человека привела к сильному загрязнению водной среды различными отходами производства. Они в своем составе содержат значительное количество органических компонентов, которые выступают ядами комбинированного действия. Одним из таких веществ является фенол, уникальные физико-химические свойства которого способствуют его широкой экспансии в водной среде и, как следствие, загрязнение ее не только данным токсикантом, но и большим количеством его производных, содержание которых часто превышает предельно допустимую концентрацию (ПДК). Попадание в водоемы и водотоки фенольных вод резко ухудшает их общее санитарное состояние, воздействуя на гидробионты не только как токсикант, но и значительно изменяя режим биогенных элементов и растворенных газов (кислорода, углекислого газа) в водоеме [10]. Известно [9], что одним из свойств  $\beta$ -каротина в организме моллюсков является его

способность активно участвовать в: окислительно-восстановительных процессах клетки, окислении ненасыщенных жирных кислот и, кроме того, выступать акцептором водорода, таким образом обезвреживая фенол и его производные. Именно поэтому целью работы стало изучение влияния разных концентраций фенола на содержание  $\beta$ -каротина в организме *Lymnaea stagnalis*.

Объектом исследования выступали 160 экз. *L. stagnalis* (Linné, 1758), собранных в октябре-ноябре 2013 года в бассейне р. Тетерев (с. Дрыглов, Житомирская обл.). Акклимация к лабораторным условиям – 14 суток [11]. Токсикант – фенол, концентрацией 0,0005 мг/дм<sup>3</sup>, 0,002 мг/дм<sup>3</sup>, 0,005 мг/дм<sup>3</sup>, 0,01 мг/дм<sup>3</sup>, соответствующие 0,5, 2, 5 и 10 ПДК рыбохоз. В токсикологическом опыте экспозиция составила 2, 7, 14 и 21 сутки. Все опыты сопровождалось контролем. Для исследования у животных изымали гепатопанкреас, мантию, ногу и гемолимфу, массу которых измеряли на электронных весах WPS1200/с с точностью до 0,01 г. Для определения суммарного содержания  $\beta$ -каротина образцы тканей гомогенизировали и проводили экстракцию гексаном (1:4). Содержание  $\beta$ -каротина определяли по методике [12]. Всего выполнено 1280 биохимических анализа. Статистическую обработку материала осуществляли по общепринятым методам [4].

Водные организмы обладают различными приспособительными механизмами к экспериментальным воздействиям, проявляющимися в приспособительной изменчивости биохимических процессов в их организме и возникновении метаболических адаптаций [3]. Одним из таких механизмов выступают каротиноидные пигменты, уровень которых в теле моллюска прямо пропорционален степени загрязнения среды [1]. Кроме того, содержание каротиноидов в тканях моллюсков является интегральным показателем физиологической активности их организма.

Нашими исследованиями установлено, что пребывание животных в растворах фенола, концентрация которого соответствует 0,5 ПДК (экспозиция 2 суток) прослеживается уменьшение содержания  $\beta$ -каротина во всем организме

исследованных моллюсков. Такая тенденция может быть связана со снижением адаптивных биохимических возможностей моллюска из-за воздействия токсиканта, которые по мере увеличения времени токсического воздействия и дозовой нагрузки (до определенного предела) активизируются и усиливаются, о чем свидетельствует рост уровня исследованных пигментов в тканях и органах.

При повышении концентрации токсиканта до 2 ПДК отмечено снижение исследуемого показателя в гемолимфе в 1,47 раза и его рост в мантии в 2,08 раза относительно контрольной группы животных. В гепатопанкреасе и ноге содержание  $\beta$ -каротина находится на уровне показателей контрольной группы животных. Возможно отсутствие различий в содержании исследуемого пигмента связана с высокой метаболической активностью этих органов. Так гепатопанкреас, аккумулирует в себе различные вещества, которые участвуют в процессах жизнедеятельности животных и обеспечивают их защиту, поэтому данная концентрация токсиканта еще не воспринимается им как действующая и не вызывает усиление метаболических процессов. Более высокая концентрация фенола (5 ПДК) приводит к снижению содержания  $\beta$ -каротина в 1,74 раза в гепатопанкреасе и в 1,68 раза в ноге. Одновременно с этим отмечается рост значения обсуждаемого показателя в гемолимфе животных (в 4,48 раза). Следует отметить, что вместе с этим уровень  $\beta$ -каротина в мантии не имеет статистически достоверной разницы с контрольной группой животных. Это может быть связано с временным характером адаптации к фенолу, что сменяется фазой истощения вследствие нарушения адаптационных механизмов животных [6]. При повышении концентрации токсиканта до 10 ГДК исследуемый показатель уменьшается в гемолимфе (в 1,72 раза) и возрастает в мантии и ноге (в 1,56 и 1,26 раза соответственно). Такое увеличение показателей в мантии и ноге согласуется с данными других авторов [2], полученными для *Unio pictorum*, которые указывали на прямопропорциональное увеличение содержания каротиноидов в обсуждаемых органах при росте концентрации фенола в среде равной ПДК и 10 ПДК.

Что касается гепатопанкреаса, то статистически достоверного различия между значениями контрольной и экспериментальной группы животных не отмечено.

Увеличение экспозиции от 2 до 7 суток сопровождается дальнейшим снижением содержания  $\beta$ -каротина за действия низкой концентрации токсиканта в гемолимфе (в 1,53 раза) и гепатопанкреасе (в 1,88 раза); однако в мантии отмечаем увеличение содержания  $\beta$ -каротина в 1,29 раза. В ноге не зафиксировано статистически достоверной разницы между экспериментальной и контрольной группами животных. Повышение концентрации токсиканта до 0,002 мг/дм<sup>3</sup> (2 ПДК) способствует росту содержания  $\beta$ -каротина во всем организме *L. stagnalis* (на 13,63%–106,04% по отношению к контролю). Концентрация токсиканта на уровне 5 ПДК приводит к уменьшению содержания  $\beta$ -каротина в гемолимфе (на 61,48%) и его увеличению в мантии и ноге в 1,24 и 1,29 раза соответственно. В гепатопанкреасе не прослеживается статистически достоверного различия содержания исследованного пигмента. Максимальная концентрация токсиканта (10 ПДК) вызывает увеличение исследуемого показателя во всем организме *L. stagnalis* на 12,66–54,84%. Возможно это обусловлено активизацией защитных механизмов организма и началом фазы отравления, которую принято называть фазой повышения активности или фазой стимуляции [8]. Исследованные ткани и органы в порядке увеличения значения показателя можно расположить следующим образом: гепатопанкреас → гемолимфа → мантия → нога. Такое высокое содержание каротиноидов именно в ноге функционально обусловлено и имеет адаптивную направленность, что может быть связано с тем, что выбранный объект исследования является подвижным и активно перемещается из затравленной среды, используя ногу.

При увеличении срока экспозиции до 14 суток отмечено повышение уровня каротиноидов во всех тканях и органах исследованных моллюсков почти за всех использованных концентраций токсиканта (исключение составило воздействие фенола, концентрацией 10 ПДК). При этой же экспозиции отмечено уменьшение содержания  $\beta$ -каротина в гемолимфе (в



1,18 раза) и увеличение его в мантии (в 1,34 раза) и ноге (в 1,64 раза). По мере увеличения концентрации токсиканта, отмечаем изменения в порядке расположения тканей и органов по количественному содержанию в них исследуемого пигмента. Метаболические ряды имеют следующий вид (в порядке возрастания значения показателя):

Контроль: гемолимфа → нога → гепатопанкреас → мантия  
0,5 ПДК токсиканта: гемолимфа → нога  
→ гепатопанкреас → мантия

2 ПДК токсиканта: гемолимфа → нога  
→ гепатопанкреас → мантия

5 ПДК токсиканта: гепатопанкреас → гемолимфа → нога  
→ мантия

10 ПДК: гемолимфа → гепатопанкреас → нога → мантия

Как видно из рядов, за действия практически всех использованных концентраций самими низкими показателями характеризуется гемолимфа моллюсков, хотя ее значение в большинстве случаев все же выше показателей, полученных для контрольной группы моллюсков.

Нами установлено, что увеличение срока экспозиции до 21 суток независимо от концентрации токсиканта (0,5-10 ПДК) приводит к росту содержания β-каротина в гемолимфе (на 15,94 – 47,10%) и гепатопанкреасе (на 18,32 – 51,24%) подопытных животных. Этот факт можно рассматривать как адаптивную реакцию и продолжение фазы стимуляции метаболических процессов. Возможно, повышение происходит за счет активации анаэробного гликолиза и накопления лактата, следствием чего является закисление внутриклеточной среды и активация кислых фосфатаз каротиноксисом, осуществляющих образование жирных кислот с их последующим окислением дыхательным цепью каротиноксисом с использованием депонированного в оксигенированных каротиноидах кислорода. Относительно мантии и ноги животных, то при экспозиции 21 сутки и действии токсиканта, концентрациями 0,5 ПДК, 5 и 10 ПДК не отмечено статистически достоверного отличия от контрольной группы моллюсков. Однако действие токсиканта на уровне 2 ПДК при этой же экспозиции приводит к небольшому повышению

содержания пигмента в исследованных органах (на 15,94% в мантии и 17,88% в ноге).

Таким образом, загрязнение водной среды фенолом приводит к адаптивным перестройкам метаболизма в организме *L. stagnalis* в виде изменения содержания  $\beta$ -каротина в его тканях и органах, которые являются отражением процессов неспецифической адаптации к токсическому действию. Результаты данного исследования могут способствовать раскрытию механизмов устойчивости гидробионтов к действию исследуемого токсиканта, а также быть использованы при разработке методов биоиндикации и прогнозирования изменений в водных экосистемах.

#### Список литературы

1. Бедова П.В. Удельная концентрация каротиноидов в тканях моллюсков как показатель качества водной среды / П.В. Бедова // 1 Вавилов. Чтения постоян. действ. междисциплин. науч. конф. «Диалог наук на рубеже 20-21 вв. и глоб. пробл. современности», Йошкар-Ола, 17-18 дек., 1996:Матер. Йошкар-Ола, 1996. С. 349–350.
2. Гордзялковский А.В. Влияние фенола на содержание каротиноидов в тканях моллюсков / А.В. Гордзялковский, О.Н. Макурина // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. 2007. №8 (58). С. 60 – 68.
3. Грубінко В.В. Системна оцінка метаболічних адаптацій у гідробіонтів / В.В. Грубінко // Наук. зап. Терноп. пед. ун-ту ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. 2001. № 15. С. 36–39.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. М.: Высш. шк., 1973. 343 с.
5. Лукашев Д.В. Индикаторное значение пресноводных моллюсков при выявлении источника загрязнения речной экосистемы тяжелыми металлами / Д.В. Лукашев // Проблемы екології та охорони природи техногенного регіону. – Донецьк: ДонНУ, 2009. № 1 (9). С. 109–114.
6. Лукьяненко В.И. Токсикология рыб / В.И. Лукьяненко. М.: Пищев. пром., 1967. 216с.
7. Метелев В.В. Водная токсикология / В.В. Метелев, А.И. Канаев, Н.Г. Дзасохова. М.: Колос, 1971.–247.с.
8. Проблемы водной токсикологии / Под. ред. Веселова Е.А. – Петрозаводск: ПГУ, 1984. 119 с.
9. Сиренко Л.А. Каротиноиды гидробионтов / Л.А. Сиренко, Т.В. Паршикова // Экология моря. 2005. №76. С. 63–67.
10. Справочник по гидрохимии / [Т.В. Гусева и др.]. М: Эколайн, 1998.
11. Хлебович В.В. Акклимация животных организмов / В.В. Хлебович. Л.:Наука, 1981. 135 с.
12. Taylor S.L. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis / S.L. Taylor, M.P. Lambden, A.L. Tappel // Lipids. 1976. Vol. 11, № 7. P. 530–538.

**PECULIARITIES  $\beta$ -CAROTENE CONTENT IN *LYMNAEA STAGNALIS* ORGANISM OF PHENOL FOR INFLUENCE IN DIFFERENT CONCENTRATIONS**

Muzyka L.V., Kyrychuk G.Ye.

The influence of phenol in different concentrations (0,5, 2, 5, 10 of maximum allowable concentrations) on  $\beta$ -carotene content in tissues (organs) of *Lymnaea stagnalis* is researched. The dependence of the researched pigment concentration on animals exposure duration (2, 7, 14 and 21 days) in toxic environment is established. The  $\beta$ -carotene distribution in tissues and organs of *L. stagnalis* organisms in norm and under phenol influence is shown.

**ИХТИОФОНОЗ У ЛОСОСЕВЫХ РЫБ НА ОДНОМ ИЗ САДКОВЫХ ХОЗЯЙСТВ ЛАДОЖСКОГО ОЗЕРА**

А.Н. Паршуков<sup>1</sup>, Е.А. Завьялова<sup>2</sup>, О.В. Хлунов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биологии Карельский научный центр РАН,  
Петрозаводск, Россия

<sup>2</sup>ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский  
институт экспериментальной ветеринарии  
им. Я.Р. Коваленко, Москва, Россия

<sup>3</sup>Петрозаводский государственный университет,  
Петрозаводск, Россия, e-mail: [aleksey.nik.parshukov@gmail.com](mailto:aleksey.nik.parshukov@gmail.com)

Развитие в Карелии такого направления аквакультуры как садковое рыбоводство по-прежнему не теряет своей актуальности и сохраняет особый статус ввиду того, что около 70% всей выращиваемой форели в России производится нашей республикой.

Интенсивное развитие отрасли требует изучения инфекционных заболеваний, поскольку своевременная постановка диагноза и правильно подобранное лечение смогут предупредить массовую гибель рыб и снизить большие финансовые потери предприятию. Но в ихтиопатологической практике существуют болезни, против которых до сих пор не разработан план мероприятий, направленный на полное выздоровление культивируемых рыб.

Одним из таких серьезных заболеваний, которое наносит существенный ущерб рыбоводству, является ихтиоспоридиоз

(ихтифоноз). Возбудитель *Ichthyosporidium* (= *Ichthyophonus*) *hoferi* размножается в тканях и органах рыб спорами, окруженными капсулами. В качестве внешнего симптома проявления болезни выделяют изменение в поведении рыб из-за поражения мозга или плавательного пузыря. Эффективных лечебных средств не найдено (Hoffman, 1967; Neish and Hughes, 1980; Zubchenko and Karaseva, 2002; Гаврюсева, 2007; Головина и др., 2007; Болезни рыб..., 2011; Hershberger, 2012). Некоторые авторы сообщают о положительных результатах, полученных Кочетовым А. М. (1988), который вводил аквариумным рыбам гризеофульвин и нистатин в дозе 1 мг/г корма (Грищенко, 1999).

Цель исследования – изучение причин необычного поведения радужной форели и сига в садковом хозяйстве Карелии и определение эффективности одного из лекарственных средств в борьбе с ихтифонозом.

Для паразитологических исследований с целью выяснения причин изменения в поведении рыб в лабораторию ихтиопатологии ФГБНУ ВИЭВ доставлялись пробы в осенние периоды 2011-2013 гг. Отбор проводился согласно существующей нормативно-технической документации.

По результатам лабораторных исследований форели в ноябре 2011 года методом прямой микроскопии кляч-препаратов внутренних органов, головного мозга и соскобов со стенки плавательного пузыря выявлено массовое заражение всех органов и тканей грибом *Ichthyosporidium hoferi*. Следовательно, изменение поведения рыб: положение на боку, движение по кругу, связано с поражением головного мозга.

На следующий год в сентябре при паразитологическом и гистологическом исследовании внутренних органов (печень, селезенка, сердце), головного мозга и стенки плавательного пузыря у молоди сига также установлено массовое заражение грибом *Ichthyosporidium hoferi*. Вследствие поражения грибом печени нарушена желчевыводящая функция, что привело к диффузии желчи в подлежащие ткани и обширному некрозу гепатоцитов. Во внутренних органах выявлены тельца различной формы и размера, с зернистой структурой,

вследствие чего происходит дегенерация клеток органов и пролиферация клетками лимфопоэза.

Повторный анализ на сигах в 2013 году снова регистрировал массовое поражение ихтиофонусом. Во внутренних органах также были выявлены тельца различной формы и размера.

Из литературных данных стало известно, что на сегодняшний день отсутствует эффективное лекарственное средство против ихтиофоноза. Экспериментальное лечение на рыбном хозяйстве проводилось нами в апреле 2012 года (при температуре воды 0,3С°) с применением лекарственного средства нистатин – антибиотика полиеновой группы, обладающего противогрибковым действием. Курс длился 14 дней в дозировке 500000 ЕД на 1 кг ихтиомассы, участвовало 6 садков с общим содержанием рыбы 826000 экземпляров. Лекарство вводили путем замешивания в корм, предварительно растворив порошок в масле с витаминами «Тривит АД<sub>3</sub>Е».

После выполненных лечебных мероприятий в среднем снизился процент отхода рыб. Однако, несмотря на то, что поведение форели вернулось к своему нормальному состоянию, в дальнейшем заболевание распространилось в пределах акватории на другие группы рыб. Развитие системного ихтиоспориоза может не вызывать массовой гибели, однако способствует ослаблению иммунитета.

#### Список литературы

1. Болезни рыб в аквакультуре России. Практическое руководство / В.Н. Воронин, Е.В. Кузнецова, Ю.А. Стрелков, Н.Б. Чернышева. 2011. 263 С.
2. Гаврюсева Т.В. Первый случай ихтиофоноза у молоди кижуча *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) в условиях аквакультуры на Камчатке // Биология моря. 2007. Т. 33, №1. С. 49-53.
3. Головина Н.А., Стрелков Ю.А., Воронин В.Н., Головин П.П., Евдокимова Е.Б., Юхименко Л.Н. Ихтиопатология. Под ред. Н. А. Головиной, О. Н. Бауера. М.: Мир, 2007. 448 с.
4. Грищенко Л.И. Болезни рыб и основы рыбоводства. М.: Колос, 1999. 456 с.
5. Hoffman, G.L. (1967) Parasites of North American Freshwater Fishes. University of California Press, Berkeley, 468 p.
6. Zubchenko, A.V., and T.A. Karaseva (2002) *Ichthyophonus hoferi* as One of Possible Causes of Increased Marine Mortality in Post-Smolts of Atlantic Salmon \ NPAFC Technical Report No. 4. P. 90-92.

## **ICHTHYOPHONIASIS ON SALMON FISH IN ONE OF CAGE FARMS IN LAKE LADOGA**

Parshukov A.N., Zavyalova E.A., Hlunov O.V.

Cage fish farming is still one of the priority areas of freshwater aquaculture of Karelia. The specific feature of the manufacturing process is the high probability of rapid development of epizootics due to high stock densities of hydrobionts, which causes more careful and responsible diagnosis and prevention of diseases.

The data of identifying disease of salmon fish (ichthyophoniasis) and the experience of treating it with medication on one of the fish farms in Karelia are mentioned.

## **ВЛИЯНИЕ СУБЛЕТАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ МЕДИ И ЦИНКА НА НЕКОТОРЫЕ ИММУНОБИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЫБ**

Н.И.Силкина

*Институт биологии внутренних вод РАН, Борок Ярославской  
обл., Россия, e-mail: [sni@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:sni@ibiw.yaroslavl.ru)*

Медь и цинк, входящие в группу тяжелых металлов (ТМ), являются эссенциальными, т.е. жизненно необходимыми для животных незаменимыми микроэлементами (Мудрый и др., 2002; Ребров, Громова, 2008). Обычные фоновые уровни меди и цинка не превышают 0.001-0.02 мг/л. ПДК для рыбохозяйственных водоемов для меди – 1 мкг/л, для цинка – 0.05 мг/л. В результате интенсивного антропогенного загрязнения в последние десятилетия содержание многих тяжелых металлов, том числе меди и цинка, в воде и гидробионтах неуклонно повышается, иногда во много раз превышая ПДК (Будников, 1998; Ребров, Громова, 2008; Moseley et al., 2004.). При избыточном поступлении высоких концентраций ТМ в организм они проявляют токсическое действие, влияя на физиолого-биохимическое и иммунологическое состояние рыб (Микряков, 1991; Микряков и др., 2001; Силкина и др., 2012). Сведения об иммунобиохимическом статусе рыб при хроническом влиянии меди и цинка при низких концентрациях изучены слабо.

Одним из токсичных, широко распространенным и опасным для гидробионтов веществом является медь (Romeo et al., 2000; Kamunde et al., 2002; Martinez-Alvarez et al., 2005). Основное загрязнение медью – антропогенного происхождения. Негативное

влияние высоких концентраций меди на организм рыб выражается нарушениями метаболических процессов, изменением проницаемости клеточных мембран, ингибированием окислительного фосфорилирования и синтеза нуклеиновых кислот и белков и др. (Будников, 1998; Мудрый, 2002). Медь, являясь в то же время незаменимым микроэлементом в биохимических процессах организма животных, принимает активное участие в обмене веществ, окислительно-восстановительных процессах, синтезе гемоглобина, повышении адаптивной устойчивости и сопротивляемости организма к вредным воздействиям факторов внешней среды (Ребров, Громова, 2008).

Цинк в организм рыб попадает также с водой и пищей. Цинк участвует в биоэнергетических процессах и во всех видах обмена: ферментативных реакциях, синтезе и расщеплении углеводов, жиров и белков, кроветворении и образовании белков, простогландинов и нуклеиновых кислот, входит в состав ферментов и генетического аппарата клетки, регулирует перенос генетической информации в ходе репликации ДНК, оказывает влияние на рост рыб, развитие и размножение, поддерживает деятельность антител, лейкоцитов и гормонов (Будников, 1998; Мудрый, 2002; Bury et al., 2003). Во время острого или хронического стресса происходит усиленное потребление цинка. При дефиците цинка организм более активно усваивает свинец, кадмий и другие токсичные элементы. Дефицит цинка даже в средней степени может затрагивать иммунную систему: Т-лимфоциты, белые клетки крови не могут нормально функционировать при низких запасах цинка в организме. Кроме того, цинк участвует в свободно-радикальном окислении липидов, стабилизируя оболочки мембран, защищая их от повреждений, возникающих вследствие перекисления. Избыток цинка обладает токсичными свойствами. При хронической интоксикации наблюдается вторичный дефицит меди, вызванный конкурентными взаимодействиями между этими элементами при абсорбции в кишечнике. Токсичность цинка обусловлена нарушением функции железо- и медьсодержащих ферментов,

синтеза ДНК, белков, металлотионеинов, лактатдегидрогеназы и других энзимов.

Многие функции цинка и меди в организме взаимосвязаны, Совместно медь и цинк участвуют, например, в работе антиокислительного фермента супероксиддисмутазы. Соотношение уровней цинка и меди влияет на содержание в крови липопротеинов (Леус и др., 1998).

Цель работы – изучение раздельного и совместного воздействия ионов меди и цинка в низких концентрациях на состояние врожденного иммунитета и прооксидантно-оксидантный статус, а также выявление способности организма рыб к восстановлению после помещения их в чистую воду.

Работа выполнена на 100 сеголетках золотого карася *Carassius carassius* средней массой 60-67 г и длиной 17-18 см. В период эксперимента в воде поддерживали постоянный оптимальный температурный и кислородный режим и рН. Кормление рыб осуществляли ежедневно сухим гранулированным кормом согласно инструкции по проведению токсикологических опытов. Эксперименты проводили в плексиглассовых аквариумах объемом 150 л. Средняя температура воды составляла 17-19<sup>0</sup>С, содержание кислорода 4-5 мг/л, рН 7.2-7.4. Опытных рыб содержали в растворах сульфата меди и сульфата цинка – (CuSO<sub>4</sub>) и (ZnSO<sub>4</sub>) и в их смеси (1:1), а контрольных – в аналогичных условиях в чистой воде. Воду меняли ежедневно в вечернее время, чтобы избежать стресса, каждый раз добавляя свежий маточный раствор токсиканта. Соли готовили непосредственно перед добавлением в аквариум на дистиллированной воде. Конечные концентрации по действующему веществу - иону Cu<sup>2+</sup> и иону Zn<sup>2</sup> составляли соответственно 0,025 и 0,005 мг/л, что соответствовало 1/50 от установленной 96-час LC<sub>50</sub>. Пробы отбирали от 10-12 особей в двух повторностях. Рыб в растворах ТМ содержали в течение 30 дней, а затем переводили в чистую воду на 45 сут («отмывка»). Отбор проб осуществляли до эксперимента на 1 сут, затем на 7, 14, 30 и 75 сут от начала опыта.

Анализ иммунологических и биохимических показателей осуществляли в сыворотке крови по данным бактериостатической активности сыворотки крови (БАСК), доле иммунодефицитных



особей (ИМД), содержанию неспецифических иммунных комплексов (ИК), в тканях печени – по интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровню антиокислительной защиты (АЗ).

Уровень БАСК определяли нефелометрическим методом в модификации В.Р. Микрякова (1991). В качестве тест-микробов использовали суточную культуру *Aeromonas hydrophila*. В зависимости от уровня БАСК отбирали иммунодефицитных рыб (ИМД), сыворотка крови которых не угнетала развитие тест-микробов. Неспецифические иммунные комплексы (ИК) изучали методом селективной преципитации полиэтиленгликолем спектрофотометрически при длине волны 280 нм по методу Н.Ф. Силкина и соавторов (1989). Об уровне ПОЛ судили по накоплению малонового диальдегида (МДА) – одного из конечных продуктов перекисного окисления (Андреева и др., 1988). Интенсивность процессов АЗ устанавливали интегральным методом В.Л. Семенова и А.М. Ярош (1985) по кинетике окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха в присутствии и отсутствии тканевых экстрактов (КОС). Результаты исследований обработаны методами вариационной статистики.

Анализ результатов свидетельствует, что за период эксперимента поведение рыб не изменилось, реакция на корм оставалась хорошей, при вскрытии отмечалось стандартное наполнение кишечника, патологических изменений внутренних органов не отмечено. Однако, при 100%-ной выживаемости рыб во всех вариантах опыта, наблюдались отклонения изучаемых показателей от контроля (табл.).

По величине БАСК, являющейся интегрированным выражением противомикробных свойств гуморального звена неспецифического иммунитета: лизоцима, комплемента, пропердина, протеаз, С-реактивного белка, агглютининов, преципитинов и т.д. (Микряков, 1991), зафиксированы отличия относительно контроля, характер изменения которых зависел как от вида металла, так и от времени экспозиции.

При экспозиции в воде с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  показатель БАСК на 7 сут увеличился, но на 14 и 30 сут понизился в 3 раза ниже нормы,

отмывка в течение 45 сут привела к увеличению БАСК, однако все-таки осталась ниже контроля. Начиная с 14 сут в группе появились ИМД особи, при «отмывке» доля ИМД составляла 30%, тогда как в контроле таковые отсутствовали. Во все сроки наблюдения уровень ИК в присутствии меди превышал контрольные значения. Характер изменения показателей гуморального иммунитета в присутствии ионов  $Zn^{2+}$  имел существенные отличия от такового воздействия ионов  $Cu^{2+}$ . Показатель БАСК на 7 сут не отличался от контроля, на 14 сут – понизился в 4 раза ниже контроля, а на 30 сут и после «отмывки» показатель оставался в пределах нормы. ИМД особи на 7 и 14 сут отсутствовали, на 30 сут составили 20%, к 75 сут – 10%. Во все сроки экспозиции наблюдалась активации образования ИК, однако после «отмывки» достигла уровня контроля. Совместное воздействие меди и цинка привело к более интенсивному отклонению показателей иммунитета: снижению БАСК в присутствии смеси во все сроки наблюдения, наличию ИМД особей и повышению уровня ИК.

Известно, что ИК – комплексы, состоящие из антиген-антитело и связанных с ними компонентов системы комплемента, играют важную роль в процессах регуляции иммунных реакций, элиминации ксенобиотиков из организма и поддержании иммунофизиологического гомеостаза. При насыщении организма чужеродными телами, в том числе аутоантигенами и инфекционными агентами, происходит избыточное образование ИК вследствие снижения клиринговой функции клеток фагоцитарной системы (Вольский, 1991; Логинов и др., 1990). Повышенный уровень ИК является фактором, вызывающим супрессию механизмов иммунного гомеостаза и неконтролируемых патологических процессов (Микряков и др., 2001). По-видимому, повышенные показатели ИК у опытных рыб – одна из причин снижения БАСК и появления ИМД особей. Низкий уровень БАСК, высокая доля ИМД особей и подъем уровня иммунных комплексов, выявленные у опытных рыб по сравнению с контрольными, свидетельствуют об иммуносупрессивном действии токсикантов на механизмы врожденного гуморального иммунитета.

Важным доказательством негативного влияния изученных токсикантов на физиолого-биохимическое статус рыб является состояние печени – одного из важнейших полифункциональных органов. Печени принадлежит ключевая роль в состоянии иммунного гомеостаза, в метаболизме и последовательном выведении ксенобиотиков и др.

Таблица. Иммунобиохимические показатели карася.

Время отбора проб, сут	Показатели	Условия экспозиции			
		Контроль	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Смесь Cu <sup>2+</sup> и Zn <sup>2+</sup>
1	БАСК, ИМД ИК МДА КОС	13.7±1.4 0 9.69±1.1 6.39±1.4 4.01±1.3			
7	БАСК, % ИМД, % ИК, у.е. МДА КОС	12.5±1.6 0 10.33±1.2 6.55±1.2 4.03±1.1	21.4±3.1* 0 33.27±2.9* 13.28 ±2.1* 5.94±1.1*	13.3±1.9 0 13.08±2.7* 6.64±1.4 8.07±1.4*	9.4±1.3* 10 44.12±2.5* 18.37±2.3* 12.28±2.1*
14	БАСК, % ИМД, % ИК, у.е. МДА КОС	14.3±2.0 0 10.57±1.7 6.62±1.4 4.01±1.5	3.5±3.0* 20 27.18±2.3* 18.74±1.6* 13.21±2.0*	3.2±2.2* 20 15.21±1.9* 8.69±1.8* 4.57±1.9	8.7±2.1* 30 41.83±4.8* 23.27±1.6* 14.87±2.1*
30	БАСК, % ИМД, % ИК, у.е. МДА КОС	12.1±1.5 0 11.34±1.7 7.04±1.5 4.13±1.5	4.5±1.1* 30 39.21±7.5 17.9±1.6* 16.71±1.9*	10.9±1.6 20 20.27±2.3* 14.24±2.0* 8.06±2.1*	5.3±1.3* 50 47.36±2.4* 23.12±2.1* 17.33±1.9*
75	БАСК, % ИМД, % ИК, у.е. МДА КОС	10.5±1.7 0 11.93±2.0 7.41±1.9 4.22±1.9	8.5±1.3* 30 15.07±2.2* 10.22±2.0* 6.35±2.5*	10.4±1.9 10 13.09±2.1 8.02±1.3 4.96±1.7	6.2±1.7* 30 25.89±2.9* 14.34±1.8* 10.25±2.5*

*Примечание:* БАСК-бактерицидная активность сыворотки крови; %; ИМД- % иммунодефицитных особей от общего числа рыб; ИК –уровень иммунных комплексов, у.е.; МДА – содержание малонового диальдегида, Нмоль/г; КОС – константа окисления субстрата, л x мл<sup>-1</sup> x мин<sup>-1</sup>. \* – достоверно относительно контроля при P≤0.01.

Анализ параметров прооксидантно-оксидантного статуса печени опытных рыб выявил влияние изучаемых ТМ на ее биохимическое состояние. Об активации процессов липидопереокисления в печени свидетельствует повышенное количество продуктов ПОЛ. Содержание МДА возросло в присутствии меди и в смеси ионов уже на 7 сут, а в опыте с

цинком – на 14 сут, затем уровень МДА оставался повышенным до 30 сут во всех вариантах опыта. После «отмывки» на 75 сут концентрация МДА соответствовала норме после экспозиции в цинке, а в растворах меди и смеси ионов – оставалась выше нормы. Показатель КОС во всех вариантах опыта превышал контроль, но после «отмывки» снижался, причем, показатель КОС возвратился к норме только после содержания в растворе цинка.

Активация процессов ПОЛ является одним из ключевых звеньев неспецифических механизмов реализации токсических эффектов, а состояние интенсификации цепных реакций ПОЛ, индуцируемых свободнорадикальными формами кислорода, при определенных воздействиях можно рассматривать как раннее проявление негативного токсического влияния на организм. Токсические продукты липопероксидации, кроме того, могут стать причиной вторичного повреждения, прежде всего, мембранных образований клетки, подавления функции окислительных и других ферментов, регенеративных процессов в организме и др. Причиной интенсификации ПОЛ может быть как усиление активности ферментов и других антиоксидантных структур, ответственных за образование перекисей, так и снижение активности ферментов защиты, предупреждающих образование перекисей или разрушающих их. Ускорение процессов ПОЛ, приводящих к дестабилизации и разрушению клеточных мембран, может быть одной из основных причин нарушения функциональной активности и деструктивных явлений в печени при отравлении организма ионами ТМ. Важнейшим механизмом окислительного гомеостаза является про- и антиоксидантное равновесие, имеющее подвижный характер. Усиленный липидоперекислительный процесс нарушает оптимальный окислительно-восстановительный гомеостаз в организме опытных рыб и сдвигает баланс системы ПОЛ ↔ АЗ в сторону интенсификации процессов ПОЛ. Особенно сильно сдвиг равновесия в сторону прооксидантных форм наблюдается при развитии острых и хронических отравлений под воздействием ряда экстремальных факторов, в частности, в загрязненных акваториях (Зенков и др., 1999; Силкина и др., 2012).

На основании повышенного уровня перекисеокислительных процессов и сниженной функции антиоксидантной защитной системы и можно сделать вывод, что у рыб снижен адаптационный потенциал и в тканях развиваются деструкционные процессы (Зенков и др., 1999.). Повышенный показатель КОС свидетельствует о дефиците антиоксидантов. В организме антиоксиданты обеспечивают надежную защиту от свободных радикалов. Повреждение клеток тканей может приводить к дистрофии. Результаты опыта показывают, что хроническое воздействие изучаемых ионов ТМ в сублетальных концентрациях приводит к нарушению регуляции перекисления липидов и окислительному стрессу, что и подтверждается сдвигом баланса системы ПОЛ ↔ АЗ.

Таким образом, ионы меди повлияли на отклонения исследуемых показателей в большей степени, чем ионы цинка. Наиболее выраженная реакция организма рыб на загрязнение ТМ зафиксирована при содержании рыб в смеси ионов меди и цинка. В большей степени исследуемые показатели отличались от контроля на последних сроках экспозиции в токсикантах. Помещение рыб в чистую воду для «отмывки» привело лишь к частичному восстановлению иммунобиохимического статуса рыб. Установленные модификации в функционировании иммунобиохимических механизмов гомеостаза опытных рыб следует рассматривать как типичную реакцию рыб на загрязняющие вещества. Выявленные отличия в уровнях исследуемых показателей могут служить экологическими маркерами, отражающими степень воздействия ионов ТМ на среду обитания и рыбное население, и использованы в качестве биотеста при мониторинге состояния здоровья рыб и оценке качества воды.

#### Список литературы

Андрева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело, 1988. № 11. С. 41-43.

Будников К.Г. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем // Сорос. образ. журн. Биология. 1998. Т.7. № 5. С. 23-29.

Вольский Н.Н. Иммунная система как орган адаптогенеза. Методологические аспекты современной иммунологии. Новосибирск: Наука. 1991. С. 39-46.

Леус Ю.В., Арсан В.О., Грубинко В.В. Прооксидантно-антиоксидантный статус организма карпа при действии ионов меди, марганца, свинца и цинка // ДОП. Нац. АН Украины. 1998. № 7. С.155-159.

Логинов С.И., Смирнов П.Н., Трунов А.Н. Иммуные комплексы у животных и человека: норма и патология. Сиб. Отд-ние. ИЭВС и ДВ РАСХН. Новосибирск 1990. 200 с.

Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Вольский Н.Н., Козлов В.А. Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз // Усп. соврем. биол. 1999. Т. 119. № 5. С. 440 - 450.

Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. 154 с.

Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. и др. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука. 2001. 126 с.

Мудрый И.В., Короленко Т.К., Никула Р.Г. и др. Тяжелые металлы в окружающей среде и их влияние на организм (обзор литературы) // Лікарська справа, 2002. № 5-6. С.6-10.

Ребров В.Г., Громова О.А. Витамины, макро- и микроэлементы. М: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 960 с.

Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Укр. биохим. журн. 1985. Т. 57. № 3. С. 50-52.

Силкин Н.Ф., Стефани Д.В., Виноградова Т.В. Методика определения концентрации циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови рыб // Экологическая физиология и биохимия рыб. Тез. докл. VII Всерос. конф. Т. II, Ярославль, 1989 . С.141-143.

Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние антропогенного загрязнения на окислительные процессы в печени рыб Рыбинского водохранилища // Экология. 2012. № 5. С. 361-365.

Bury N.R., Walker P.A., Glover C.N. Nutritive metal uptake in teleost fish // J. of Experimental Biology, 2003 V. 206. P. 11-23.

Kamunde C., Grosell M., Higgs D., Wood C.M. Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interactions between dietary and waterborne copper uptake // J. Experim. Biol. 2002. V. 205. P. 279-290.

Martinez-Alvarez R.V., Morales A.E., Sanz A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors // Rev. Fish Biol. and Fish. 2005. V.15. № 1-2. P. 75-88.

Moseley R., Hilton J.R. et al. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments // Wound Repair Regen. 2004. V. 12. № 4. P. 419-429.

Romeo M., Bennani N. et al. Cadmium and copper display different responses to oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax* // Aqual. Toxicol. 2000. V.48. № 2-3. P. 185-194.

## INFLUENCE OF SUBLETHAL CONCENTRATION OF IONS OF COPPER AND ZINC ON SOME IMMUNOBIOCHEMICAL INDICATORS OF FISHES

Silkina N.I.

Separate and joint influence of ions of copper and zinc in low concentration on a condition of congenital immunity and prooxidant - oxidant status *Carassius carassius* is studied. Copper ions have affected deviations of investigated indicators in bigger degrees, than zinc ions. The most expressed reaction of an organism of fishes is fixed at the maintenance in a mix of ions of copper and zinc. In better degrees investigated indicators differed from the control on exposition closing dates in toxicants. The premise of fishes in pure water for has led to only partial restoration immunobiochemical the status of fishes.

## ВИДОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПРОТЕИНАЗ РЫБ К ФЕНОЛУ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫМ

А.Ф. Тарлева<sup>1</sup>, Е.Л. Грачева<sup>2</sup>, Е.А. Куливацкая<sup>1</sup>, В.В. Кузьмина<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина  
РАН, 152742. п. Борок Ярославской обл., e-mail:

[vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru)

<sup>2</sup>ФГБОУ Ярославский государственный университет  
им. П. Г. Демидова, 150000. Ярославль

В настоящее время органические загрязнители признаны особо опасными экотоксикантами. К их числу относятся фенол и его соединения в высоких концентрациях. Фенолы, являясь продуктами метаболизма растительных и животных организмов, как правило, не представляют опасности для экосистем. Более того, считается, что они становятся необходимыми компонентами биологических систем (Запрометов, 1974). Однако при увеличении концентрации фенол и, особенно, его производные становятся опасными. Фенольные сточные воды — наиболее распространенные органические загрязнители, образующиеся при термической переработке твердого топлива, производстве пластмасс, синтетических тканей, красителей, бумаги и др. (Michałowicz, 2007) Фенолы широко используются для синтеза различных ароматических соединений, дезинфекции, пропитки древесины, в качестве пестицидов и многих других целей. Распад фенольных соединений сопровождается резким поглощением из воды кислорода, что может приводить к заморам рыб

(Лукьяненко, 1967). Так, в опытах на карасях, проводившихся в разные сезоны года при стандартных условиях (температура 15°C, кислород – 7-5 мг/л, рН 7.1-7.4), была установлена более высокая устойчивость карасей к фенолу зимой, чем летом. Такая зависимость объяснялась различной степенью протекания метаболических процессов у рыб в зимнее и летнее время: зимой рыбы впадают в спячку и скорость обменных процессов у них замедляется, поэтому влияние токсических веществ на организм в этот период ослабевает. Следует также учитывать, что низкие температуры воды зимой могут маскировать токсичность фенола (Лукьяненко, 1967). Эти данные имеют большое значение для решения практических вопросов, касающихся режима сброса токсичных сточных вод. Такие сточные воды при необходимости можно сбрасывать в естественные водоемы только зимой (Лукьяненко, 1983).

В многочисленных работах показано, что фенол вызывает резкие нарушения функций различных систем организма рыб, особенно центральной нервной системы (Лукьяненко, 1983; Флеров, 1989; Michałowicz, Duda, 2007). Сведения о влиянии фенола и его производных на активность пищеварительных ферментов у рыб единичны. Известно лишь об ингибирующем влиянии фенола и его производных (1 ммоль/л) на активность гемоглоблинитических протеиназ слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб разных видов (Кузьмина и др., 2014). Вместе с тем исследование влияния фенолов на активность пищеварительных протеиназ у рыб исключительно актуально. Это связано с тем, что протеолитические ферменты обеспечивают распад белков, пополняющих аминокислотный запас клеток, участвующих в их росте, делении и гибели, как основной части процесса обмена веществ в организме животных (Куцый, 1999; Нейфах, 1977). При этом от состояния протеолитических ферментов пищеварительной системы в значительной мере зависит эффективность переработки и усвоения пищи, что не может не влиять на иммунный статус рыб.

Цель работы – изучение влияния различных концентраций фенола и его производных (4-хлорфенола, 4-нитрофенола и 2,4-динитрофенола) на активность пищеварительных протеиназ



слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб разных таксономических и экологических групп.

Объекты исследования: лещ *Abramis brama* (L.) массой 300–325 г, щука *Esox lucius* L. массой 400–535 г, речной окунь *Perca fluviatilis* L. массой 50–70 г из Волжского плеса Рыбинского водохранилища. Рыб в течение 1-2 ч после поимки доставляли в лабораторию. Сразу проводили биоанализ, изымали пищеварительный тракт и замораживали. Для получения ферментативно активных препаратов кишечник рыб помещали на ледяную баню, очищали от жира, разрезали вдоль, изымали содержимое и специальным скребком снимали слизистую оболочку медиального отдела кишечника. Как слизистую оболочку, так и содержимое кишечника (химус) тщательно перемешивали. Затем отбирали требуемое количество материала для приготовления исходного гомогената. Пробы гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с небольшим количеством раствора Рингера для холоднокровных животных (103 мМ NaCl, 1.9 мМ KCl, 0.45 мМ CaCl<sub>2</sub>) при температуре 1-2°C. Для этого стеклянный гомогенизатор помещали в стакан со льдом. Затем полученный гомогенат дополнительно разводили раствором Рингера до конечного разведения – 1:99. Протеолитическую активность оценивали по увеличению концентрации тирозина методом Ансона (Anson, 1938) в некоторой модификации. В качестве субстратов использовали 1% раствор казеина (рН 7.4).

Для оценки влияния фенола и его производных на активность протеиназ пищеварительного тракта рыб 0.25 мл гомогената и 0.25 мл одного из токсикантов (фенол, 4-хлорфенол, 4-нитрофенол или 2,4-динитрофенол) в концентрации от 0.125 до 1 ммоль/л (после разведения гомогенатом – 0.06 до 0.5 ммоль/л) инкубировали в течение 1 ч. После этого в пробирки добавляли 0.5 мл субстрата и смесь инкубировали еще 30 мин. Все операции проводили при температуре 20°C и непрерывном перемешивании. Активность протеиназ (преимущественно активность трипсина, КФ 3.4.21.4) оценивали по увеличению концентрации тирозина методом Ансона [1] в некоторой модификации. В качестве субстратов использовали 1% растворы казеина (рН 7.4).

Активность ферментов определяли в 4–5-ти повторностях с учетом фона (количество тирозина в исходном гомогенате). Об уровне ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата с учетом фона (количество тирозина в исходном гомогенате) в расчете на 1 г сырой массы ткани, мкмоль/(г·мин). Интенсивность окрашивания определяли на фотоколориметре (КФК-2) при красном светофильтре,  $\lambda=670$  нм. Результаты обработаны статистически при помощи стандартного пакета программ (Microsoft Office 95, приложение Excel). Степень различия между средними арифметическими ( $M \pm m$ ) оценивали с помощью критерия Стьюдента при  $p \leq 0.05$ –  $p < 0.001$ .

Полученные данные свидетельствуют о достоверном в большинстве случаев изменении активности протеиназ по сравнению с контролем (0) при влиянии фенола и его производных (4-хлорфенола, 4-нитрофенола и 2,4-динитрофенола) у рыб разных видов в условиях *in vitro* (рис. 1-3). Как показывает рис.1, эффекты 4-нитрофенола и особенно 2,4-динитрофенола на активность протеиназ слизистой оболочки бентофага леща выражены сильнее по сравнению с таковыми фенола и 4-хлорфенола. При исследовании химуса леща обнаружено более значительное ингибирующее влияние 4-нитрофенола по сравнению с 2,4-динитрофенолом. Интересен тот факт, что у этого вида рыб 2,4-динитрофенол не влияет на уровень ферментативной активности ни слизистой, ни химуса.

У ихтиофага щуки наблюдается выраженное ступенчатое снижение активности протеиназ слизистой оболочки по мере возрастания концентрации 4-хлорфенола. Менее выраженный эффект выявляется под действием фенола и 4-нитрофенола. Под влиянием 2,4-динитрофенола в концентрации 0.125 млмоль/л возрастает. Влияние фенола и 4-хлорфенола на активность протеиназ химуса выражено значительно слабее по сравнению с таковым слизистой оболочки. 4-нитрофенол и 2,4-динитрофенол оказывают менее выраженный эффект по сравнению с таковыми фенола и 4-хлорфенола. Существенное, с высокой степенью достоверности ( $p \leq 0.001$ ) уменьшение активности протеиназ

слизистой оболочки наблюдалось лишь для 2,4-динитрофенола в концентрации 0.5 ммоль/л.

У ихтиофага-факультативного бентофага окуня активность протеиназ под влиянием фенола и его производных достоверно изменялась лишь в ряде случаев. Особо следует отметить, что помимо ингибирования наблюдалась стимуляция протеиназ. Поскольку в гастроэнтерологии модификаторные эффекты, не превышающие 15%, не принято рассматривать, как значимые, заслуживает внимания лишь снижение уровня ферментативной активности химуса у окуня под влиянием 4-хлорфенола в концентрации 0.5 ммоль/л.

Полученные данные свидетельствуют о значительных различиях в чувствительности протеиназ рыб разных видов к фенолу и его производным, а также ферментов рыб одного вида к разным фенолам. Ранее высказывалось предположение о том, что различная степень влияния фенола и его производных на гемоглобинлитические (химотрипсиноподобные) протеиназы у рыб одного и того же вида обусловлена их взаимодействием с разными регуляторными сайтами ферментов, у разных видов – различиями в аминокислотном составе и структуре белковых глобул ферментов. При этом указанные вещества, влияя на регуляторные центры протеиназ, способны изменять конформацию их активных центров, в результате чего снижается эффективность взаимодействия ферментов и субстратов (Кузьмина, 2014).

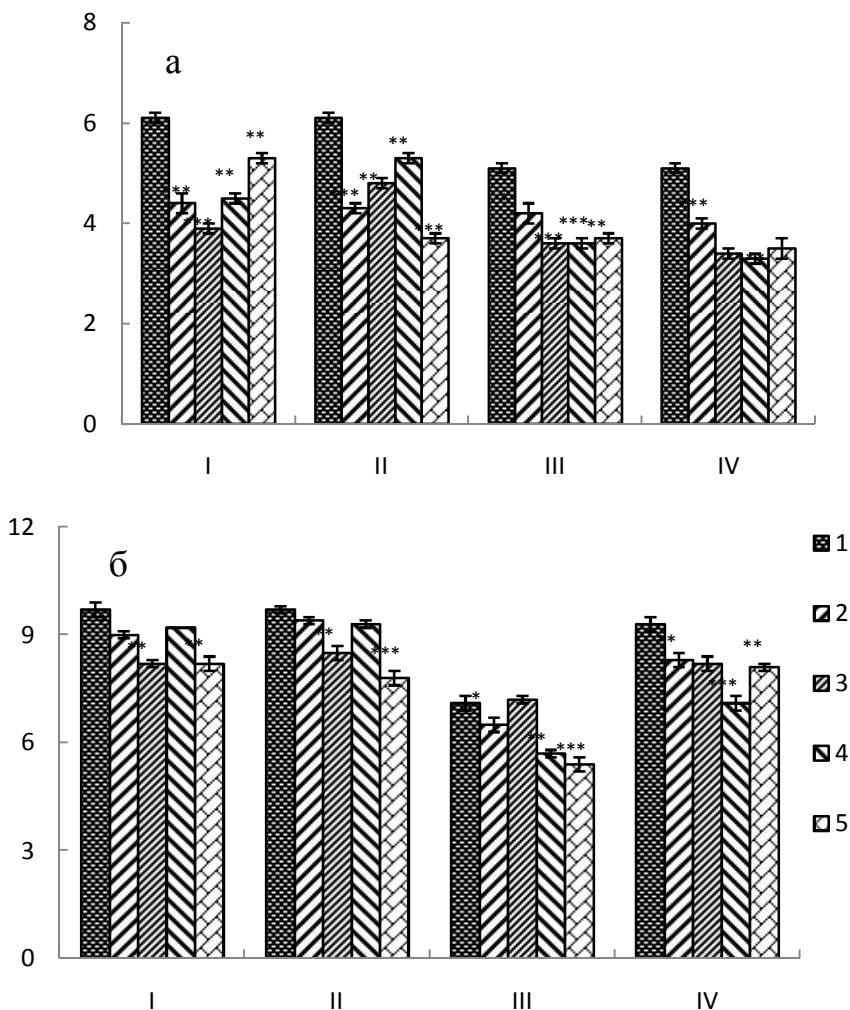


Рис. 1. Влияние фенола и его производных на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника (а) и химуса (б) у леща.

Обозначения здесь и в табл. 2 и 3: по оси абсцисс – токсические вещества: I – фенол; II – 4-хлорфенол III – 4-нитрофенол; IV – 2,4-динитрофенол. По оси ординат активность протеиназ, мкмоль/(г·мин). 1–5 концентрации фенолов: 1 – 0; 2 – 0.063; 3 – 0.125; 4 – 0.25; 5 – 0.5, ммоль/л.

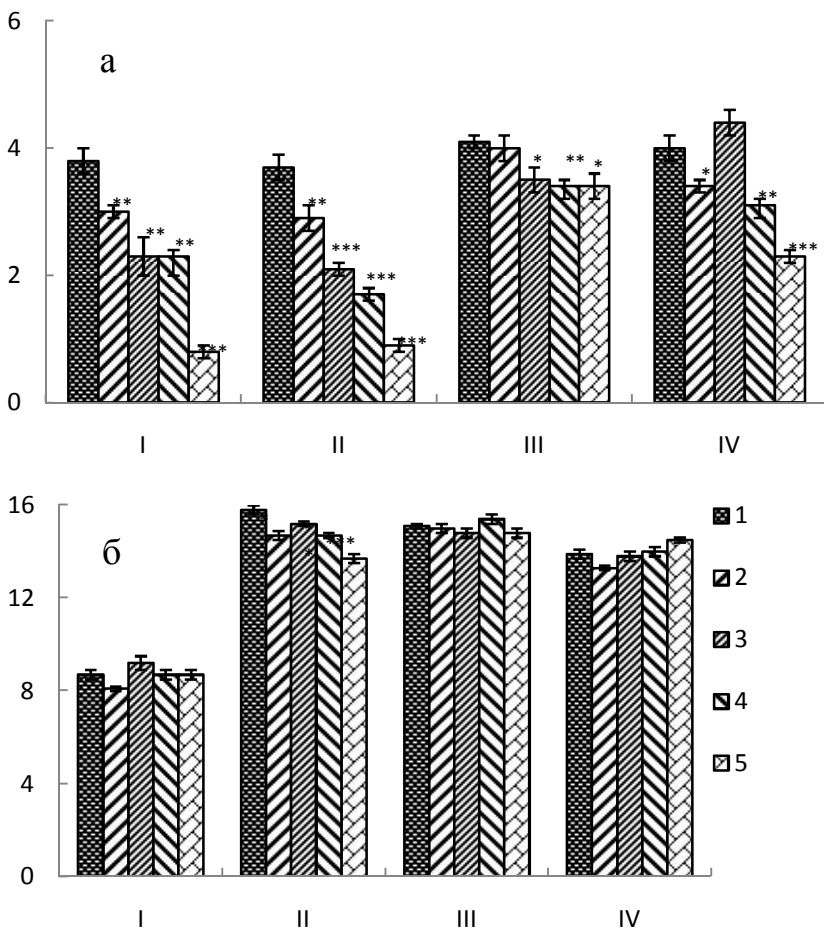


Рис. 2. Влияние фенола и его производных на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника (а) и химуса (б) у щуки.

Это предположение в равной мере относится и к казеинлитическим (трипсиноподобным) протеиназам. Особо следует отметить, что протеиназы представителя сем. окуневых *Percidae* достаточно устойчивы, сем. карповых *Cyprinidae* – менее устойчивы, ферменты щуки (сем. *Esocidae*) – наименее устойчивы к действию фенола и его производных.

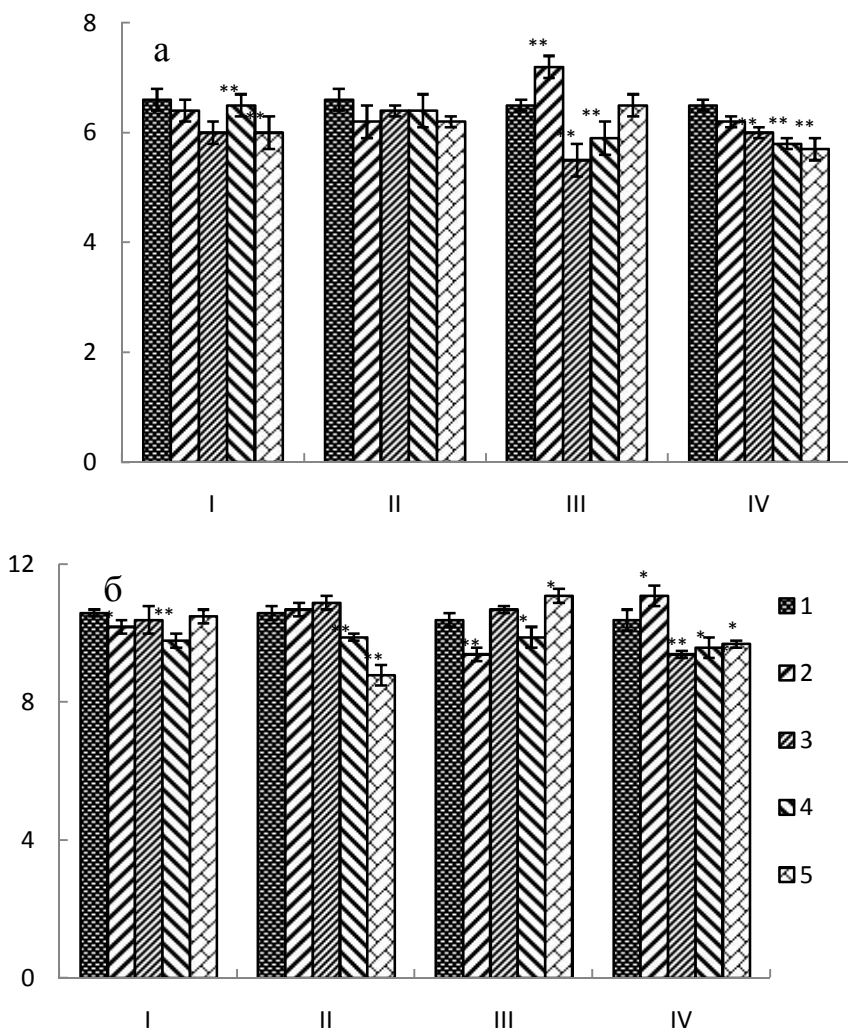


Рис. 3. Влияние фенола и его производных на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника (а) и химуса (б) у окуня.

Также можно предположить, что фенолы в малых концентрациях действуют аналогично тем, которые поступают в организм человека и животных в составе растительной пищи, а также лечебных препаратов. Известно, что фенольные соединения оказывают непосредственное влияние на слизистую оболочку пищеварительного тракта, а после поступления в кровь – на

гладкую мускулатуру и выделение пищеварительных соков (Барабой, 1984).

Таким образом, в условиях *in vitro* фенол и его производные в концентрациях 0.06–0.5 ммоль/л, как правило, значительно снижают активность протеиназ кишечника у леща, и, особенно, у щуки. Степень их воздействия зависит от вида рыб, а также локализации фермента (слизистая оболочка или химус). В ряде случаев фенол и его производные вызывают незначительное увеличение уровня ферментативной активности. Активность протеиназ у окуня слабо изменяется в присутствии исследованных токсических веществ, особенно при воздействии фенола и 4-хлорфенола на ферменты слизистой оболочки.

Литература.

Барабой В. А. Растительные фенолы и здоровье человека. М.: Наука, 1984. 160 с.

Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Изд. Высшая школа, 1974. 214 с.

Кузьмина В.В., Грачева Е.Л., Тарлева А.Ф., Тажимуратова У.Ж. Влияние фенола и его производных на активность гемоглоблинитических протеаз слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб разных видов // Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы. Матер. V всерос. конф. по водной экотоксикологии, посвященной памяти Б.А. Флерова. 2014. ч. 2. С. 62–66.

Куцый М.П., Кузнецова Е.А., Газиев А.И. Участие протеаз в апоптозе: Обзор // Биохимия. 1999. 64. N2. 0320-9725. С. 149-163.

Лукьяненко В.И. Токсикология рыб. М.: Пищевая промышленность, 1967. 139 с.

Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1983. 320 с.

Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных // СПб. Наука. 1989. 144 с.

Нейфах А.А., Тимофеева М.Я. Молекулярная биология процессов развития. 1977. 312 с.

Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J.Gen. Phys. 1938. V. 22. P. 79–83.

Michałowicz J., Duda W. Phenols – Sources and Toxicity // Polish J. Environ. Stud. 2007. V. 16. N. 3. P. 347–362.

# ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ КАСПИЙСКОЙ ВОБЛЫ (*RUTILUS RUTILUS CASPICUS* JAK.)

Д.Р. Файзулина, Н.Н. Базелюк

*Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства (ФГБНУ «КаспНИРХ»), Астрахань, Россия, e-mail: d\_faizulina@mail.ru, bazelyuk2012@yandex.ru*

Многообразие функций крови поставило ее в ряд ценнейших индикаторов. Изменения параметров этой тканевой системы у рыб и амфибий могут служить примером высокоспециализированных механизмов адаптации к условиям водной среды (Житенева, Рудницкая и др., 1997; Минеева, Минеев, 2011). По гематологическим показателям можно судить о влиянии экологических условий водоема на организм рыб, а также соответствии физиологического состояния конкретному этапу полового годового цикла (Житенева, Рудницкая и др., 1997). Количественные характеристики ключевых биохимических показателей крови рыб, выходящие за пределы нормы, характеризующиеся как патологические изменения уровня и состояния крови, свидетельствуют о негативном влиянии среды и как следствие о неблагоприятном физиологическом состоянии особей. Объектом исследования была каспийская вобла. Ранее уже отмечалось наличие патологических изменений показателей крови рыб Волжско-Каспийского бассейна (лещ, судак), указывающих на наличие постоянного стрессорного воздействия комплекса экзогенных и эндогенных факторов (Кузина, 2011).

Цель данной работы – выявление встречаемости патологических изменений показателей крови, таких как гемоглобин, общий сывороточный белок,  $\beta$ -липопротеиды и холестерин, у каспийской воблы, собранной в 2009 – 2014 гг. Анализу подверглось 500 образцов крови самок воблы 3-4-х лет в преднерестовый (IV стадия зрелости гонад) и в предзимовальный периоды (III стадия зрелости гонад).



Интенсивность обменных процессов организма рыб определяется исключительной ролью гемоглобина. Колебания его уровня возможны в пределах определенных параметров, специфичных для каждого вида рыб (Житенева, Рудницкая и др., 1997). Н.С. Строганов (1962) отмечал, что содержание в крови гемоглобина у различных видов рыб может варьировать от 40 до 147 г/л. Изучая уровень гемоглобина в крови воблы в преднерестовые периоды 2009-2014 гг., было установлено, что его величина в среднем колебалась от 32,44 до 57,90 г/л, достигая у отдельных особей 70-80 г/л. Уровень гемоглобина в крови повышается у тех рыб, которые вступили в фазу активной деятельности (например, передвижения), так же у рыб выявлена количественная корреляция со степенью готовности к нересту (Луц, Рогов и др., 1984). Для самок карпа, близких к нерестовому состоянию, отмечалась концентрация гемоглобина 70-100 г/л (Попов, 1986). Ежегодно в нерестовый период исследований у воблы фиксируются особи с патологически низким уровнем гемоглобина (анемия), составляющим менее 40 г/л (Шелухин, 1971), что не характерно для нерестового ее состояния. По результатам исследований 2010-2013 гг. отмечено небольшое количество рыб с патологически низким уровнем гемоглобина в крови в нерестовый период.

Таблица 1. Процентное соотношение особей воблы, изученной в нерестовые периоды 2009-2014 гг., с патологическими значениями биохимических показателей крови

Год	Процент особей воблы с патологическими изменениями количественных характеристик показателей крови от исследованной выборки, %			
	Гемоглобин	Общий сывороточный белок	$\beta$ -липопротеиды	Холестерин
2009	3,5	3,5	3,5	24,1
2010	2,9	3,0	3,0	3,0
2011	10,7	10,7	28,6	17,9
2012	19,6	3,4	54,5	13,3
2013	4,0	-	53,3	9,1
2014	96,0	-	22,2	53,0

В выборке 2010 г. отмечено небольшое количество анемичных рыб (2,9 %). В выборке 2014 г. подавляющее количество исследованных рыб (96,0%) характеризовались как

анемичные, что могло неблагоприятно отразиться на самом нересте и на потомстве (табл. 1).

Выборки рыб, исследованные в предзимовальные периоды 2010-2011 гг., характеризовались повышенным количеством рыб с патологически низким уровнем гемоглобина, составляющим 23,3 и 27,9 % исследованных особей. Данные нарушения могут быть связаны с наличием неблагоприятных факторов как абиотической, так и биотической природы во время нагула летом 2010-2011 гг. воблы в Северном Каспии (табл. 2).

Общие сывороточные белки (ОСБ) – важнейшие биохимические компоненты, благодаря которым кровь из сложного раствора многих веществ превращается в ткань организма, где происходят сложнейшие обменные процессы, определяющие целостность организма (Ипатов, Лукьяненко, 1979). Количество общего сывороточного белка может колебаться в значительных пределах. Рыбы с количеством ОСБ ниже 30 г/л характеризуются как истощенные, с нарушением белкового обмена (Строганов, 1962; Шелухин, 1971). Уровень ОСБ отражает доступность и полноценность питания рыб в нагульный период. В предзимовальные периоды 2009 – 2014 гг. содержание ОСБ у воблы варьировало от 44,52 до 69,58 г/л. В 2013 г. отмечено повышение уровня ОСБ. В ежегодно изучаемых весенних и осенних выборках воблы количество рыб с содержанием ОСБ ниже 30 г/л, что характеризуется как патология, в среднем не превышало 11,0 % (табл. 1, 2).

Таблица 2. Процентное соотношение особей воблы, изученной в предзимовальные периоды 2009-2013 гг., с патологическими значениями биохимических показателей крови

Год	Процент особей воблы с патологическим показателем крови от исследованной выборки, %			
	Гемоглобин	Общий сывороточный белок	β-липопротеиды	Холестерин
2009	6,3	7,0	45,0	1,9
2010	23,3	6,8	35,9	26,7
2011	27,9	3,6	29,7	32,1
2013	-	-	27,2	100,0

Патологические значения β-липопротеидов крови рыб составляют ниже 0,5 и выше 6 г/л (Шелухин, 1971; Ипатов, 1979).

Очень низкие или слишком высокие концентрации часто свидетельствуют о резорбционных процессах в гонадах рыб, о возможной нежизнеспособности икры. У самок с патологическим уровнем  $\beta$ -липопротеидов отмечаются изменения в компонентном составе белков и соотношении триглицеридов и фосфолипидов, переносимых в икру непосредственно  $\beta$ -липопротеидами (Лизенко, Сидоров, 1998). В нерестовые периоды, когда идет активный переброс резервных биохимических субстратов для окончательного формирования гонад, среднее содержание  $\beta$ -липопротеидов в сыворотке крови гораздо выше. В этот период в выборках воблы 2009-2014 гг. средний уровень  $\beta$ -липопротеидов составлял 2,57; 2,26; 3,85; 1,20; 0,57; 1,49 г/л соответственно, как и ожидалось, был выше, чем в предзимовальные периоды (2009-2013 гг. - 0,81; 0,86; 1,09; 0,72 г/л соответственно). Знание рыб с патологическими значениями  $\beta$ -липопротеидов особенно важно именно в нерестовый период. Весной 2012-2013 гг. количество рыб с патологическими значениями  $\beta$ -липопротеидов резко увеличилось до 54,5 и 53,3 % соответственно (табл. 1), что негативно отразилось на эффективности нереста воблы. В выборке 2014 г. наблюдалось значительное сокращение таких неблагополучных рыб. В предзимовальные периоды количество рыб с патологическим уровнем  $\beta$ -липопротеидов постоянно и составляет и 27-45 % (табл. 2).

Одним из знаковых биохимических показателей крови является уровень холестерина. Холестерин необходим в процессе формирования естественной реакции организма на стресс, при этом выделяется адренокортикотропин, который влияет на синтез и секрецию кортикоидных гормонов (кортизола, кортизона, кортикостерона) (Лапин, Шатуновский, 1981; Биохимия, 2009). Уровень холестерина в крови рыб выше 3-3,5 г/л считается патологическим и свидетельствует о стрессирующем воздействии среды (Шелухин, 1971). В изученных выборках количество рыб с патологически высоким уровнем холестерина в крови было невысоким. Однако осенью 2013 г. и весной 2014 г. рыб с патологически высоким уровнем холестерина в крови отмечено 100 и 53 % соответственно из исследованных выборок (табл. 1, 2), что свидетельствовало о наличии и непосредственном влиянии

неблагоприятных экологических факторов среды на исследованных особей.

Таким образом, ежегодно (по результатам исследований 2009-2014 гг.) фиксируются патологические изменения показателей крови (гемоглобин, общий сывороточный белок,  $\beta$ -липопротеиды, холестерин) у каспийской воблы, свидетельствующие о наличии и воздействии неблагоприятных экологических факторов среды обитания (уменьшение кормовой базы, аномальные температуры, скорость течения, содержания кислорода, маловодные и многоводные годы, наличие токсических веществ и микроорганизмов в воде и т.д.) на организм. Однако при нормализации экологической обстановки, отмеченные ранние патологические изменения в значениях важнейших биохимических показателей крови воблы, могут вернуться в пределы нормы, в связи с функциональными особенностями крови, способной быстро восстанавливаться.

#### Список литературы

Биохимия: учебник для вузов / Под ред. Е.С. Северина. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 768 с.

Житенева Л.Д., Рудницкая О.А., Калюжная Т.И. Эколого-гематологические характеристики некоторых видов рыб. Ростов-на-Дону: Изд-во «Молот», 1997. 152 с.

Ипатов В.В. Значение и задачи эколого-физиологических исследований в биологическом обосновании промысловых прогнозов // Актуальные вопросы экологической физиологии и биохимии рыб / Экологическая физиология и биохимия рыб: тез. докл. IV-й Всесоюз. конф. Астрахань: ЦНИОРХ, 1979. Т.1. С. 15-17.

Кузина Т.В. Цитофизиологические особенности крови промысловых рыб Волго-Каспийского канала: автореф. на соиск. степ. канд. биол. наук. Астрахань: ГОУ ВПО «АГУ», 2011. 181 с.

Лапин В.И., Шатуновский М.И. Особенности состава, физиологическое и экологическое значение липидов рыб // Усп. совр. биол. 1981. Т. 92. В. 3(6). С. 380-394.

Лизенко Е.И., Сидоров В.С., Регеранд Т.И., Гурьянова С.Д. Сравнительная характеристика липидных компонентов сыворотки крови некоторых хрящевых и костных рыб // Эволюционная биохимия. 1998. Т. 4. С. 641-647.

Луц Г.И., Рогов С.Ф., Пряхин Ю.В. Некоторые закономерности колебаний численности пелагических рыб Азовского моря – тюльки, сельди и хамсы // Вопросы ихтиологии. 1984. Т. 24. Вып. I. С. 3-10.

Минеева О.В., Минеев А.К. Нарушения лейкоцитарной формулы крови озерной лягушки Саратовского водохранилища // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2011. № 2 (2). С. 94-97.

Попов О.П. Физиолого-биохимическая характеристика функционального состояния карпа (*Cyprinus carpio* L.) в процессах заводского воспроизводства, селекции и товарного выращивания: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М., 1986. 25 с.

Строганов Н.С. Экологическая физиология рыб. Т. 1. М.: Изд-во Московского университета. 1962. 443 с.

Шелухин, Г.К. Физиолого-биохимические параметры осетровых в морской и речной периоды жизни: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 1974. 19 с.

### **PATHOLOGICAL CHANGES OF SOME PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL BLOOD INDICES OF CASPIAN ROACH (*RUTILUS RUTILUS CASPICUS* JAK.)**

Fajzulina D.R., Bazeljuk N.N.

The article presents the results of the research of the presence of specimens in the population of the Caspian roach with pathological changes of some indices of blood – haemoglobin, serum protein,  $\beta$ -lipoproteids, cholesterol. The data from 2009-2014 were generalized. Pathological specimens were revealed in pre-spawning and pre-wintering periods of life of the Caspian roach. The ratio of the pathological specimens and fishes with normal values of the studied indices was changed every year.

### **ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ПАРАМЕТРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ТКАНЯХ РЫБ**

В.Г. Шайда, Е.Н. Скуратовская, И.И. Руднева

*Институт морских биологических исследований  
им. А.О. Ковалевского, Севастополь, пр. Нахимова, 2, Россия,  
e-mail: [svg-41@mail.ru](mailto:svg-41@mail.ru)*

Прибрежные экосистемы Черного моря подвержены многим видам антропогенного воздействия, в них попадают коммунальные сточные воды, сливы с промышленных предприятий, сельскохозяйственных угодий и морского транспорта. Исследование биомаркеров рыб, обитающих в бухтах с разной степенью загрязнения, дает возможность определить основную стратегию и механизмы структурно-функциональных изменений в организме при адаптации к условиям антропогенно-

трансформированных морских экосистем (Adams, 2005; Van der Oost et al., 2003).

В настоящее время для анализа здоровья водных организмов и среды их обитания широко используются параметры свободнорадикального окисления (СРО), характеризующие состояние окислительного стресса, инициированного неблагоприятными условиями жизни. Наши предыдущие исследования показали, что ферменты антиоксидантной системы тканей рыб, обитающих в черноморских бухтах в районе Севастополя, в разной степени подверженных влиянию хозяйственной деятельности, по-разному реагируют на уровень загрязнения (Руднева и др., 2011; Rudneva et al, 2012). В связи с этим актуальным остается поиск способов и индикаторов, адекватно отражающих процессы, происходящие в организме гидробионтов, обитающих в акваториях с высоким уровнем антропогенного воздействия. Одним из перспективных методов оценки степени окислительного стресса у организмов является метод хемилюминесценции (ХЛ), который широко применяется в клинической практике и имеет прогностическое значение (Владимиров, 2001; Галиуллина и др., 2013).

Цель настоящей работы – изучение параметров окислительного стресса в печени морского ерша из четырех севастопольских бухт, характеризующихся разным уровнем загрязнения.

Объектом исследований служил морской ерш *Scorpaena porcus* – типичный представитель донной ихтиофауны Черного моря. Рыб отлавливали в весенний период в 2012-2014 гг. в четырех бухтах, расположенных в районе г. Севастополя (Казачья, Александровская, Карантинная и Стрелецкая) с разным уровнем антропогенного влияния. Наиболее чистой считается бухта Казачья, где нет источников загрязнения и выпусков в акваторию. В бухте Александровской также отсутствуют прямые источники загрязнения, однако выпуски ливневых стоков из городского коллектора осуществляются в Севастопольскую бухту, частью которой она является. В результате этого загрязнители попадают в ее акваторию, а закрытое расположение бухты способствует их накоплению в донных осадках и в биоте.

Прибрежная акватория Карантинной бухты – это зона экологической реабилитации вод, так как, несмотря на наличие аварийного выпуска хозяйственно-бытовых стоков и «соседства» с сильно загрязненной Севастопольской бухтой, в ней за счет активного водообмена с прилегающей частью моря и наличия мидийной фермы, процессы деструкции органического вещества протекают достаточно интенсивно. Бухта Стрелецкая относится к сильно загрязненным акваториям за счет выпусков коммунальных стоков, расположенного на берегу судоремонтного завода и интенсивного судоходства.

Печень рыб извлекали, несколько раз промывали холодным физраствором, гомогенизировали, центрифугировали при 8000 g 15 минут. В полученных экстрактах определяли содержание ТБК-реактивных продуктов спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Specol -211 (Carl Zeiss, Iena, Germany) (Стальная, Гаришвили, 1977) и показатели хемилюминесценции (ХЛ) на хемилюминометре 2011 (LKB, Швеция), иницируя свечение 3%-ной перекисью водорода в присутствии  $\text{FeSO}_4$  (Владимиров, 2001). Оценивали величину пика ХЛ в условных единицах, для чего регистрируемое значение интенсивности светосуммы максимума ХЛ делили на концентрацию белка в образце, которое определяли с помощью стандартного набора реагентов фирмы Филисит (Украина).

Сравнительный анализ данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными в случае, если  $p \leq 0,05$  (Лакин, 1990).

Как можно видеть на рисунке 1, содержание ТБК-реактивных продуктов в печени морского ерша из трех тестируемых бухт существенно не различается. Однако, показатели экстрактов печени рыб, отловленных в бухте Стрелецкой, более, чем в 2 раза выше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с соответствующими значениями особей из остальных трех бухт.

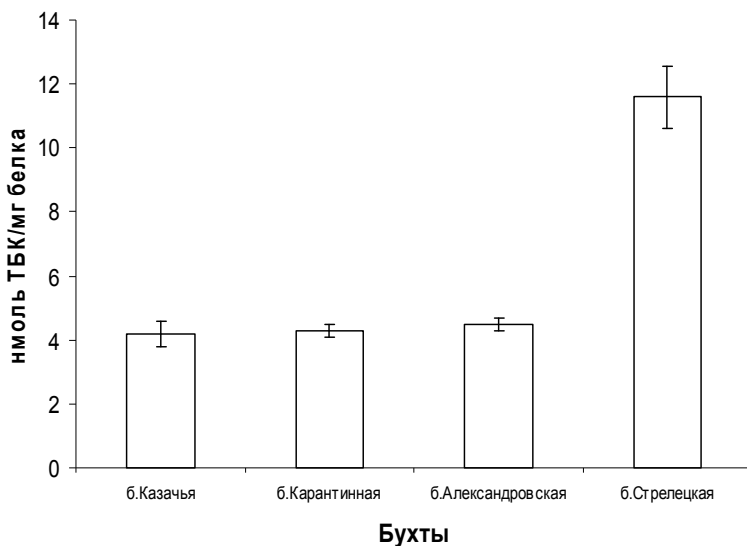


Рис. 1. Содержание ТБК-реактивных продуктов в печени морского ерша, отловленного в различных бухтах Севастополя

Показатели ХЛ также различались в экстрактах печени рыб, отловленных в тестируемых бухтах (рис. 2). Самые высокие значения спонтанной ХЛ (СХЛ) были установлены в печени рыб из б. Стрелецкой, самые низкие – у особей из б. Казачьей и Карантинной, показатели СХЛ морского ерша из б. Александровской имели средние величины. Параметры инициированной ХЛ в экстрактах печени рыб убывали в ряду б. Стрелецкая→б. Казачья→ б. Карантинная→Александровская.

Результаты исследований свидетельствуют о разной чувствительности биомаркеров тканей рыб к загрязнению среды обитания. Накопление ТБК-реактивных продуктов в печени морского ерша не отличалось у особей из трех бухт, но существенно возрастало у морского ерша, обитающего в самой загрязненной акватории – б. Стрелецкой, что свидетельствует об усилении СРО в печени рыб из экологически неблагополучного района.



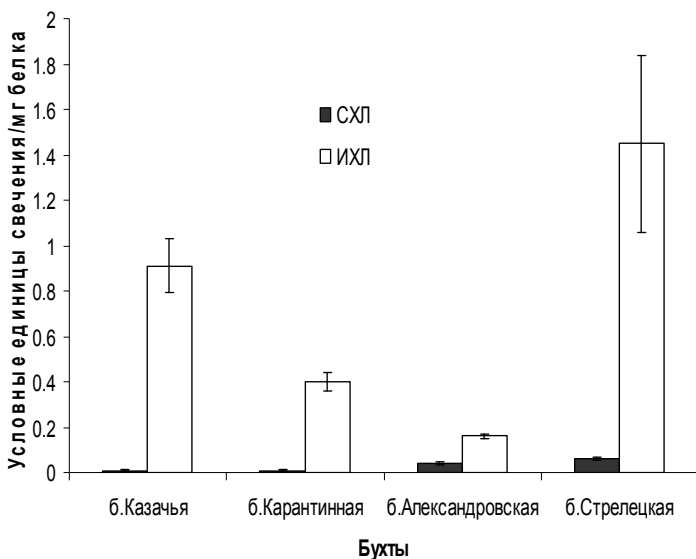


Рис. 2. Показатели ХЛ экстрактов печени морского ерша, отловленного в различных бухтах Севастополя. СХЛ – спонтанная хемилюминесценция, ИХЛ – инициированная с помощью  $H_2O_2$  хемилюминесценция.

Показатели СХЛ и ИХЛ экстрактов печени также свидетельствуют о более интенсивном уровне свободнорадикальных процессов у рыб из бухты Стрелецкой, что может быть обусловлено большим загрязнением данной акватории и усилением СРО. В то же время показатели ИХЛ выше в печени рыб из условно чистой акватории по сравнению с соответствующими значениями морского ерша из районов с средним уровнем загрязнения – бухтами Карантинной и Александровской. Следует отметить, что СХЛ характеризует скорость СРО без внешнего воздействия, тогда как быстрая вспышка (ИХЛ) возникает в момент добавления инициатора, и ее амплитуда прямо пропорциональна содержанию продуктов перекисного окисления липидов (Владимиров, 1999). Следовательно, можно заключить, что содержание продуктов ПОЛ достаточно высокое в экстрактах печени морского ерша из б. Казачьей, что может быть обусловлено в том числе особенностями питания рыб в этой акватории. У рыб из бухт

Карантинной и Александровской самые низкие показатели ИХЛ, что свидетельствует о невысоком накоплении продуктов ПОЛ в тканях и (или) об их интенсивном выведении.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-44-010114 «Поиск критериев оценки состояния морских прибрежных экосистем Севастопольского региона на основе биоиндикаторов рыб».

#### Список литературы

Владимиров Ю.А. Свечение, сопровождающее биохимические реакции // Соросовский образовательный журнал. 1999. Т. 6. С. 25-35.

Владимиров Ю.А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7. 16-20.

Галиуллина А.В., Валиев Р.Ф., Камилев Р.Ф., Шакиров Д.Ф., Буляков Р.Т. Прогностическое значение определения хемилюминесценции жидкости полости рта при воздействии химических загрязнителей // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. № 12. С. 11-15.

Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк. 1990. 352 с.

Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. С. 66-68.

Руднева И.И., Скуратовская Е.Н., Омельченко С.О., Залевская И.Н., Дорохова И.И., Граб Ю.А. Биоиндикация экологического состояния морских акваторий с помощью биомаркеров рыб // Водные ресурсы. 2011. Т. 38, № 1. С. 92-97.

Rudneva I.I., Skuratovskaya E.N., Dorohova I.I., Kovyrshina T.B. Application fish blood biomarkers in evaluation of marine environment health // Asian J. Exp. Biol. Sci. 2012. V. 2. № 7. P. 19–25.

Adams S.M. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine system. // Marine Pollut. Bull. 2005. V. 51, № 8-12. P. 649-657.

Van der Oost, R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2003. V. 13. P. 57-149.

### EFFECT OF POLLUTION ON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN FISH TISSUES

Shaïda V.G., Skuratovskaya E.N., Rudneva I.I.

The health status of Black Sea scorpion fish *Scorpaena porcus* in Sevastopol bays characterizing different level of pollution were studied. The concentration of TBA-reactive products were significantly higher in fish liver from the most polluted site as well as the values of spontaneous and initial chemiluminescence of hepatic extracts. The obtained results demonstrated the oxidative stress in the liver of fish caught in the contaminated area.

# СЕКЦИЯ III. БОЛЕЗНИ РЫБ И ОХРАНА ЗДОРОВЬЯ ГИДРОБИОНТОВ

## ДИНАМИКА ТРИЕНОФОРОЗА ФОРЕЛИ В ФОРЕЛЕВОМ САДКОВОМ ХОЗЯЙСТВЕ «ПРИБРЕЖНОЕ» (КАЛИНИНГРАДСКАЯ ОБЛАСТЬ)

Е.В. Авдеева, Е.Б. Евдокимова

ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический  
университет, Калининград, Россия. e-mail: [elavd@mail.ru](mailto:elavd@mail.ru)

Ихтиопатологи Калининградского государственного технического университета с 1990 года ведут регулярные исследования заражения форели, выращиваемой в форелевом садковом хозяйстве «Прибрежное».

Озеро «Форелевое» (карьер «Прибрежный»), на котором находится форелевое хозяйство, расположено в западной части Калининградской области, в 50-200 м от Калининградского залива в пределах Прегольской озерно-ледниковой равнины. Озеро соединено узким каналом с заливом. Через канал в озеро проникают хищные и мирные рыбы, а также представители зоопланктона.

Цестода *Triaenophorus nodulosus* попадает с первыми промежуточными хозяевами - циклопами в песчаный карьер, где расположено форелевое рыбоводное хозяйство «Прибрежное». Форель (второй промежуточный хозяин) выращивается в садках и кормится датскими кормами Aller aqua. При недостатке корма рыба переходит на питание зоопланктоном, скапливающимся в районе садков, и заражается триенофорусом.

В 2014 году методом полного паразитологического вскрытия были исследованы 15 экземпляров годовиков весной и 15 двухлеток форели осенью.

Весной плероцеркоиды цестоды *Triaenophorus nodulosus* были обнаружены у форели размерами от 16,5 до 18 см. Экстенсивность заражения составила 26,7%, интенсивность заражения от 1 до 7 экземпляров на рыбу.

Семь экземпляров триенофорусов были найдены у форели размером 18 см и четыре экземпляра у форели размером 16,5 см. У форели размером от 19,5 до 22 см зарегистрировано по одному экземпляру паразита. Цисты триенофоруса локализовались в печени. По нашему мнению более мелкая форель заражается сильнее, чем крупные особи.

Осенью исследовали двухлеток форели размером от 24 до 31,5 см. Экстенсивность заражения достигала 20%, интенсивность заражения от 2 до 5 экземпляров на рыбу.

Все триенофорусы были найдены у форели размером от 26 до 26,5 см. Плероцеркоидов триенофорусов обнаруживали в цистах белого цвета на поверхности печени. В цисте находилось от 2-х до 5-ти плероцеркоидов.

Развитие триенофоруса происходит с участием двух промежуточных хозяев: веслоногих рачков и мирных рыб. Форель в садках заражается паразитами при питании рачками *Eudiaptomus gracilus*, *Cyclops abullorum*, *Acanthocyclops vernalis*.

Изучение динамики заражения форели плероцеркоидами триенофоруса проводили с 1989 года, когда он впервые был зарегистрирован на форелевом рыбноводном хозяйстве «Прибрежное», по настоящее время (табл. 1).

Таблица 1 Зараженность форели плероцеркоидом *Trienocephalus nodulosus* в садках форелевого рыбноводного хозяйства «Прибрежное» за ряд лет

Годы исследования	Экстенсивность инвазии, %	Интенсивность инвазии, экз.	
		min	max
1990	50,0	1	2
1991	25,0	1	2
1992	25,0	1	4
1993	15,0	1	5
1994	30,0	6	10
1995	14,5	1	2
2001	35,7	1	12
2013	26,6	1	2
2014	26,7	1	7

Самая высокая зараженность - 50% была отмечена в 1990 году. Плероцеркоиды паразита нами были найдены как в печени,

так и на поверхности кишечника и в полости тела. Цисты паразита из полости тела и с поверхности кишечника были сильно обводнены, увеличены в размерах и имели тонкие стенки. В остальные годы исследования экстенсивность заражения колебалась от 14,5% до 30%. В 2000-е годы экстенсивность заражения стабилизировалась, и паразиты локализовались только в печени рыбы. В настоящее время заражение держится на постоянном уровне, и паразит обнаруживается в характерном для него органе (печени).

Сложившуюся ситуацию можно объяснить следующим образом: когда рыбе дают достаточное количество корма, то из ее питания исключается копеподитная группа зоопланктона и не происходит заражения паразитом. Возможно, это связано также с тем, что система «паразит-хозяин» («триенофорус-форель») в озере стабилизировалась, и у форели выработался иммунитет к паразиту.

#### **THE DYNAMICS OF TRIAENOFOROSIS OF RAINBOW TROUT IN CAGE FARMING «PRIBREZHNOE» (KALININGRAD REGION)**

Avdeeva E.V., Evdokimova E.B.

Invasion of rainbow trout by plerocercoids of *Triaenophorus nodulosus* have been detected in cage farming «Pribrezhnoe». The extensiveness of this invasion felled within 14,5-30%. Now the degree of invasion is at the regular level and rainbow trout has immunity to the *Triaenophorus nodulosus*.

#### **МИКРОФЛОРА ПРОМЫСЛОВЫХ ВИДОВ РЫБ ИЗ ЕСТЕСТВЕННЫХ ВОДОЕМОВ КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ**

Е.В. Авдеева, О.В. Казимирченко

ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет, Калининград, Россия

e-mail: [elavd@mail.ru](mailto:elavd@mail.ru), [okazimirchenko@gmail.com](mailto:okazimirchenko@gmail.com)

К числу высокопродуктивных рыбохозяйственных водоемов Калининградской области относятся Куршский и Вислинский заливы. Регулируемое рыболовство позволило добиться не снижающегося воспроизводства запасов ценных видов рыб в заливах. В тоже время антропогенное загрязнение и

эвтрофирование рыбохозяйственных водоемов отрицательно сказываются на состоянии ихтиофауны.

К актуальным проблемам ихтиопатологии относится изучение особенностей функционирования гидробионтов, обитающих в загрязненной среде и их патологии. Известно, что длительное антропогенное воздействие на водоем приводит к изменению адаптационных механизмов микрофлоры, повышению ее вирулентности, антибиотикорезистентности и появлению атипизма. При этом в воде и рыбе условно-патогенные микроорганизмы могут существовать длительное время, изменяя свой метаболизм и не утрачивая при этом патогенные свойства.

На протяжении нескольких лет сотрудниками лаборатории ихтиопатологии Калининградского государственного технического университета проводится микробиологический мониторинг некоторых ценных промысловых видов рыб – леща, судака, салаки, плотвы, обитающих в Куршском и Вислинском заливах.

В популяции леща Куршского залива ежегодно регистрируются особи с язвенными поражениями кожи. Геморрагические поражения отмечаются также на плавниках, в области головы, рта, на жаберных крышках. Патологические изменения регистрируются в печени и почках.

В составе микрофлоры лещей с признаками краснухоподобного заболевания, а также воды и грунта залива в течение всех сезонов года преобладают условно-патогенные группы бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*. Аэромонады в наибольших количествах контаминируют кожу, псевдомонады – кожу, печень и селезенку. Из язвенных и геморрагических поражений кожи леща выделяются бактерии *A. hydrophila* и *Ps. putrefaciens*, обладающие активными протеолитическими ферментами.

При ихтиопатологических исследованиях судака Куршского залива патологические изменения на коже и внутренних органах у большинства особей не обнаруживаются. В весенне-летние сезоны года у незначительного числа особей рыбы обычно отмечаются незначительные покраснения на плавниках, в области рта, нижней челюсти, кровоизлияния на жаберной крышке.

В составе микрофлоры судака обнаруживаются различные виды палочковидных и кокковых бактерий: грамотрицательные палочковидные бактерий родов *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Escherichia coli*; грамположительные палочковидные бактерии родов *Bacillus*, *Actinomyces*, *Khurtia*, кокковые бактерии родов *Micrococcus* и *Enterococcus*. Разнообразие микрофлоры судака, вероятнее всего, связано со значительной бактериальной обсемененностью воды залива, а также может определяться особенностями биологии этого вида рыбы (хищничество). Доминирующее положение в течение года в микробиоценозе кожи, жабр и внутренних органов судака занимают холодоустойчивые виды условно-патогенных бактерий рода *Pseudomonas* - *Ps. cepacia*, *Ps. stutzeri*, *Ps. alcaligenes*. Доля условно-патогенных аэромонад в микрофлоре судака незначительна. В весенне-летние сезоны года в микрофлоре кожи, кишечника и почек рыбы часто встречаются патогенные бактерии *Ps. aeruginosa*, представляющие опасность не только для гидробионтов, но и для человека.

В Вислинском заливе нами проводятся мониторинговые наблюдения за ихтиопатологическим состоянием плотвы и салаки. При клинических и патологоанатомических исследованиях этих видов рыб патологические изменения не наблюдаются. Бактериоценоз плотвы в течение года определяют условно-патогенные бактерии рода *Aeromonas*, санитарно-значимые бактерии рода *Enterobacter* и кокковые бактерии рода *Streptococcus*. Аэромонады, представленными только *A. hydrophila*, циркулируют в микрофлоре почек рыбы. В составе микрофлоры желчного пузыря, печени, селезенки и кишечника выявляются кокковые *St. agalactiae* и *St. canis*. Кишечные энтеробактеры обычно присутствуют в микрофлоре кожи и жабр плотвы.

Микрофлора салаки отличается меньшим видовым разнообразием, что может быть связано с особенностями обитания этого вида рыбы – морской и пресноводный период жизни. Бактериоценоз салаки формируется в основном сапрофитными кокковыми бактериями родов *Micrococcus* (*M. luteus*) и *Sarcina* (*S. flava*). Кокковые бактерии обычно обнаруживаются нами в посевах печени, селезенки, почек,

кишечника. В составе микрофлоры кожи и жабр присутствуют кишечные бактерии рода *Enterobacter*.

В настоящее время Вислинский залив подвержен высокому антропогенному загрязнению. Малые размеры залива, его мелководность стали причиной быстрой потери его способности к самоочищению. В микрофлоре воды и грунтов Вислинского залива постоянно обнаруживаются условно-патогенные для рыб бактерии «аэромонадно-псевдомонадного» комплекса, разнообразные виды санитарно-значимых кишечных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

Таким образом, результаты проведенных исследований выявили устойчивую циркуляцию потенциально-опасных бактерий в системе «организм рыбы - среда ее обитания». Значительное обсеменение условно-патогенными аэромонадами и псевдомонадами кожных покровов рыб приводит к развитию язвенных и геморрагических поражений. Присутствие потенциально опасных бактерий во внутренних органах рыбы может свидетельствовать о бессимптомном хроническом течении бактериальной инфекции у рыбы, и при возникновении стрессовых условий возможна вспышка бактериального заболевания.

#### **MICROFLORA OF SOME COMMERCIAL FISH SPECIES FROM RESERVOIRS OF KALININGRAD REGION**

E. V. Avdeeva, O. V. Kazimirchenko

The microbiological investigations of bream, zander, roach and herring from Curonian and Vistula lagoons were carried out. The potential pathogenic bacteria of *Aeromonas* and *Pseudomonas* genesis in fish microflora have been revealed.



# УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ВИДОВ РОДА *AEROMONAS SPP.* ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ, ВЫРАЩИВАЕМОЙ В МАССИСКОМ РЕГИОНЕ РА

К.М. Григорян, М.П. Саргсян, В.В. Овсепян, Г.Н. Бадалян,  
М.Р. Гиновян

*Ереванский государственный университет, кафедра  
микробиологии и биотехнологии микроорганизмов и растений,  
Ереван, Армения*

Виды рода *Aeromonas* широко распространены в водных экосистемах, используемых для выращивания пресноводной аквакультуры, в том числе и радужной форели. Подвижные формы указанного рода вызывают у рыб геморрагический сепсис и язвы, нанося существенный экономический ущерб рыбоводческим фермам (Holliman, 1993; Cipriano, 2001). Представители рода *Aeromonas* – грамотрицательные, оксидазоположительные, аэробные, мезофильные бактерии. Они относятся к условно-патогенным бактериям и часто являются причиной бактериальных заболеваний рыб (Austin&Austin, 2007; Ogozova et al., 2009).

В последние годы наблюдается резкое увеличение случаев множественной устойчивости к антибиотикам среди видов и штаммов рода *Aeromonas*, не только возбудителей бактериозов рыб, но и возбудителей инфекционных заболеваний человека, вызванных условно-патогенными штаммами указанного рода (Ogozova et al., 2010). Использование антибиотиков против инфекционных заболеваний рыб, вызванных подвижными видами рода *Aeromonas*, способствует развитию устойчивости у бактерий относительно антибиотиков, используемых в ветеринарной практике (Aoki & Egusa, 1971; Mitchell & Plumb, 1980; Saavedra et al., 2004; Kaskhedikar et al., 2010). Множественная устойчивость к антибиотикам (MAR) зарегистрирована для вида *Aeromonas hydrophila*, изолированного из пресноводной аквакультуры, которая связана с кормами, содержащими разные антибиотики, в качестве кормовой добавки (Pettibone et al., 1996; Son et al., 1997;

Vivekanandhan et al., 2002). Согласно Belém-Costa (2006) в искусственных водоемах, с системой рециркуляции отмечается высокая частота встречаемости вирулентных штаммов рода *Aeromonas*. Среди видов рода *Aeromonas*, *A. hydrophila* является наиболее распространенным в природе. Указанный вид часто встречается в воде, почве, пищевых продуктах. Наиболее часто виды рода *Aeromonas* встречаются в водных экосистемах и желудочно-кишечном тракте здоровой рыбы (Trust et al., 1974; Cigrano, 2001).

Основная цель представленной работы – это выделение, идентификация и определение устойчивости к определенному спектру антибиотиков видов рода *Aeromonas*, возбудителей бактериозов аквакультуры радужной форели в Массиском регионе Армении.

При отборе образцов с больной рыбы использованы транспортные среды (HiMedia MS 651). Образцы отбирались с радужной форели на разных стадиях развития со следующими симптомами: поражение кожных покровов в виде язв и гемморагическая септицемия на разных участках тела рыбы. Выделение видов рода *Aeromonas* проводилось на высокоселективных питательных средах (M 884; M 1284 HiMedia Lab., India).

Для идентификации изолированных штаммов использовано биохимическое тестирование и быстрые системы идентификации API 20E (Bashir et al., 2005).

Изучена устойчивость изолированных штаммов рода *Aeromonas* относительно 16 антибиотиков согласно рекомендациям CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2007). В работе использованы следующие стандартные диски, содержащие определенные количества антибиотиков: амоксицилин (25 µg); ампицилин (10 µg); хлорамфеникол (30 µg); эритромицин (15 µg); гентамицин (10 µg); канамицин (30 µg); норфлоксацин (10 µg); новобиоцин (30 µg); оксацилин (1 µg); пеницилин G (10 U = 6 µg); рифампицин (5 µg); стрептомицин (10 µg); тетрациклин (30 µg) и др. (Hi Media, Lab.).

Индекс множественной антибиотикоустойчивости (MAR) определяли согласно (Krumperman 1983).

Изучена гемолитическая активность изолированных штаммов согласно (Johny et al., 2014).

С образцов больной радужной форели, с симптомами гемморагической септицемии выделено более 60 штаммов из рода *Aeromonas*. На высокоселективных средах отмечены три морфологические группы из рода *Aeromonas*, с высокой частотой встречаемости. Идентифицированы следующие виды из рода *Aeromonas*: *A. hydrophilla*, *A. cavie*, *A. sobria*, *A. bestiarum* (Табл.1).

Таблица 1. Наиболее важные биохимические характеристики штаммов рода *Aeromonas* spp., изолированных из радужной форели

Биохимические характеристики	<i>Aeromonas hydrophilla</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas cavie</i>	<i>Aeromonas bestiarum</i>	<i>Aeromonas sobria</i>
VP*	25 (5)**	4	10(2)	4	9(1)
гидролиз эскулина	12(13)	-	-	4	-
ферментация глюкозы	25	4	12	4	10
ферментация арабинозы	18(7)	4	8(4)	4	7(3)
ферментация сорбитола	0(25)	4	0(12)	4	0(10)
цитохром оксидаза	25	4	12	4	10
желатиназа	-	4	12	4	10
лизин декарбоксилаза	20(5)	0(4)	12	4	10
тест на подвижность	25	0(4)	12	4	10
тест на H <sub>2</sub> S	0(25)	0(4)	0(12)	0(4)	0(10)
орнитин декарбоксилаза					
окраска по Грамму (-)	25	4	12	4	10
гемолитиз	18(7)	4	12	4	10

\*ацетил-метил карбинол; \*\*отрицательный результат

Среди 60 выделенных штаммов рода *Aeromonas* доминирующими являются виды *A. hydrophilla* и *A. sobria*. Виды *A. bestiarum* и *A. cavie* имеют среднюю частоту встречаемости. Вид *A. hydrophilla* вызывает глубокие язвы кожи, кровоизлияния в области плавников, воспаление глаз (рис. 1, 2).

Проведено тестирование 25 штаммов из рода *Aeromonas* на устойчивость к 16 антибиотикам. Исследованные штаммы относятся к подвижным видам вышеуказанного рода: *A. bestiarum*, *A. hydrophilla*, *A. cavie* и *A. sobria*. Результаты представлены в табл. 2.

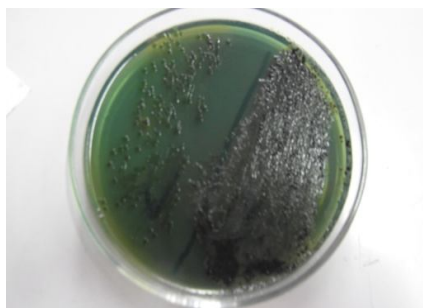


Рис.1 Язвы в области спинногоплавника на среде М 884. Возбудитель *A. hydrophila* и *A. sobria*

Рис.2 Вид *A. hydrophila*

Штаммы *A. hydrophila*, *A. cavie* и *A. sobria* устойчивы к тетрациклину, ампицилину и гентамицину, со средними значениями диаметров зон ингибирования от 8 мм до 10 мм. Указанные виды более чувствительны к офлоксацину и ципрофлоксацину. Для большинства штаммов вида *A. cavie* индекс множественной резистентности к антибиотикам превышал 0.4.

Таблица 2. Результаты по определению чувствительности/резистентности к антибиотикам, характерных бактерий из рода *Aeromonas*, изолированных из радужной форели.

(R- устойчивые; S-чувствительные; I-промежуточные).

Антибиотики	<i>A. hydrophila</i> (10)			<i>A. cavie</i> (6)			<i>A. sobria</i> (6)			<i>A. bestiarum</i> (3)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
амоксацилин 25	2	2	6	0	1	5	0	0	6	0	0	3
ампицилин 10	8	2	0	5	1	0	6	0	0	0	2	1
хлорамфеникол 30	6	1	3	0	0	6	0	2	4	0	0	3
эритромицин 15	1	1	8	0	1	5	0	0	6	0	0	3
гентамицин 10	6	2	2	3	1	2	4	2	0	3	0	0
канамицин 30	0	3	7	1	1	4	0	2	4	1	1	1
норфлоксацин 10	0	2	8	0	1	5	0	1	5	0	0	3
новобиоцин 30	0	5	5	0	0	6	0	0	6	0	0	3
оксацилин 1	0	2	8	0	0	6	0	0	6	0	0	3
пенициллин 6	4	1	5	1	1	4	2	0	4	0	1	2
рифампицин 5	3	1	6	0	0	6	0	0	6	0	0	3
стрептомицин 10	7	0	3	1	2	3	1	1	4	1	0	2
тетрацилин 30	7	1	2	4	1	1	5	1	0	3	0	0
офлоксацин 10	0	2	8	0	1	5	0	1	5	0	1	2
метицилин 10	3	2	5	0	3	3	1	1	4	0	2	1
ципрофлоксацин 30	0	1	9	0	0	6	0	0	6	0	0	3

Все гемолитические штаммы *A. hydrophilla* проявили высокую резистентность к гентамицину, амоксицилину, ампицилину, эритромицину, метицилину и хлорамфениколу. При этом индекс множественной резистентности (MAR) превысил 0.5.

Результаты исследования по устойчивости штаммов рода *Aeromonas*, изолированных из рыбоводческих хозяйств к антибиотикам, показали на высокую устойчивость изолированных штаммов к ампицилину. Превышение индекса множественной резистентности бактериальных штаммов, изолированных из рыбы, значения 0.2, указывает на высокое их содержание в водной среде, в которой она выращивается. Таким образом водная среда служит хорошей средой для их размножения и важным резервуаром для антибиотикорезистентных штаммов рода *Aeromonas*, представляющих серьезную угрозу для здоровья населения (Natha et al., 2005). Согласно Ehinmidu (2003) превышение значения индекса множественной антибиотикорезистентности штаммов бактерий 0.2 показывает, что источником таких штаммов являются фермы по выращиванию сельскохозяйственных животных.

Для определения степени патогенности выделенных штаммов из рода *Aeromonas*, исследована гемолитическая активность 57 штаммов, относящихся к видам: *A. hydrophilla*, *A. caviae* и *A. sobria*. 25 штаммов *A. hydrophilla* проявили высокую гемолитическую активность. Патогенность и токсигенность штаммов *Aeromonas hydrophila* обусловлены многочисленными факторами. Гемолитическая активность ( $\beta$  - гемолиз) штаммов указанного вида может служить индикатором их энтеротоксигенности (Rahim et al., 1984). Наши результаты подтвердили данные авторов относительно глубины поражений кожных покровов радужной форели, которые обычно сопровождаются поражениями внутренних органов, в подавляющем большинстве печени и почек, что связано с широким спектром токсического действия  $\beta$ -haemolysin (aerolysin), обладающего высокой гемолитической и протеолитической активностью (Aydin et al., 1997).

Таким образом, высокая частота встречаемости вида *Aeromonas hydrophila* в рыбоводческих хозяйствах Массиского

региона по выращиванию радужной форели, обладающего высокой гемолитической активностью, множественной антибиотикорезистентностью, является основанием для организации регулярного тестирования штаммов, возбудителей аэромонадных инфекций рыб, на чувствительность к антибиотикам, с целью правильного их использования.

Список литературы

1. Saavedra MJ, Guedes-Novais S, Alves A, Rema P, Tacao M, et al. (2004) Resistance To B-Lactam Antibiotics in *Aeromonas hydrophila* Isolated From Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Int Microbiol 7: 201-211.
2. Cipriano RC, Bullock GL, Pyle SW (2001) *Aeromonas hydrophila* and Motile Aeromonad Septicemias of Fish. Fish Disease Leaflet 68, US Department of the Interior Fish & Wildlife Service, Washington.
3. Austin B, Austin DA (2007) Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Fish, 4th Ed. Springer Praxis, Godalming.
4. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (2006) Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Information Supplement, M-100-S 16. CLSI: Wayne (PA).
5. Guz L, Kozinska A (2004) Antibiotic Susceptibility of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* Isolated From Farmed Carp (*Cyprinus carpio* L). Bull Vet Inst Pulawy 48: 391-395.
6. Kaskhedikar M, Chhabra, D (2010). Multiple Drug Resistance in *Aeromonas hydrophila* Isolates of Fish. Vet World 32: 76-77.
7. Orozova, P., V. Chikova and H. Najdenski, 2010. Antibiotic resistance of pathogenic for fish isolates of *Aeromonas spp.* Bulg. J. Agric. Sci., 16: 376-386
8. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007. M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
9. Burke, V., J. Robinson, J. Beaman, M. Gracey, M. Lesmana, R. Rockhill, P. Echeverria and J. M. Janda, 1983. Correlation of enterotoxicity with biotype in *Aeromonas spp.* J. Clin. Microbiol., 18: 1196-1200.
10. Jacobs, L., Hafizah Y Chenia, 2006. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas spp.* isolated from South African aquaculture systems. Int. J. Food.
11. Microbiol. Des., 13: 1717-3998.
12. Orozova, P, M. Barker, D. A. Austin and B. Austin, 2009. Identification and pathogenicity to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), of some aeromonads. Journal of Fish Diseases, 32 (10): 865-871(7).
13. Yucel, N., B. Aslim and Y. Beyatli, 2005. Prevalence and resistance to antibiotics for aeromonas species isolated from retail fish in Turkey. Journal of Food Quality, 28: 313-324.
14. Andréa Belém-Costa; José Eurico Possebon Cyrino Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)

and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), 2006. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), v.63, n.3, p.281-284.

15. Aoki, T.; Egusa, Sogata, Y.; Watanabe, T. Detection of resistance factors in fish pathogen *Aeromonas liquefaciens*. Journal of General Microbiology, v.65, p.343-349, 1971.

16. Pettibone, G.W.; Mear, J.P.; Sampsel, B.M. Incidence of antibiotic and metal resistance and plasmid carriage in *Aeromonas* isolated from brown nullhead (*Ictalurus nebulosus*). Letters in Applied Microbiology, v.23, p.234-240, 1996.

17. Holliman, A. The veterinary approach to trout. In: Brown, L. (Ed.). Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine. Oxford: Pergamon Press, 1993. cap.14, p.223-247.

18. Son, R.; Rusul, G.; Sahilah, A.M.; Zainuri, A.; Raha, A.R.; Salmah, I. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, *Telapia (Telapia mossambica)*. Letters in Applied Microbiology, v.24, p.479-482, 1997.

19. Vivekanandhan, G.; Savithamani, K.; Hatha, A.A.M.; Lakshmanaperumalsamy, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. International Journal of Food Microbiology, v.76, p.165-168, 2002.

20. Krumperman, P.H., 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Applied Environ. Microbiol 1983; 46: 165-170.

21. Midhusa Johny, Rathinasamy Subashkumar Phenotypic and Genotypic Discrimination of Multifactorial Virulent *Aeromonas hydrophila* in Clinical and Environmental Samples. European Journal of Academic Essays 1(8): 10-14, 2014.

22. Kummerer K (2009) Antibiotics in the Aquatic Environment -A Review- Part II. Chemosphere 75: 435-441.

23. Rahim Z, Sanyal SC, Aziz KMS, Huq MI, Chowdhury AA (1984) Isolation of Enterotoxigenic, Hemolytic and Antibiotic-Resistant *Aeromonas hydrophila* Strains From Infected Fish In Bangladesh. Appl Environ Microbiol 48: 865-867.

24. Aydın S, Çelebi S, Akyurt I (1997) Clinical, Hematological and Pathological Investigation of *Escherichia vulneris* In Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Pathology 32: 29-34.

25. Ehinmidu JO (2003) Antibiotics Susceptibility Patterns of Urine Bacterial Isolates in Zaria, Nigeria. Trop J Pharm Res 2: 223-28.

## **ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *AEROMONAS SPP.* ISOLATED FROM RAINBOW TROUT HARVESTED IN MASIS REGION OF ARMENIA**

Grigoryan K.M., Sargsyan M.P., Hovsepyan V.V., Badalyan G.N.,  
Ginovyan M.P.

*Aeromonas* spp. widely prevalent in water ecosystems used for freshwater aquaculture farming. The motile species of the mentioned genus cause hemorrhagic

sepsis and ulcers of fish thus adversely affect on economical conditions of aquaculture farms.

The main objective of the present work is to isolate, identify the *Aeromoas spp.* isolated from rainbow trout in Masis region of Armenia and to determine their antibiotic resistance.

The transport swabs (HiMedia MS 651) have been used for the sampling of ill fish. Isolation of *Aeromonas spp.* has been carried out on high selective agar media (M 884; M 1284 HiMedia Lab., India). Biochemical tests as well as rapid API 20E (Bashir et al., 2005) systems have been used for the identification. The antibiotic susceptibility of the isolated *Aeromonas* strains has been tested using 16 antibiotic discs in accordance with CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2007). Multiple antibiotic resistance index (MAR) has been calculated according to (Krumperman 1983). The hemolytic activity of the strains has been identified (Johny et al., 2014).

More than 60 strains of *Aeromonas* have been isolated from ill fish with symptoms of hemorrhagic sepsis. *A. hydrophyla*, *A. cavie*, *A. sobria*, *A. bestiarum* have been isolated from rainbow trout. *A. bestiarum*, *A. cavie* и *A. sobria* were resistant to tetracycline, ampicillin and gentamicin with average inhibition zones diameters from 8mm to 10mm. Mentioned species were more susceptible to ofloxacin and ciprofloxacin. The multiple antibiotic resistance index of *A. cavie* were more than 0.4. All hemolytic strains of *A. hydrophyla* possessed high resistance to gentamycin, amoxicillin, ampicillin, erythromycin, meticyllin и chloramphenicol.

## ПАТОЛОГО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ФЛЕКСИБАКТЕРИОЗЕ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Л.И. Грищенко, Э.Л. Елеев

Московская государственная академия ветеринарной медицины  
и биотехнологии имени К.И.Скрябина. Москва, Россия, e-mail:

[ihtipatolog@mail.ru](mailto:ihtipatolog@mail.ru), [ruel@bk.ru](mailto:ruel@bk.ru)

Миксобактериоз – сборное название широко распространенного заболевания пресноводных рыб, выращиваемых в условиях индустриальной аквакультуры. Особенно существенный ущерб оно наносит форелеводству и осетроводству. Установлено, что возбудителями болезни являются бактерии родов *Flexibacter* и *Citophaga*, которые обладают умеренными патогенными свойствами, поражают в основном жабры и кожный покров рыб. В связи с этим различают две формы проявления болезни – флексибактериоз, наблюдаемый в теплое время года при температуре воды выше 17°C и



поражающий в основном кожу, и холодноводную жаберную форму миксобактериоз. Возникновению болезни способствуют неблагоприятные условия среды, в частности, сильное органическое загрязнение и высокая бактериальная обсемененность воды. Нередко флексибактериоз осложняет течение и проявление других болезней, например, герпесвирусной инфекции осетровых (Щелкунов И.С. и др., 2007; Щелкунов А.И., 2010). Симптоматика и диагностика болезни достаточно полно описаны в литературе. Однако патоморфология и патогенез болезни изучены недостаточно, что препятствует более обоснованному определению ее нозологической принадлежности.

Материал собран в неблагополучных по флексибактериозу осетровых рыбоводных хозяйствах Пермской, Рязанской и Тверской области. Диагноз на флексибактериоз ставили на основании данных эпизоотологического обследования стада осетровых, микроскопических и бактериологических исследований, клинических признаков и патолого-анатомических изменений. Патматериал для гистологических исследований собран от 20 сеголеток сибирского осетра, фиксирован в 10% -м растворе нейтрального формалина, парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином, а нативные мазки с пораженных участков кожи синькой Лефлера в разведении 1:10. Установлено, что при окраске разбавленной синькой Лефлера миксобактерии не теряют подвижности и лучше выявляются в нативных препаратах.

Во всех обследованных хозяйствах вспышки флексибактериоза отмечали среди мальков и сеголеток сибирского осетра массой 1-2 г и выше в мае-июне при температуре воды 20-22°C. Заболеваемость в разных хозяйствах достигала 30-50% и сопровождалась массовой гибелью рыб. При понижении температуры наблюдали постепенное затухание болезни, заболеваемость и гибель снижались до 1-2%. В мазках-отпечатках с пораженных участков тела рыб микроскопически обнаруживали скопления флексибактерий, совершавших характерные скользящие движения. При бактериологическом исследовании, кроме них, из внутренних органов нередко выделяли условно патогенные бактерии родов *Aeromonas*,

*Enterobakter, Plesiomonas* и др., которые осложняли течение флексибактериоза.

Заболевание проявлялось вначале в виде острой вспышки с ярко выраженными клинико-анатомическими признаками, затем переходило в подострую стадию с постепенным снижением отхода рыб и ослаблением степени выраженности симптомов болезни.

В начальных стадиях болезни в одних случаях преобладали пятнистые кровоизлияния в основании жучек и образование трещин на их верхушках, в других более выражены очаговые побледнения кожи в области спинного плавника (серое седло) или хвостового стебля. В более поздних стадиях процесс осложнялся разрастом грибка сапролегнии и образованием язв (рис. 1).



Рис 1. Язва на боковой поверхности (вверху), трещина в спинной жучке (внизу)

При вскрытии в брюшной полости нередко обнаруживали повышенное содержание серозной жидкости, побледнение или гиперемии печени. Кровь обычно водянистая, желудок и кишечник запустевшие, слизистые оболочки без видимых изменений.

Основные микроскопические изменения также были сосредоточены в коже и скелетной мускулатуре. В начальных стадиях на фоне набухания слизистых клеток обнаруживали очаговую десквамацию эпидермиса на плавниках и разных участках кожи. В случаях более тяжелого течения болезни ярко

выражен дермато-миозит, который проявлялся застойной гиперемией, диапедезными кровоизлияниями, отеком, клеточной инфильтрацией подкожной клетчатки и межмышечной соединительной ткани, диссоциацией мышечных пучков, десквамацией эпидермиса и очаговым некрозом кожи, образованием язв рис 2.

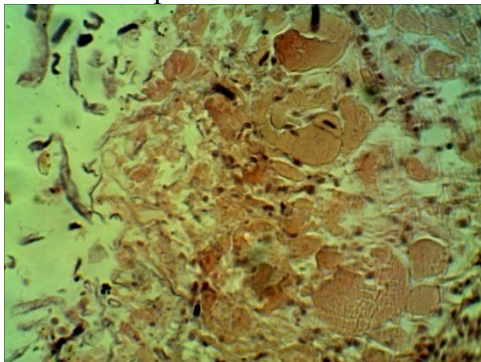


Рис 2. Дерматомиозит, десквамация эпидермиса. Окраска Г-Э. х400

В очагах воспаления обнаруживаются скопления флексибактерий, а при осложнении сапролегниозом гифы грибка сапролегния (рис 3). В печени обнаруживали очаговую застойную гиперимию в синусоидах, зернистую и вакуольную дистрофию гепатоцитов. Она выражалась сглаживанием структуры печёночных клеток, скоплением в цитоплазме зернистых белковых масс, вакуолизацией цитоплазмы, деформацией ядер, в отдельных местах кариопикнозом и плазмоцитозом.

В почках отмечены явления отёка паренхимы, просвет мочевых канальцев заполнен зернистыми массами слизи, в отдельных канальцах кариопикноз в эпителии. Гемопозитическая ткань в состоянии гиперплазии. Селезёнка не увеличена, в паренхиме увеличены в размере островки лимфоидной ткани. Микроструктура сердца, желудка, кишечника и поджелудочной железы без существенных изменений.



Рис.3. Очаги некроза на хвостовом стебле, осложненные сапролегниозом.

Проведённые исследования показали что при флексибактериозе ведущее место занимает серозно-гемаррагический некротизирующий дермато-миозит, который вызван не только флексибактериями, но и грибом сапролегния, осложняющем течение болезни. В результате дессиминации флексибактерий в другие органы, а также осложнение другой условно патогенной микрофлорой она принимает генерализованную форму, с поражением печени, почек и других органов.

В целом, клинико-анатомическая картина при флексибактериозе достаточно характерна. Однако, учитывая, что он часто проявляется как осложнение других болезней в частности герпесвирусной инфекцией, при диагностике следует его дифференцировать по клинико-анатомическим признакам, бактериологическим исследованиям. При подозрении на смешанную инфекцию дополнительно проводить вирусологические исследования на герпесвирусную инфекцию.

Литература.

1. Щелкунов И.С. Герпесвирусная болезнь осетровых рыб в России. / И.С. Щелкунов, Т.И. Щелкунова, Щелкунов, А.И. Колбасова, Ю.П. Диденко, А.Ф. Быковский // Российский ветеринарный журнал СХЖ. 2007. №1. С. 10–12.
2. Щелкунов А.И. Герпесвирусная болезнь сибирского осетра. / А.И. Щелкунов, И.С. Щелкунов // Ветеринария. 2010. №1 С. 18-21.

#### **POST-MORTEN AND HISTOPATOLOGICAL CHANGES IN A STURGEON FISHES UNDER FLEKSIBAKTERIAL INFECTION**

Grishenko L.I., Eleev E.L.

The result of the researches into the symptoms, post-mortem and histopathological changes in a sturgeon fishes under fleksibacterial infection are given in the article.

## **ИЗМЕНЕНИЯ ПАРАЗИТОФАУНЫ ПЛОТВЫ (*RUTILUS RUTILUS* L. 1758) НЕВСКОЙ ГУБЫ ФИНСКОГО ЗАЛИВА ПОД ВЛИЯНИЕМ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ ЗА ДЛИТЕЛЬНЫЙ ПЕРИОД НАБЛЮДЕНИЙ**

А.С. Дудин,<sup>1</sup> Н.Б. Чернышѐва,<sup>1</sup> Б.С. Шульман<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Государственный научно-исследовательский институт озерного и речного рыбного хозяйства, 199053, Санкт-Петербург, наб. Макарова д.26, Россия, [alexander.s.dudin@gmail.com](mailto:alexander.s.dudin@gmail.com)*

<sup>2</sup>*Зоологический институт РАН, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д.1, Россия.*

Финский залив Балтийского моря является крупнейшим рыбохозяйственным водоемом Северо-Запада России. Невская губа, находящаяся в его восточной части представляет особый интерес для исследований. В первую очередь, из-за столкновений в ней фаунистических элементов пресноводного и морского происхождения, также не маловажным фактором является и колоссальная антропогенная нагрузка, которую испытывает акватория в силу близости нахождения к ней такого крупного промышленного центра, как Санкт Петербург, а также других населенных пунктов находящихся в непосредственной близости к Невской губе. К перечисленным выше факторам следует добавить сооружение и ввод в эксплуатацию Комплекса Защитных Сооружений Санкт Петербурга от наводнений и осуществляемый в настоящее время намыв территорий. Появление в конце XX века системы дамб и пропускных сооружений в восточной части Невской губы существенным образом отразилось на экосистеме водоема. И если изменения, произошедшие с ихтиофауной, подвергались детальному рассмотрению (Кудерский, 2013), то состояние паразитофауны рыб оказалось освещенным не в должном объеме. Целью данной работы является обобщение и анализ данных по зараженности наиболее массового вида рыб

обитающего в Невской губе Финского залива – плотвы, за период с 30-х годов XX века по настоящее время.

Первые масштабные исследования паразитофауны рыб Финского залива были начаты в 1929 году сотрудниками лаборатории болезней рыб Ленинградского научно-исследовательского ихтиологического института (Догель, Петрушевский, 1933). Методом полного паразитологического вскрытия авторами было исследовано 328 экземпляров рыб, принадлежащих к 29 видам. У 25 исследованных экземпляров плотвы, авторами был выявлен 21 вид паразитов. Наиболее представительной группой оказались миксоспоридии и трематоды (5 и 6 видов соответственно). Остальные группы были представлены лишь одним или несколькими видами.

Спустя четверть века подобные исследования были повторены (У Бао Хуа, 1961). Автором было исследовано 206 экземпляров рыб принадлежащих к 12 видам, из которых у 17 экземпляров плотвы было выделено 22 вида паразитов. Изменения, отмечаемые при сравнении данных двух исследований, в первую очередь, отражают те подвижки, которые произошли в систематике за прошедшие между исследованиями годы. Так, например, *Allocreadium dogieli* отмечаемый в более поздних исследованиях, в работе 1933 года был определен как *A. isoporum*, тоже можно и сказать про *Caryophyllaeides fennica* цестоды, которая в ранних исследованиях фигурирует как *Caryophyllaeides laticeps*. В целом можно отметить, что за прошедшие четверть века не произошло сколь либо существенных изменений в структуре паразитофауны плотвы. Незначительные увеличения или уменьшения экстенсивности инвазии той или иной группой паразитов можно связать исключительно с сезонной динамикой и разностью в погодноклиматических условиях в моменты наблюдения.

Дальнейшие исследования были проведены лишь в конце 1990-х годов (Петрова 1999, 2000). Работа была направлена на изучение паразитофауны плотвы и окуня из разных участков Невской губы. За 3 года исследований было подвергнуто полному или же частичному паразитологическому вскрытию 210 экземпляров плотвы, у которой было обнаружено 28 видов

паразитических организмов, причем 15 из них были впервые отмечены для Финского залива. Превалирующими группами оказались миксоспоридии и моногенеи по 9 видов и трематоды, представленные 4 видами. Как следствие, значительные изменения отмечены на примере этих групп. В первую очередь, автор обращает внимание на пять видов миксоспоридий не отмеченных ранее, связывая это с усилением эвтрофикации водоема, что повлекло за собой увеличение числа олигохет - промежуточных хозяев миксоспоридий. Увеличение видового разнообразия моногеней рода *Dactylogyrus*, а так же экстенсивности инвазии ими рыб так же полностью согласуется с основными тенденциями изменения паразитофауны происходящими из-за усиления эвтрофикационных процессов. Этим же и объясняется возрастание зараженности рыб метацеркариями трематод - паразитами активно инвазирующими хозяина и заканчивающими свой цикл развития в рыбадных птицах. Помимо этого отмечено, что высокоустойчивые к токсикантам метацеркарии рода *Diplostomum*, паразитирующие в глазах рыб и метацеркарии трематод рода *Ichthyocotylurus* внутренних органов рыб значительно сильнее заражают рыб.

С 2010 лабораторией болезней рыб ФГБНУ ГосНИОРХ возобновлено проведение мониторинговых исследований паразитофауны рыб Финского залива. Отбор материала производится на нескольких основных рыбопромысловых участках в период навигации с апреля по октябрь. За четыре года было исследовано более 300 экземпляров плотвы, у которых отмечено 39 видов паразитов, относящимся к восьми систематическим группам. Из них наиболее многочисленными группами оказались миксоспоридии (10 видов), а также трематоды и моногенеи (по 9 видов). Остальные группы оказались не столь представительны. Так скребни и нематоды представлены тремя видами (*Acanthacephalus lucii*, *Neoechinorhynchus rutili*, *Pseudoechinorhynchus sp.* и *Capillaria brevispicula*, *Raphidascaris acus*, *Nematoda sp. 1* соответственно), паразитические рачки (*Ergasilus sieboldi*, *E. briani*) и глохидии (родов *Anodonta u Unio*) – двумя видами, цестоды – одним видом (*Caryophyllaeides laticeps*). Сравнивая собственные результаты с

литературными данными, можно отметить значительное качественное и количественное увеличение зараженности плотвы миксоспоридиями, моногенеями и трематодами, что, по всей видимости, связано с изменениями в современной таксономии и подходу к видовой диагностике паразитов. Следует отметить, что, по меньшей мере, 4 вида миксоспоридий (*Myxobolus diversicapsularis*, *M. fundamentalis*, *M. sommervillae* и *M. feisti*) были дифференцированы благодаря использованию сведений о гистотропизме некоторых видов миксоспоридий (Molnar et al., 2010). Так же была отмечена довольно высокая зараженность плотвы моногенеями, для некоторых видов она достигала 72,8% при относительно высокой интенсивности инвазии. Особое внимание в наших исследованиях было уделено изучению фауны трематод плотвы. Из 10 обнаруженных видов трематод 2 вида (*Sphaerostoma bramae*, *Phylodistomum angulatum* заражает плотву при её питании. Остальные виды представлены метацеркариями родов *Vucephalus*, *Diplostomum*, *Paracoenogonimus*, *Posthodiplostomum*, *Rhytidocotyle*, *Tylodelphys*, которые приобретаются рыбой в результате активного проникновения церкарий через покровы. Следует отметить практически абсолютную зараженность мускулатуры плотвы метацеркариями *Paracoenogonimus ovatus*, по всей видимости, это можно связать с широким распространением брюхоногого моллюска *Viviparus viviparus*. Впервые этот паразит был отмечен в Финском заливе в 1999 году (Voronin et al., 2000). Тем не менее, обнаружение и точная видовая диагностика этого паразита имеет принципиальное значение, это связано со схожестью метацеркариев этой трематоды с метацеркарией *Opisthorchis felineus*, паразитирующей в желчных протоках теплокровных, и, что особенно важно, человека.

Так же был отмечен еще один вид трематод ранее не описанный для Финского залива, возбудитель чернопятнистого заболевания - *Posthodiplostomum cuticola*, зараженность им колебалась в пределах от 7,1 до 36 %. Распространение этого вида за пределы своего ареала, находящегося значительно южнее Финского залива, а именно в низовьях Волги, по всей видимости, можно связать с миграцией окончательного хозяина этой



трематоды – цапли. В целом, значительное увеличение зараженности плотвы в настоящее время метацеркариями различных видов трематод указывает на большое количество моллюсков в придонной фауне.

Что касается зараженности плотвы цестодами, то она практически не претерпела изменений. С увеличением в рационе плотвы некоторых ракообразных, в частности водяного ослика *Asellus aquaticus* и бокоплавов, можно связать и увеличение ее зараженности скребнями. Общая тенденция в снижении, как видového разнообразия, так и экстенсивности инвазии отмечается на примере паразитических ракообразных. Для двух отмеченных в исследованиях видов *Ergasilus sieboldi* и *E. briani* определена зараженность на уровне 6,6% при минимальном значении интенсивности. Судя по полученным данным, зараженность плотвы глосидиями не претерпела сколь либо существенных изменений с момента первых изучений паразитофауны. Отмечена сезонная динамика зараженности глосидиями родов *Anodonta* и рода *Unia*. Максимальных значений (89%) зараженность достигала в весенне-летний период, постепенно снижаясь до полного исчезновения в связи с переходом моллюсков в свободноживущую стадию.

Анализируя литературные сведения и данные собственных исследований можно утверждать, что произошел ряд серьезных изменений в составе и структуре паразитофауны плотвы. В первую очередь эти изменения связаны с наличием существенного антропогенного воздействия на акваторию. Загрязнение вод Невской губы Финского залива промышленными сбросами отразилось сокращением численности или же полным исчезновением паразитов чувствительных к токсическому воздействию, таким как паразитические рачки. Общие тенденции изменения паразитофауны плотвы наглядно демонстрируют усиление процессов эвтрофикации, происходящих в водоеме. Увеличение зараженности плотвы микроспоридиями является следствием повышения трофности водоема, что способствует увеличению численности олигохет - промежуточных хозяев микроспоридий. В пользу усиления эвтрофикационных процессов говорит и увеличение видového разнообразия и общей

численности дактилогирид и личиночных стадий трематод, инвазирующих плотву. Так же следует отметить появление в северных широтах трематоды *Posthodiplostomum cuticola*, что очевидно связано с глобальными климатическими изменениями.

В настоящее время паразитофауна плотвы Невской губы Финского залива находится на этапе своего переформирования, но уже сейчас можно наблюдать основные маршруты ее изменения, такие как: сокращение разнообразия узкоспецифичных видов, в первую очередь, паразитов арктического пресноводного комплекса; увеличение, в следствии эвтрофикации водоема, удельного веса микроспоридий, моногеней, а также видов активно инвазирующих хозяина.

#### Список литературы

Догель В.А., Петрушевский Г.К. 1933. Паразитофауна рыб Невской губы // Тр. Ленинградского общ. естествоиспытателей, вып. 3, т. 62, Л.: с. 366-434.

Кудерский Л.А. Состояние рыбного населения в восточной части Финского залива в 1946-2009 гг. в связи с природными и антропогенными факторами. // Избранные труды. Исследования по ихтиологии, рыбному хозяйству и смежным дисциплинам. 2013. т. 3. КМК. С. 57-79.

Петрова В.В. Изменение паразитофауны некоторых промысловых рыб Финского залива за длительный промежуток времени в условиях антропогенного воздействия // Диссертация на соискание учёной степени к.б.н., СПб.: 2000. 140 с.

У. Бао-хуа. Об изменении паразитофауны рыб Невской губы за четверть века // Вестник Ленингр. Университета, № 21, вып. 4, серия биологии, Л.: 1961. С. 62-72.

Voronin V. Kudenzova R., Strelkov Y., Chernyshova N., Golubeva E., Zhokov A., Safronov M., Fetisov V. 2000. Distribution of *Paracoenogonimus ovatus* Katsurada, 1914 in Fishes of Russia. Bull. Scandinavian society for parasitology. // Proc. Symposium "Ecological Parasitol. on the turn of Milienium". S.-Petersburg 2000, vol. 10. № 2 P. 112.

Molnar K, Marton S, Szekely C, Eszterbauer E. Differentiation of *Myxobolus* spp. (Myxozoa: Myxobolidae) infecting roach (*Rutilus rutilus*) in Hungary // Parasitol Res. 2010. vol. 107. № 5. P. 1137-1150.

### **THE INFLUENCE OF ANTHROPOGENIC FACTORS ON CHANGING OA PARASITOFUNA OF ROACH (*RUTILUS RUTILUS* L. 1758) IN NEVA BAY OF THE GULF OF FINLAND FOR A LONG PERIOD OF OBSERVATION**

Dudin A.S., Chernysheva N.B., Shulman B.S.

Presents data on changes occurring in the parasitofauna roach over a long period of research. under the influence of anthropogenic factors. In study shows the increase number of some species of parasites myxosporea, monogenea and trematoda.

## **ПРОФИЛАКТИКА ЭКТОПАРАЗИТАРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПРИ ТРАНСПОРТИРОВКАХ РЫБ**

В.Г. Енгашев, М.Н. Гончарова

*Московская ветеринарная ихтиоклиника при  
ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия, e-mail:*

*[mgoncharova@vetmag.ru](mailto:mgoncharova@vetmag.ru)*

К обязательным технологическим операциям в рыбоводстве относится профилактическая обработка рыб, которую проводят при их сезонных пересадках и перевозках. Данное мероприятие приводит к значительному снижению поражения рыб эктопаразитами и препятствует распространению инвазионных и инфекционных заболеваний.

При этом наиболее мало затратным методом является обработка рыб обеззараживающими средствами в транспортной емкости. Она позволяет значительно облегчить профилактическую обработку рыб в период массовых пересадок и перевозок. Такая обработка способствует уничтожению эктопаразитов и других патогенов на рыбах, в воде, в которой они перевозятся, и на внутренних поверхностях транспортных емкостей. Поэтому в своей работе мы попытались изыскать обеззараживающее средство с широким спектром действия и высокой активностью против эктопаразитов и других патогенов, использование, которого встраивалось бы в существующую технологию перевозки рыб.

В качестве исходного обеззараживающего средства был использован формалин. Известно, что формальдегид при температурах воды от 1°C и выше губительно действует на микроорганизмы, грибы, вирусы, паразитов, их личинки, цисты и яйца. Ранее его успешно применяли при ихтиободозе, хилодонеллезе, триходинозе, апиозомозе карповых рыб (Власенко, Мещерякова, 1977), ихтиободозе и трихофриозе лососевых (Hoffman, Mayer, 1974; Куденцова, Соломатова, 1978).

Высокая эффективность формалина была показана при моногенеозах (Бауер и др., 1981). Положительные результаты получены от его использования при лернеозе (Herwig, 1984). Однако длительное применение формалина в дозах и экспозициях, указанных в Инструкциях о мероприятиях по борьбе с эктопаразитарными болезнями рыб в рыбоводных хозяйствах, привело к повышению устойчивости паразитических простейших и моногеней к этому средству. Во время испытаний было выявлено, что летальная токсичность обычного формалина для паразитов рыб равна или близка к таковой и для самих рыб. Поэтому нами были испытаны более высокие дозы разработанного нами формалина малотоксичного («Формалин МТ»), уничтожающего паразитов в воде, на внутренних поверхностях транспортных емкостей и на рыбах.

Целью нашей работы явилось изучение токсичности и антипаразитарной активности дезинфицирующего средства Формалин МТ. Работу проводили в ЗАО «Рыбхоз Клинский» с сентября по январь на сеголетках карпа средней массой 20–25 г. Во время опытов растворы дезинфектанта, в которые помещали рыб, постоянно аэрировались при помощи компрессоров. Гидрохимические показатели соответствовали рыбоводным нормативам. Соотношение рыбы и воды во время обработок составляло 1:4.

Токсичность Формалина МТ испытывали при температуре воды 2,4°C–13°C. После обработок в растворах с различными концентрациями рыб пересаживали в чистую проточную воду и наблюдали за ними в течение 1–3 суток.

Антипаразитарную активность Формалина МТ в кратковременных ваннах испытывали при температуре воды 2,4°C–12°C в ваннах длительного действия - при температуре воды 1°C–8,6°C.

В ходе испытания токсичности была выявлена зависимость степени токсичности от концентрации растворов и температуры воды, а также установлены минимальные летальные концентрации Формалина МТ (табл. 1).

При снижении концентрации дезинфектанта и температуры воды увеличивается безопасная для рыб экспозиция обработки.

Таблица 1. Минимальные летальные концентрации Формалина МТ для сеголеток карпа

Доза, мл/л	3,0	2,0	2,0	1,5	1,25	1,2 5	1,2 5	1, 0	1, 0	1, 0	1,0	0, 7	0,6	0,5
Экспозиция, мин.	<1 5	<20	>25	30	>40	60	100	55	70	75	>7 5	75	>8 0	>12 5
t воды, °C	10, 8	12,0	9,8	9,6	9,6	5,5	2,4	13	9, 6	5, 5	2,4	9, 6	2,4	11,2

Перед каждой серией опытов проводили микроскопическое исследование сеголеток карпа на наличие эктопаразитов (контрольные группы) по общепринятой методике. В соскобах с поверхности тела обнаружены инфузории рода *Apiosoma*, интенсивность инвазии (ИИ) – 1–30 экз., единичные моногенетические сосальщики рода *Gyrodactylus*. В жабрах и на поверхности тела у некоторых рыб обнаружены единичные инцистированные и не инцистированные инфузории рода *Ichthyophthirius*, инфузории рода *Trichodina*, ИИ – 1–3 экз. в поле зрения микроскопа.

У всех рыб в жабрах обнаружены моногенетические сосальщики *Dactylogyrus extensus*. Экстенсивность инвазии (ЭИ) по зараженности дактилогирусами с июля по декабрь составляла 100%. Причем средняя интенсивность инвазии увеличивалась по мере роста рыб до осеннего облова, а затем при дальнейшем понижении температуры воды в осенний период. В июле у сеголеток массой 5,7 г этот показатель находился на уровне 23,3 экз., к октябрю-ноябрю у сеголеток массой 20–25 г он достиг максимума и составил 109,6–182,8 экз. Полученные данные согласуются с литературными сведениями о приверженности *D. extensus* к низким температурам (Бауер, 1959; Prost, 1963). К январю интенсивность инвазии снизилась до 17,8 экз., а экстенсивность инвазии – до 90%.

После обработок с использованием разных доз и экспозиций опытные группы рыб по 10 экз. в каждой в садках помещали в

проточную воду и через 3–5 суток проводили паразитологическое исследование. На основании интенсивности и экстенсивности инвазии определяли интенс- (ИЭ) и экстенсэффektivность (ЭЭ) при дактилогирозе карпов.

После обработок опытных рыб Формалином МТ в дозах 1,25 мл/л–30 мин., 1 мл/л–45 мин. (t воды 5–6°C); 1 мл/20 л–24 ч., 48 ч. (t воды 1–2°C) провели исследование на наличие паразитических простейших. В соскобах с поверхности тела и в жабрах только у некоторых рыб обнаружены лишь единичные инфузории родов *Apiosoma* и *Ichthyophthirius*.

По результатам антипаразитарных обработок Формалином МТ в кратковременных ваннах при дактилогирозе можно проследить зависимость его активности от экспозиции и температуры воды (табл. 2). Несмотря на высокую концентрацию (2–3 мл/л) при 5-ти минутных экспозициях дезинфектант показал низкую активность – интенсэффektivность в среднем составила 56,6%.

Таблица 2. Антипаразитарная активность Формалина МТ в кратковременных ваннах при дактилогирозе карпов

Концентрация, мл/л	Экспозиция, мин.	t воды	Интенсэффektivность (ИЭ), %
3	5	8 – 10,8°C	63,5
2	5	12°C	49,7
1,5	15	8,8 – 9,6°C	74,05
1,25	30	5 – 9,6°C	90,1
1,25	30	2,4°C	34,8
1,2	30	4 - 6°C	93,0
1,0	30	11,2°C	79,7
1,0	30	5 - 7°C	73,0
1,0	45	5 – 9,6°C	93,03
1,0	45	2,4°C	57,2
0,7	60	7,6 – 9,6°C	95,3
0,6	60	2,4°C	50,0
0,5	60	8 – 11,2°C	90,6

При снижении концентрации до 1,2 мл/л и при увеличении экспозиции до 30 минут происходило увеличение его эффektivности (до 93%), при этом температура находилась в пределах 4–9,6°C. Дальнейшее понижение концентрации до 1,0

мл/л при той же экспозиции и температуре приводило к некоторому снижению эффективности (73,0-79,6%).

При испытании Формалина МТ в дозе 1 мл/л в течение 45 минут при температуре 5°C–9,6°C эффективность оказалась на максимальном уровне, как и при концентрациях 0,5–0,7 мл/л в 60-ти минутной экспозиции (90,6–95,3%).

На основании представленных данных, можно заключить, что оптимальной для обработки рыб в кратковременных ваннах является температура 4-9°C, поскольку уже при 2,4°C происходит значительное снижение эффективности дезинфектанта.

Также были проведены антипаразитарные обработки Формалином МТ в ваннах длительного действия при дактилогирозе карпов (табл. 3).

При повышении температуры воды с 1-2°C до 8,6°C наибольшее увеличение эффективности Формалина МТ (до 100 %) происходило при 48-ми часовой экспозиции.

При дактилогирозе карпов в условиях низких температур (1-2°C и 8,6°C) наиболее эффективными оказались ванны длительного действия (24–48 часов).

Таблица 3. Антипаразитарная активность Формалина МТ в ваннах длительного действия при дактилогирозе карпов

Концентрация, мл/л	Экспозиция, ч.	t воды	Интенс-эффективность (ИЭ), %	Экстенс-эффективность (ЭЭ), %
1мл/20 л	24	8,6°C	92,3	86,7
1мл/20 л	48	8,6°C	100	100
1мл/20 л	24	1-2°C	84	10
1мл/20 л	48	1 - 2°C	95	45

Таким образом, исследуемый дезинфектант продемонстрировал высокую активность в отношении эктопаразитов рыб (простейших и моногеней).

Наиболее безопасной и эффективной является концентрация Формалина МТ 1 мл/л при экспозиции 30-45 минут и температуре воды 4–12°C, что позволяет рекомендовать его применение с профилактической целью в условиях рыбоводных хозяйств во время транспортировок рыбопосадочного материала товарных

рыб между различными категориями прудов в осенне-весенний период.

Методом долговременных ванн рыбопосадочный материал с профилактической и лечебной целью можно обрабатывать и при более низких температурах (1–9°C) в бассейнах, при длительных перевозках или непосредственно в приспущенных зимовальных прудах. Для этого препарат нужно равномерно вносить по всей поверхности, создавая концентрацию 1 мл на 20–25 л воды и выдерживая экспозицию при аэрации и закрытом притоке воды 24–48 часов.

#### Список литературы

1. Бауер О.Н. Экология паразитов пресноводных рыб. Известия ГосНИОРХа, 1959, т. 49, с. 5–206.
2. Бауер О.Н., Мусселиус В.А., Стрелков Ю.А. Болезни прудовых рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. 320 с.
3. Власенко М.И., Мещерякова А.А. Формалин в борьбе с наружными паразитами рыб. Ветеринария, 1977, № 4, с. 75–78.
4. Куденцова Р.А., Соломатова В.П. Новые заболевания при индустриальных методах выращивания. Экспресс-информация ЦНИИТЭИРХа. Серия Рыбохозяйственное использование внутренних водоемов. 1978, вып. 10, с. 1–5.
5. Handbook of drugs and chemicals used in the treatment of fish diseases. Nelson Herwig: Springfield Illinois USA, 1984. 207p.
6. Hoffman G., Mayer F. Parasites of Freshwater Fishes a review of their control and treatment. Tropical fish Hobbeist Publications. Neptune, New Jersey, 1974. 224 p.
7. Prost M. Investigation on the development and pathogenicity of *Dactylogyrus anchoratus* (Duj. 1845) and *D. extensus* Mueller et Van Cleave, 1932 for breeding carps. Acta parasitologica polonica, 1963, v. p. 17–47.

#### **PREVENTION ECTOPARASITICAL FISH DISEASES SHIPPING**

Engashev V.G., Goncharova M.N.

It is considered toxic and antiparasitic properties disinfectant Formalin MT. Identified its optimum concentration and exposure dactylogyrosis carp fingerlings in baths short and long term action under different temperature conditions.



## **ПАЗАРТЫ ПРМЫСЛОВЫХ ВДОВ РЫБ КАМЧАТКИ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ТОВАРНМЕ КАЧЕСТВО ПРОДУКЦИИ**

К.В. Козлов, Е.А. Грицких

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Камчатский научно-исследовательский институт  
рыбного хозяйства и океанографии»,  
Петропавловск-Камчатский, Россия, e-mail:  
Kozlov.k.v@kamniro.ru*

С 2011 по 2014 г. проводили исследования в рамках государственного мониторинга качества и безопасности водных биологических ресурсов (ВБР) в восточной части Охотского моря (Камчатско-Курильская подзона), западной части Берингова моря (Петропавловско-Командорская подзона), водах Тихого океана (Карагинская подзона) и внутренних пресноводных водоемах Камчатского края.

На наличие паразитов методом неполного паразитологического вскрытия обследовали 15 видов рыб (сельдь тихоокеанская, зубастая и малоротая корюшки, двухлинейная, желтоперая, палтусовидная, сахалинская и четырехбугорчатая камбалы, минтай, треска, навага, нерка, кета, горбуша и кижуч). Отбирали по 15 экз. каждого вида.

Всего обследовали 1170 экз. промысловых видов ВБР, из них: 615 — в Карагинской, 315 — в Петропавловско-Командорской и 240 — в Камчатско-Курильской подзонах. Обследовали поверхность и полость тела рыб. Мускулатуру рыб изучали методом параллельных разрезов, который является самым распространенным и позволяет сравнительно быстро обследовать мясо рыб крупной и средней величины (СанПиН 2.3.2.1078-01). Видовую принадлежность паразитов устанавливали с помощью определителей (Бауер 1987; Fagerholm, 1982; Guide to the parasites, 1989).

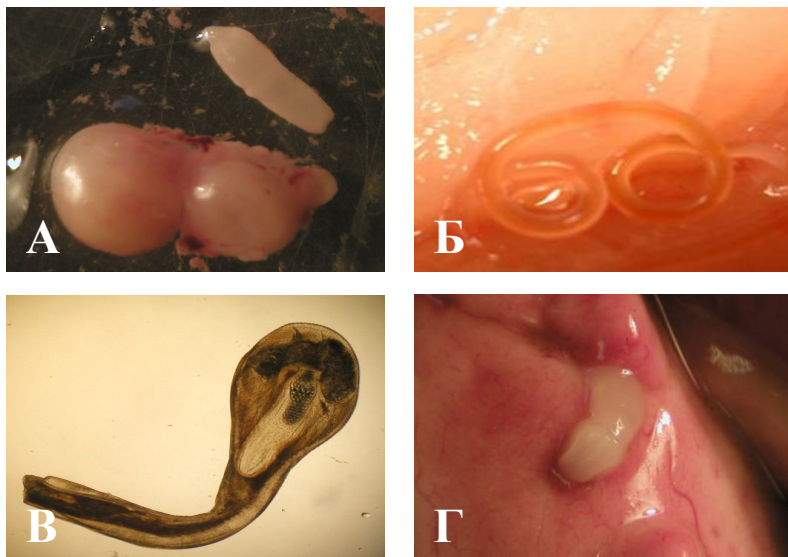


Рисунок 1. Паразиты, потенциально опасные для человека и теплокровных животных, выявленные у промысловых рыб Камчатки: А - личинка цестоды *Diphyllobotrium*; Б - личинка нематоды *Anisakis* sp.; В - личинка цестоды *N. surmenicola*; Г - скребень *C. Strumosum*.

В результате исследований обнаружили 5 видов гельминтов, потенциально опасных для человека и теплокровных животных; личиночные стадии цестод рода *Diphyllobotrium* (рис. 1А), личинок нематод *Anisakis* sp. (рис. 1Б) и скребней *Corynosoma strumosum* (рис. 1В). Данные паразиты вызывают токсико-аллергическое отравление организма, повреждения слизистой оболочки и нарушают функции желудка и других органов пищеварительного тракта (Гаевская, 2005). Цестода *Nybelinia surmenicola* (рис. 1Г) и метацеркарии трематод *Stephanostomum* sp. влияют на товарное качество рыбной продукции, т.е. портят внешний вид (СанПиН 2.3.2.1078-01).

У рыб из Карагинской подзоны регистрировали личинок нематод *Anisakis* sp. в полости тела, на печени и мышцах. Больше всего личинками нематод были заражены минтай, треска, навага и сельдь. Высокие показатели зараженности цестодами *Diphyllobotrium* sp. отмечали у малоротой корюшки, трески и минтая, *N. surmenicola* - у двухлинейной и палтусовидной камбал, трески и минтая. Скребней *C. strumosum* выявили у двухлинейной

и желтоперой камбал, минтая, трески и наваги. Трематод *Stephanostomum* sp., обнаружили в мышцах у двухлинейной и палтусовидной камбал (табл. 1). Все перечисленные виды паразитов являлись массовыми у обследованных видов рыб.

Таблица 1. Встречаемость паразитов, опасных для здоровья человека и теплокровных животных, а также портящих товарное качество рыбной продукции, у рыб в Карагинской подзоне с 2011 по 2014 гг., %

	2011			2012	2013					2014	
	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Nybelinia surmenicola</i>	<i>Corynosoma strumosum</i>	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Diphyllobotrium</i> sp.	<i>Nybelinia surmenicola</i>	<i>Stephanostomum</i> sp.	<i>Corynosoma strumosum</i>	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Stephanostomum</i> sp.
Сельдь тихоокеанская	100	-	-	86,6	93,3	-	-	-	-	33,3	-
Зубастая корюшка	-	-	-	86,7	-	-	-	-	-	53,3	-
Малоротая корюшка	-	-	-	-	40	33,3	-	-	-	100	-
Двухлинейная камбала	-	-	50	-	-	-	-	33,3	-	-	40
Желтоперая камбала	-	-	-	-	-	-	-	-	53,3	66,6	-
Палтусовидная камбала	-	100	-	-	-	-	-	100	-	-	-
Минтай	86,6	-	-	-	-	66,6	53,3	-	56,6	96,6	-
Треска	-	-	-	-	80	86,6	70	-	66,6	90	-
Навага	-	-	-	-	93,3	-	73,3	-	-	63,3	-
Кета	-	-	-	-	-	-	-	-	-	86,7	-
Горбуша	66,6	-	-	-	-	-	-	-	-	53,3	-
Нерка	-	-	-	-	40	-	-	-	-	33,3	-

У рыб в Петропавловско-Командорской подзоне чаще встречали личинок нематоды *Anisakis* sp. Их отмечали в полости тела минтая и в мускулатуре нерки. Цестод *N. surmenicola* и скребней *C. strumosum* регистрировали в полости тела наваги, минтая и палтусовидной камбалы. У двухлинейной, палтусовидной и сахалинской камбал в мускулатуре отмечали высокий процент заражения трематодами *Stephanostomum* sp. (табл. 2).

Таблица 2. Встречаемость паразитов, опасных для здоровья человека и теплокровных животных, а также портящих товарное качество рыбной продукции, у рыб в Петропавловско-Командорской подзоне с 2011 по 2014 гг., %

	2011		2012		2013		2014	
	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Stephanostomum</i> sp.	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Stephanostomum</i> sp.	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Stephanostomum</i> sp.	
Двухлинейная камбала	-	-	46,6	-	43,3	-	73,3	
Палтусовидная камбала	-	-	-	-	50	-	-	
Сахалинская камбала	-	-	-	-	53,3	-	-	
Минтай	100	-	-	66,6	-	66,6	-	
Нерка	66,6	40	-	50	-	46,6	-	

В Камчатско-Курильской подзоне у кижуча, кеты, горбуши и нерки отмечали высокие показатели экстенсивности заражения мускулатуры личинками нематод *Anisakis* sp. Цестод *Diphyllobotrium* sp. обнаружили только у нерки, *N. surmenicola* - у минтая (табл. 3).

Таблица 3. Встречаемость паразитов, опасных для здоровья человека и теплокровных животных, а также портящих товарное качество рыбной продукции, в Камчатско-Курильской подзоне с 2011 по 2014 гг., %

	2011			2012		2013	2014
	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Diphyllobotrium</i> sp.	<i>Nybelinia surmenicola</i>	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Diphyllobotrium</i> sp.	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Anisakis</i> sp.
Минтай	33,3	-	46,6	-	-	-	-
Нерка	93,3	93,3	-	50	100	-	80
Кета	-	-	-	-	-	-	93,3
Горбуша	60	-	-	-	-	50	40
Кижуч	-	-	-	-	-	-	86,6

В результате проведенного в 2011–2014 гг. паразитологического обследования промысловых видов рыб Карагинской, Петропавловско-Командорской и Камчатско-Курильской подзон выявили гельминтов, потенциально опасных для человека и теплокровных животных и/или влияющих на товарное качество рыбной продукции.

Наибольшее эпидемиологическое значение в распространении анизакиоза в Карагинской подзоне имеют тихоокеанская сельдь, минтай, треска и навага; в Петропавловско-Командорской подзоне - минтай, и нерка; в Камчатско-Курильской подзоне - кижуч, кета, горбуша и нерка. Для дифиллоботриоза в Карагинской подзоне - минтай и треска; в Камчатско-Курильской подзоне - нерка.

В целом санитарно-эпизоотическое состояние обследованных районов за 2011–2014 гг. находится на среднемноголетнем уровне. Наличие в популяциях промысловых рыб Камчатки ряда опасных гельминтов обуславливает проведение дальнейшего паразитологического мониторинга.

#### Список литературы

Гаевская А.В., Анизакидные нематоды и заболевания, вызываемые ими у животных и человека. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2005. 223 с.

Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Паразитические многоклеточные. Под ред. О.Н. Бауера. 1987. Л.: Наука. Т. III. 583 с.

СанПиН 2.3.2.1078-01 Гигиенические требования безопасности и пищевое ценности пищевых продуктов. 2001. С. 2–15.

Fagerholm H.P. Parasites of fish in Finland. VI Nematodes // Inst. of Abo Academ. 1982. 128 p.

Gibson D.I. Guide to the parasites of fishes of Canada. *Trematoda*. L. Margolis, Z. Kabata (ed.) // Can. Spec. Publ. Fish Aquat. Sci. 1995. № 124. Part IV. 373 p.

Guide to the parasites of fishes of Canada. *Acanthocephala*. Ed. L. Margolis, Z. Kabata // Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. 1989. № 107. Part III. 95 p.

### **PARASITES OF KAMCHATKA COMMERCIAL FISH IMPACTED THEIR COMMODITY QUALITY**

Kozlov K.V., Gritskikh E.A.

The comparative analysis of invasion of commercial fish, influencing on their commodity quality and having epidemiological value by results of researches of 2011–2014 is carried out. The kinds of fish having the greatest epidemiological value

for distribution of the anisakiosis and difillobothriosis on Kamchatka peninsula are determined.

## ЛИГУЛИДОЗ МОЛОДИ ЛЕЩА *ABRAMIS BRAMA* (LINNAEUS, 1758) В СЕВЕРНОМ КАСПИИ

А.В. Конькова

*Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства (ФГБНУ «КаспНИИРХ»), Астрахань, Россия, e-mail: [avkonkova@rambler.ru](mailto:avkonkova@rambler.ru)*

Цесто́ды сем. *Ligulidae* (Claus, 1885) являются возбудителями летального для рыб заболевания – лигулидоза. Представители ихтиофауны относятся ко вторым промежуточным хозяевам лигулид и только для них данные гельминты оказываются смертельно опасными (у птиц и ракообразных присутствие личинок и взрослых червей не сопровождается глубокими патологическими изменениями органов и тканей хозяев (Дубинина, 1966). Несмотря на то, что заражению ремнецами и смертности подвержены все возрастные группы рыб, наиболее уязвимой является их молодь. В связи с этим, изучение лигулидоза молоди становится неотъемлемой частью оценки состояния популяции рыб в целом.

В последнее время в Северном Каспии лигулидозной инвазии чаще, по сравнению с другими видами рыб, подвержены младшие возрастные группы леща (Конькова, 2013). Однако до сих пор мало изучены патологические изменения органов и тканей молоди карповых рыб, возникающие при лигулидозной инвазии, и которые в результате провоцируют гибель зараженных особей, не доживающих до трехлетнего возраста (Ларцева, Проскурина, 2003). В связи с этим, целью данного исследования явилась оценка состояния организмов молоди леща при лигулидозе.

Материалом для настоящей работы послужили результаты неполного гельминтологического вскрытия 5352 годовиков, сеголетков и двухлетков леща, выловленных донным 4,5 метровым тралом в западной акватории северной части

Каспийского моря (2007-2014 гг.). Клиническое и патологоанатомическое обследование рыб проведено в соответствии с общепринятыми в ихтиопатологии методами (Лабораторный практикум, 1983). Идентификация выделенных и просветленных в глицерине плероцеркоидов осуществлена с помощью определителей (Определитель, 1987; Дубинина, 1966). Для выяснения реакции организма леща на паразитирование плероцеркоидов ремнецов в соответствии со стандартными методами проведения общего биологического анализа карповых рыб (Правдин, 1966) были определены морфологические показатели зараженных и незараженных лигулидами рыб. Полученные данные обработаны статистически с помощью критерия достоверности Стьюдента.

В исследованный период лигулидоз отмечен у всех обследованных возрастных групп леща. Возбудителями заболевания являлись плероцеркоиды *Ligula intestinalis* (Linnaeus, 1758) и *Digramma interrupta* (Rudolphi, 1810), вызывавшие лигулез и диграмоз соответственно, а также их молодые формы (неидентифицируемые ввиду отсутствия сформированной половой системы). Плероцеркоиды вышеуказанных гельминтов у молоди леща регистрировали регулярно (рис. 1). На фоне ежегодно присутствовавших цестод *D. interrupta* личинки *L. intestinalis* были отмечены только в 2007, 2008 и 2010 гг., однако их присутствие в рыбах не исключено ввиду того, что с 2010 г. в паразитоценозах обследованных особей стали регистрировать молодых недифференцируемых ремнецов, которые могли являться ранними формами обоих видов.

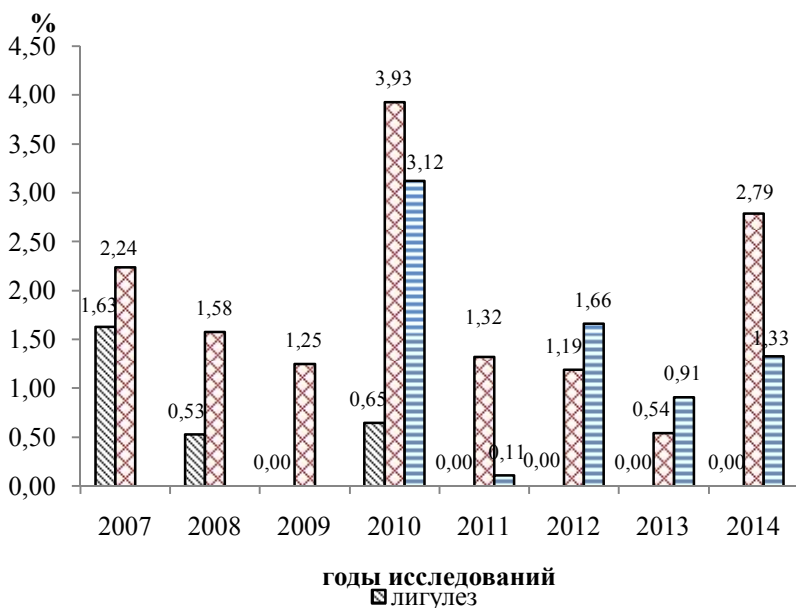


Рисунок 1 - Лигулидоз молоди леща в Северном Каспии (2007-2014 гг.)

В целом, в большей степени заражению представителями сем. *Ligulidae* были подвержены двухлетки ( $3,03 \pm 1,52$  %) и сеголетки ( $2,38 \pm 1,01$  %), в меньшей – годовики ( $1,85 \pm 0,57$  %) леща. Распределение лигулидозной инвазии у молоди обследованных рыб представлено в таблице.

Пораженная ремнецами молодь леща, по сравнению с неинвазированными особями, концентрировалась, преимущественно, в мелководной зоне Северного Каспия с глубинами 4-5 м, в то время, когда основная масса рыб, свободных от инвазии лигулид, встречалась на глубинах 6-7 м.

Таблица 1. Частота встречаемости лигулидозной инвазии у младших возрастных групп леща в Северном Каспии (2007-2014 гг.)

Возрастная группа	Заболевание, %		
	Лигулез	Диграмоз	Лигулидоз (молодые ремнецы)
сеголетки	$0,36 \pm 0,22$	$1,28 \pm 0,52$	$0,76 \pm 0,50$
годовики	$0,22 \pm 0,15$	$1,30 \pm 0,48$	$0,34 \pm 0,20$
двухлетки	0,00	$2,47 \pm 1,13$	$0,56 \pm 0,56$



Это свидетельствует о дисфункции плавательного пузыря пораженных особей и связанных с этим трудностями при маневрировании в толще воды, в частности, при погружении на глубину. Вероятно, сильным волнением зараженная молодь сносилась на мелководье, где ей легче было держаться в водном слое и добывать себе пищу. В этой же зоне моря в большом количестве встречались рыбацкие птицы, являющиеся окончательными хозяевами ремнецов. На обследованной акватории наиболее часто регистрировали черноголового хохотуна *Larus ichthyaetus* (Pallas 1773), реже озерную или обыкновенную чайку *Larus ridibundus* (Linnaeus, 1766). Птицы были отмечены в полете, а также в группах до 20 экз., держащихся на воде. Присутствие в достаточном количестве дефинитивных хозяев, кормовым объектом которых, в основном, служит молодь карповых рыб, свидетельствует о циркуляции инвазии в водоеме.

Зараженные лигулидами лещи были выловлены донным тралом. При визуальном осмотре на поверхности воды особи, зараженные данными гельминтами, с нарушенной координацией не выявлены.

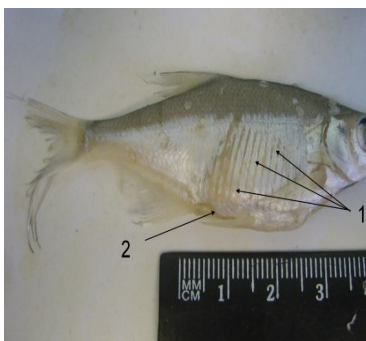
Клинические признаки лигулидоза проявлялись у разных возрастных групп в 12,50-63,00 % случаях и выявлялись при значительных размерах паразита, как правило, *D. interrupta*. Визуально зараженная рыба отличалась от здоровых особей увеличенным брюшком, деформированной брюшной стенкой и нарушенной пропорцией тела (рис. 2 а, б). При надавливании брюшко было плотным из-за присутствия личинок гельминтов. В 2010 г. у сеголетков леща отмечена последняя клиническая стадия заболевания – разрыв брюшной стенки (рис. 2 в). Ввиду интенсивного роста плероцеркоидов ремнецов, превосходящих по темпу роста развивающийся организм рыбы, паразит за короткий срок (несколько месяцев) предельно заполнял полость тела, что влекло за собой сначала растяжение, а в результате – нарушение целостности стенки брюшка.



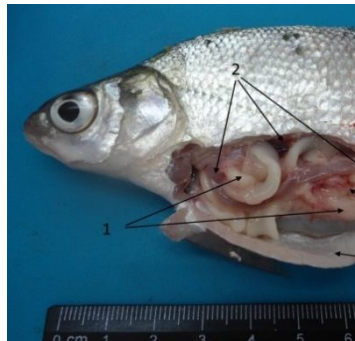
а



б



в



г

Рисунок 2. Клинические и патологоанатомические признаки лигулидоза молоди леща в Северном Каспии: а, б - увеличение и уплотнение брюшка, деформация брюшной стенки; в – истончение (1) и разрыв (2) брюшной стенки; г - плероцеркоид *D.interrupta* (1), компрессия внутренних органов (2), кровоизлияния на брыжейке (3), деформированная стенка брюшка (4)

Наряду с лещами, имевшими явные клинические признаки заболевания, нашими исследованиями выявлены инвазированные ремнецами особи, которые при визуальном осмотре не отличались от здоровых рыб. При этом лигулидоз, зарегистрированный непосредственно при гельминтологическом вскрытии и вызванный паразитированием молодых и небольших по размеру личинок ремнецов, сопровождался в большинстве случаев неглубокими патоморфологическими изменениями, проявлявшимися в умеренном сдавливании внутренних органов зараженных гидробионтов. Однако, учитывая тот факт, что паразиты в теле рыбы интенсивно растут, то в ближайшее время у

обследованных особей можно было бы ожидать проявления признаков глубокого повреждения тканей и органов.

При патологоанатомическом вскрытии сеголетков, годовиков и двухлетков леща с явными клиническими признаками заболевания отмечены: локальные и точечные кровоизлияния на брюшной стенке и брыжейке; существенное сдавливание и смещение внутренних органов; перекручивание и истончение кишечника, сопровождающееся полным отсутствием перевариваемой пищи (нарушение проходимости пищевых масс); дистрофия, изменение консистенции и цвета печени; дистрофия селезенки (рис. 2 г). Паразиты обладали сильной эластичностью и активно двигались в брюшной полости, что позволяло им свободно опутывать и компрессировать органы. Плероцеркоиды в некоторых случаях занимали большую часть полости тела, оставляя внутренним органам не более одной пятой части объема, что являлось примером значительного сдавливания, сопровождающегося уменьшением в размере и, соответственно, дисфункции органов. Несомненно, что выявленные нашими исследованиями изменения внутренних органов молоди леща, вызванные присутствием ремнецов, в скором времени могли явиться причиной гибели инвазированных рыб.

Проведенный анализ морфометрических показателей молоди леща, зараженной и свободной от инвазии ремнецами, выявил следующие морфофизиологические изменения, возникающие при лигулидозе: молодые несформированные и небольшие (длиной до 15 см) ремнецы вызывали у зараженных лещей, по отношению к незараженным рыбам, достоверное уменьшение, в среднем, на  $16,29 \pm 2,62$  % абсолютной и промысловой длины, массы с внутренностями и без внутренностей, а крупные плероцеркоиды *D. interrupta* (длиной до 28 см) провоцировали достоверное снижение, в среднем, на  $7,10 \pm 1,01$  % значений коэффициентов упитанности по Фультону и Кларк. Следовательно, ухудшение морфофизиологических показателей свидетельствовало о негативном влиянии, которое оказывали плероцеркоиды ремнецов на организм молоди леща, вызывая отставание в росте по сравнению с незараженными рыбами.

Таким образом, в Северном Каспии у сеголетков, годовиков и двухлетков леща присутствие плероцеркоидов ремнецов вызывало в организме необратимые изменения, такие как дистрофию и дисфункцию внутренних органов, деформацию скелета и нарушение целостности покровов (разрыв брюшка), явившиеся причиной отставания в росте и гибели зараженных особей. Молодой развивающийся организм рыбы не в состоянии справиться с интенсивно растущим паразитом, и может погибнуть в первый год заражения (сеголетки леща в 2010 г.). Поэтому наибольшую опасность плероцеркоиды лигулид наносят молодежи, в отличие от взрослых рыб, которые с ремнецами могут существовать до 5-6 лет.

В Северном Каспии имеются все необходимые условия для существования лигулидоза молодежи леща. Ущерб рыбным запасам, вызванный паразитированием ремнецов значителен (в отдельные годы достигавший до тысячи тонн погибшей рыбы), поэтому для контроля и прогнозирования эпизоотической ситуации по лигулидозному заболеванию молодежи карповых рыб мониторинговые исследования необходимо продолжать.

#### Список литературы

Дубинина М.Н. Ремнецы (Cestoda, Ligulidae) фауны СССР. Монографическое исследование. М-Л: Наука, 1966. 261 с.

Конькова А.В. Лигулидозы молодежи воблы *Rutilus rutilus caspicus* (J.) и леща *Abramis brama* (L.) в Каспийском море // Паразитология в изменяющемся мире: мат. V Всероссийского съезда паразитологов при Российской академии наук (23-26 сентября 2013 г., г. Новосибирск). Новосибирск: Институт систематики и экологии животных СО РАН, 2013. С. 88.

Ларцева Л.В., Проскурина В.В. Состояние паразитофауны и микрофлоры гидробионтов Волго-Каспийского региона на рубеже XXI века. Астрахань: Изд-во КаспНИРХ, 2003. 80 с.

Лабораторный практикум по болезням рыб / Под ред. В.А. Мусселиус. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 296 с.

Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Паразитические многоклеточные (Вторая часть) / Под ред. О.Н. Бауер. Л.: Наука, 1987. Т.3. 583 с.

Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных). М.: Пищевая промышленность, 1966. 375 с.

### **LIGULA OF THE BREAM JUVENILES *ABRAMIS BRAMA* (LINNAEUS, 1758) IN THE NORTHERN CASPIAN SEA**

Kon'kova A.V.

The article presents the long-term data on underyearlings, yearlings and twoyearlings of bream in the Northern Caspian Sea. Irreversible changes were revealed, such as dystrophy and dysfunction of the internals, deformation of skeleton and integrity damaging of integuments (rupture of abdomen), that has become a reason of the lagging in growth and death of infected specimens.

## **ЗАРАЖЕННОСТЬ ПЛОТВЫ (*RUTILUS RUTILUS* LINNAEUS, 1758) МЕТАЦЕРКАРИЯМИ ОПИСТОРХИСА В ВОДНЫХ ОБЪЕКТАХ АЛТАЙСКОГО КРАЯ**

Е.Н. Крылова, С.О. Власов

*Институт водных и экологических проблем СО РАН г. Барнаул,  
Россия, e-mail: [ken71@iwep.ru](mailto:ken71@iwep.ru), [vlasov@iwep.ru](mailto:vlasov@iwep.ru)*

Цель работы: оценить зараженность плотвы метацеркариями описторхиса в водных объектах Алтайского края.

Плотва выбрана основным видом исследования. Этот вид – типичный представитель семейства карповых, имеет широкий ареал обитания и высокую численность в большинстве водоемов Сибири. Степень зараженности вида описторхами и другими паразитами одна из самых больших в семействе.

Подвид *R. rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) – обыкновенная плотва живет до 20 лет. Туводная форма достигает длины 35 см и массы 1,3 кг. Полупроходные формы крупнее: длина до 51 см, масса до 2 кг.

Плотва населяет реки, озера, пруды, водохранилища, каналы, лиманы. Предпочитает участки, заросшие растительностью. Держится на границе зарослей и открытой воды в местах с умеренным течением и теплой водой. Стайная рыба. По характеру питания – эврифаг. Взрослые особи питаются разнообразными беспозвоночными и их личинками, моллюсками, летом потребляют много нитчатых водорослей, а при обилии мальков крупная плотва питается личинками и мальками рыб. Половой зрелости жилая плотва достигает в возрасте 3-5 лет. Размножается весной (март - май) при температуре воды 8°C и выше. Типичный фитофил, икра приклеивается к растениям. Икрометание одновременное, нерестится большими стаями, в озерах нерест проходит шумно. Диаметр икринок около 1,5 мм.

Плодовитость 2,5-100 тыс. икринок. Развитие икры проходит за 9-14 дней. Средняя длина личинок при выклеве 5,2-6,6 мм. Они быстро переходят на питание мелкими беспозвоночными.

Плотва многочисленный промысловый вид, особенно ценятся его полупроходные формы.

Исследования проведены в период открытой воды на разнотипных водоемах и водотоках бассейна Верхней Оби (табл. 1).

Всего за период с 03.05.11 по 24.07.13 отобраны ихтиологические пробы в 15 пунктах на семи водных объектах. Объекты исследований: реки Обь, Чумыш, Барнаулка, Талая, Крутишка и озёра Лапа (гребной канал) и Красный Яр. Всего на указанных водных объектах отобрано и обработано 160 экземпляров вида.

Полевые сборы и лабораторная обработка ихтиологического материала проведены по общепринятым в ихтиологии методикам (Быховская-Павловская, Беэр, 2005).

Возрастной диапазон исследованной плотвы колеблется от 1+ до 9+. Максимальные размерно-весовые показатели составляют: 187,69 мм – длина тела; 332 г. – общая масса. Минимальные, соответственно, у двухлеток (1+): длина – 86,58 см, вес – 37 г.

Зараженность рыб метацеркариями *O. felineus* исследовали методом неполного паразитологического вскрытия.

Таблица 1. Объем исследованного ихтиологического материала

№	водоем	населенный пункт	дата	экз.
1	р.Обь	с.Рассказиха	24.07.2013	22
2	р.Обь	с.Речкуново	30.05.2011	10
3	р.Обь	с.Барсуково	16.06.2011	30
4	р.Обь	с.Усть-Чумыш	30.05.2011	10
5	р.Обь	с.Шелаболиха	30.05.2011	10
6	р.Талая	г.Затон	25.05.2011	13
7	р.Барнаулка	с.Черёмное	28.06.2012	5
8	р.Барнаулка	с.Черёмное	11.07.2012	10
9	р.Барнаулка	п.Борзово	31.07.2012	1
10	р.Барнаулка	г.Барнаул	03.05.2011	5

11	р.Барнаулка	г.Барнаул	26.05.2011	12
12	оз.Лапа	г.Барнаул	27.05.2011	1
13	р.Чумыш	г.Заринск	06.09.2011	10
14	р.Чумыш	с.Шатуново	13.06.2011	6
15	оз.Красный Яр	с.Шатуново	03.07.2011	15
всего:				160

Примечания: 1 – протока Заломная, 35 км. выше г. Барнаул; 2–50 км. ниже г. Барнаул; 3–60 км. ниже г. Барнаул; 4–70 км. ниже г. Барнаул; 5–110 км. ниже г. Барнаул, 40 км. ниже устья р. Чумыш; 6 – приток р. Обь, 10 км. выше г. Барнаул; 7–водозабор сахарного завода, 65 км. от устья; 8–водозабор сахарного завода, 65 км. от устья; 9–200 м. ниже устья р. Власиха, 10 км. от устья; 10–200 м. ниже устья р. Пивоварка (з-д АЗА); 11–500 м. ниже устья р. Пивоварка (м-н Арси-Дом), 12–пойменный водоём, старая протока р. Обь; 13 – приток р. Обь, водозабор ОАО «Алтай-Кокс»; 14 – приток р. Обь, 800 м. выше понтонного моста; 15 - пойменный водоём, старица р. Чумыш.

кстенсивность инвазии у плотвы – в р. Чумыш 14,3%, в р. Барнаулка, 200 м ниже устья р. Пивоварка (р-н Алтайского завода агрегатов) - 20% от выборки, в р-не магазина Арси Дом – 500 м ниже устья р. Пивоварка -16,7% (рис. 1, 2), в оз. Красный Яр – у 0,07% рыб.

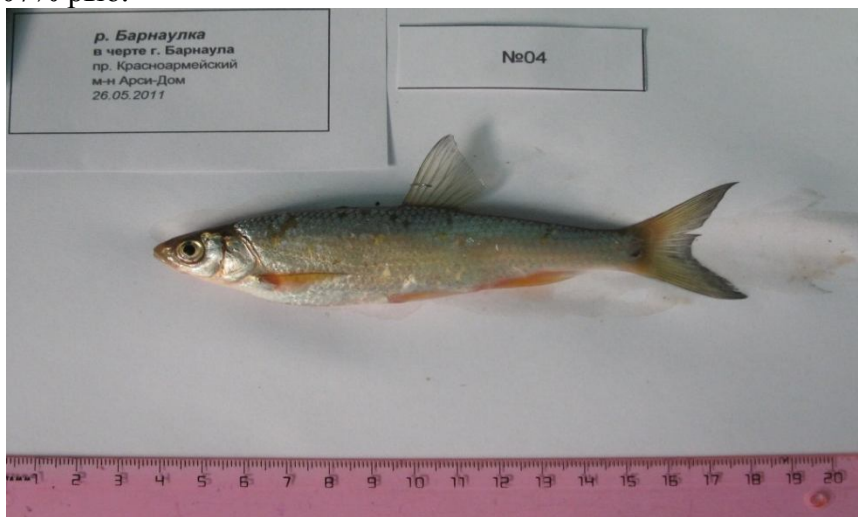


Рис. 1. Плотва из р. Барнаулка (500 м ниже р. Пивоварка)

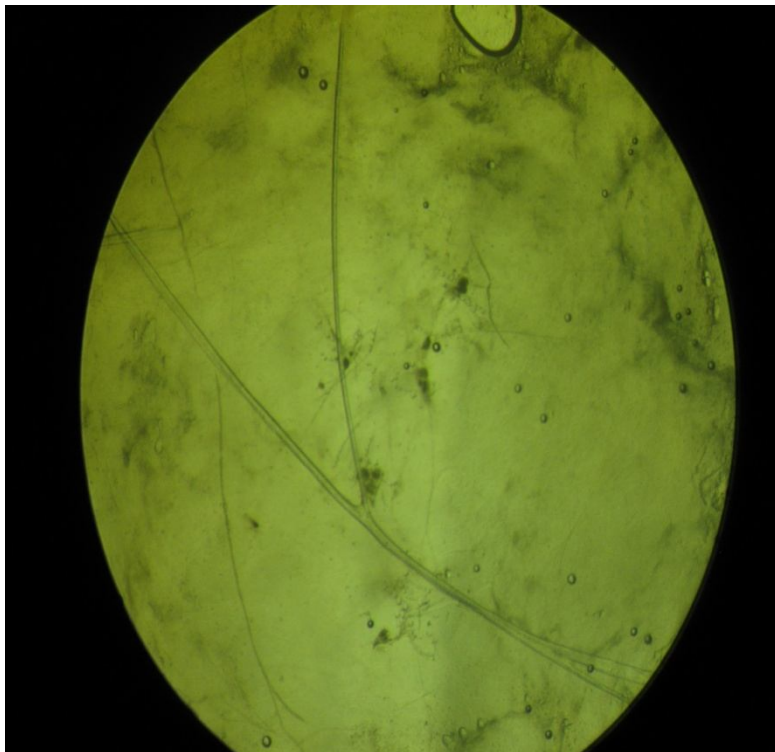


Рис. 2. Метацеркарии описторхид в мышцах плотвы

Список литературы

Быховская-Павловская И.Е. Паразиты рыб: Руководство по изуч. / И.Е. Быховская-Павловская. Л.: Наука, 1985. 123 с.

Бэр С.А. Биология возбудителя описторхоза / С.А. Бэр. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2005. 336 с.

**INFESTATION OF ROACH (*RUTILUS RUTILUS* (LINNAEUS, 1758))  
BY METACERCARIAE OF OPISTHORCHIS IN WATER BODIES OF THE  
ALTAI TERRITORY**

Krylova E.N., Vlasov S.O.

Objective: to evaluate the infestation of roaches by metacercariae of opisthorchis in water bodies of the Altai territory. Roach selected the basic type of research. This species is a typical representative of the carp family, has a wide habitat and high numbers in most water bodies of Siberia. The degree of infestation of the form Opisthorchis and other parasites are one of the biggest in the family.



## **ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА ПАРАЗИТАФАУНЫ ЛЕЩА *ABRAMIS BRAMA* L. В ПЕРИОД РАЗМНОЖЕНИЯ**

В.Р. Микряков, М.А. Степанова

*Институт биологии внутренних вод РАН, Борок Ярославской  
обл., Россия, e-mail: [mvr@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:mvr@ibiw.yaroslavl.ru)*

Многолетними исследованиями динамики антимикробной сыворотки крови леща нами, как это установлено ранее сильно колеблется (Микряков, 1978, 1984). Максимальный размах изменчивости установлен в период нереста. Этот период сопровождался изменением содержания иммунодефицитных (ИМД) и иммунореактивных (ИМР) особей. Доля ИМД и ИМР рыб в период размножения колебалась в пределах 10-70 %. Максимальное число ИМД особей выявлено в период размножения, а ИМР до нереста и в период нагула. Сходные результаты сезонной динамики заражения моногенетическими сосальщиками леща, плотвы и синца Рыбинского водохранилища ранее получены Н.А. Изюмовой, А.В. Маштаковым (1979).

Нами было выдвинуто положение, что увеличение в популяциях рыб ИМД особей в период размножения является одной из причин снижения устойчивости рыб к паразитам (Микряков, 1984).

Настоящее сообщение посвящено изучению заражения рыб паразитами в зависимости от состояния половых продуктов в период размножения и после него.

Материалом для исследования послужили 35 половозрелых самок леща со стадией развития половых продуктов – VI, V, IV, II. Проведенные исследования показали, что зараженность рыб по видовому разнообразию паразитофауны, показателям экстенсивности и интенсивности заражения зависит от стадии созревания половых продуктов (табл. 1, 2).

На основании данных полного паразитологического исследования установлено, что паразитофауна леща состоит из 16 видов, относящихся к восьми классам: книдоспоридии, ресничные инфузории, моногенеи, ленточные черви, дигенетические сосальщики, пиявки и пластинчато-жаберные моллюски (табл. 1).

Таблица 1. Паразитофауна леща в период нереста

п/п	Наименование паразитов	% зараженных рыб	Интенсивность, число
1	<i>Sphaerospora</i> sp	45.5	Много
2	<i>Myxobolus</i> sp	16.8	3-44 (15)
3	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	81.9	4-2000 (264)
4	<i>Trichodina</i> sp.	31.8	1-6 (2)
5	<i>Dactylogyrus wunderi</i>	94.4	48-645 (215)
6	<i>Dactylogyrus falcatus</i>	54.5	36-840 (175)
7	<i>Dactylogyrus sphyrna</i>	5.4	10-48 (23)
8	<i>Dactylogyrus auriculatus</i>	63.5	35-568 (209)
9	<i>Dactylogyrus cornu</i>	10.8	40-87 (58)
10	<i>Gyrodactylus parvicopula</i>	94.4	36-4550 (636)
11	<i>Caryophyllaeus laticeps</i>	19.6	более 100 экз.
12	<i>Bucefalus polymorphus</i>	16.8	1-53 (20)
13	<i>Posthodiplostomum cuticola</i>	54.5	1-104 (39)
14	<i>Paracaenogonimus ovatus Piscicola geometra</i>	46.6	1-48 (13)
15	<i>Unionidae</i> sp	54.5	1-7 (3)
16		54.5	1-57 (11)

Примечание. В последней графе в скобках указаны средние данные.

Встречаемость отдельных видов паразитов среди лещей колеблется от 5,4% до 94,4% со средней интенсивностью от 2 до 636 экземпляров. По частоте встречаемости *Gyrodactylus parvicopula* и *Dactylogyrus wunderi* стоят на первом месте. Эти паразиты обнаружены у 94,4% особей, а *Ichthyophthirius multifiliis* – у 81,9%. В меньшей степени лещи оказались пораженными *Caryophyllaeus laticeps* (19,6%), *Bucefalus polymorphus* (16,8%), *Myxobolus* sp. (16,8%), *Dactylogyrus cornu* (10,8%), *Dactylogyrus sphyrna* (5,4%).

При сопоставлении степени зараженности леща с данными определения состояния их половых продуктов и иммунофизиологическими показателями организма установлено, что состав паразитофауны леща зависит от степени созревания половых продуктов, жирности тела и антимикробных свойств сыворотки крови (табл. 2). У отнерестившихся особей, у рыб с жирностью 0 и 1 балл и у лещей с низкими показателями антимикробного эффекта сыворотки выявлено от 93,75 до 100% указанного видового состава паразитов, тогда как среди лещей с жирностью в III балла и с антимикробными свойствами сыворотки крови свыше 75% обнаружено 37,5 и 43,75% видов паразитов.

При анализе состава паразитофауны, в зависимости от исследуемых показателей организма хозяина, установлен

характерный для того или иного состояния видовой состав паразитов.

У исследованных рыб, имеющих 4-ю стадию созревания половых продуктов, *D. falcatus*, *D. auriculatus*, *C. laticeps*, *B. lucioperca*, *Paracaenogonimus ovatus* нами не обнаружены.

В то же время такой паразит как *D. sphyrna* выявлен среди лещей, имеющих 4-ю стадию созревания половых продуктов. Меньше паразитов оказалось у рыб с резорбирующей икрой. От них выделены паразиты 11 видов (средняя зараженность – семь видов). *Muxobolus* sp., *D. sphyrna*, *D. cornu*, *Piscicola geometra* в организме этих рыб не найдены. Обнаруженная разница в зараженности рыб, имеющих различную степень созревания половых продуктов, видимо, с одной стороны, связана со снижением иммунологических показателей организма, с другой – появлением большого количества продуктов метаболизма в период нереста, вследствие чего приживаемость паразита в организме рыб увеличивается.

Аналогичная разница в степени зараженности обнаружена среди рыб, имеющих разную жирность. Среди всех 15 особей, не имеющих полостного жира, независимо от зрелости половых продуктов и показателей иммунитета, находили паразитов 16 видов при средней зараженности каждой особи паразитами восьми видов. Встречаемость каждого вида паразита на рыбах колебалась от 13 до 93%. Состав паразитофауны среди лещей с жирностью в III бала был равен семи видам при средней зараженности их пятью видами. *Muxobolus* sp., *Trichodina* sp., *D. sphyrna*, *D. cornu*, *C. laticeps*, *B. lucioperca*, *Posthodiplostomum cuticola*, *P. ovatus*, *P. geometra* у исследуемых особей не обнаружены.

Степень зараженности леща паразитами, как показали результаты иммунологических исследований, также зависит от уровня антимикробного эффекта сыворотки крови. Особи, имеющие антимикробный эффект сыворотки крови до 50%, были поражены паразитами 16 видов V при средней зараженности каждой особи 10 видами. Среди рыб с бактериостатическим эффектом от 51 до 75% обнаружено 11 видов при средней зараженности их паразитами семи видов, а у лещей, имеющих

этот иммунологический показатель свыше 76%, выявлено 8 видов со средней зараженностью каждой особи паразитами 4 – 5 видов; *Sphaerospora* sp., *Myxobolus* sp., *Trichodina* sp., *D. sphyrna*, *D. cornu*, *C. laticeps*, *B. lucioperca*, *Unionidae* sp. в организме рыб с антимикробным эффектом свыше 76% не найдены. При сравнении зараженности рыб *Sphaerospora* sp., *Myxobolus* sp., *Trichodina* sp., *C. laticeps*, *B. hicioperca*, *Unionidae* sp. с иммунологическими показателями установлена определенная связь между интенсивностью зараженности рыб этими паразитами и антимикробными свойствами сыворотки крови.

Сравнивая состав паразитофауны леща с данными лейкоцитарной формулы, уровня гемоглобина, РОЭ, общего числа лейкоцитов и эритроцитов, мы не нашли какой-либо связи, указывающей на влияние паразитов на эти показатели. Обнаруженные сдвиги в изучаемых параметрах крови более всего отражали состояние организма, связанное с нерестом и созреванием половых продуктов.

Таблица 2. Зараженность рыб в зависимости от состояния половых продуктов, жирности тела и бактериостатических свойств сыворотки крови, %

Название паразита	Состояние половых продуктов, стадия				Жирность, балл				Антимикробный эффект сыворотки крови, %			
	IV	V	VI	P	0	I	II	III	0-25	26-50	51-75	76-100
Число рыб	5	10	16	4	15	8	8	4	11	9	10	50
<i>Sphaerospora</i> sp.	80	50	68	50	43	75	50	50	72,8	40,4	40	0
<i>Myxobolus</i> sp.	40	40	25	0	26	25	75	0	27,3	10,1	20	0
<i>I. multifiliis</i>	80	70	95	0	80	100	88	50	100	100	100	40
<i>Trichodina</i> sp.	20	40	32	50	43	25	25	0	36,4	20,2	0	0
<i>D. wunderi</i>	80	100	94	100	80	100	100	100	100	90,0	90	80
<i>D. falcatus</i>	0	75	50	50	22	75	62	75	18,2	80,8	80	80
<i>D. sphyrna</i>	40	0	0	0	13	0	0	0	9,1	10,1	0	0
<i>D. auriculatus</i>	0	20	68	100	43	100	87	100	72,8	80,8	60	20
<i>D. cornu</i>	20	10	25	0	20	50	0	0	0	40,4	20	0
<i>G. parvicopula</i>	80	900	100	100	93	100	100		100	80,8	80	100
<i>C. laticeps</i>	0	20	26	50	43	25	25	75	54,6	20,2	0	0
<i>B. polymorphus</i>	0	0	50	25	20	25	25	0	36,4	20,2	0	0
<i>P. cutibola</i>	20	0	50	50	66	75	50	0	72,8	20,2	40	40
<i>P. ovatus</i>	0	30	50	100	66	75	0	0	72,8	80,8	0	40
<i>P. geometra</i>	40	70	50	0	53	100	62	0	100	40,4	60	60
<i>Unionidae</i> sp.	40	30	50	100	53	50	50	50	54	80,8	22	0

Примечание. P – условное обозначение самок с резорбцией икры.

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что зараженность рыб зависит от состояния половых

продуктов, физиолого-биохимических и иммунологических показателей организма хозяина.

На вопрос о том, чем обусловлена различная степень зараженности рыб по данным этих исследований ответить не представляется возможным. Тем не менее, полученные данные разъясняют некоторые вопросы взаимоотношения между рыбами и паразитами, что может быть весьма ценным при изучении состояния здоровья рыбного населения в период размножения.

#### Список литературы

Микряков В.Р. Актуальные вопросы иммунологии рыб. В кн.: «Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ». Л.: "Наука" Труды ИБВВ РАН Вып. 32/35. 1978. С. 116-133.

Микряков В.Р. Закономерности функционирования иммунной системы пресноводных рыб: Автореф. дис. д-ра биол. наук. М., 1984. 37 с.

Исюмова Н.А., Маштаков А.В. Сезонная встречаемость дактилогирусов у леща, плотвы и синца Рыбинского водохранилища // Сб. трудов ИБВВ АН СССР «Физиология и паразитология пресноводных животных». Л.: Наука, 1979. Вып. 38 (41). С. 160-167.

#### **DYNAMICS OF CHANGE OF STRUCTURE PARASITOFAUNA BREAM *ABRAMIS BRAMA* L. IN REPRODUCTION**

Mikryakov V.R., Stepanova M.A.

Data of researches of dynamics of structure parasitofauna, extensiveness and intensity of infection bream *Abramis brama* L. in reproduction are cited. Dependence of investigated indicators on a stage of development of sexual products and immunophysiological conditions of an organism of fishes is established.

#### **ГЕЛЬМИНТОФАУНА КАРПОВЫХ РЫБ ИЗ ВОДОЕМОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЗОНЫ РФ**

Н.Н. Романова<sup>1</sup>, Н.А. Головина<sup>2</sup>, П.П. Головин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства», п. Рыбное 141821, Дмитровский р-он, Московская обл. Россия,  
[yniprh@mail.ru](mailto:yniprh@mail.ru), [lab.ihitiopat@mail.ru](mailto:lab.ihitiopat@mail.ru)

<sup>2</sup> Дмитровский рыбохозяйственный технологический институт (филиал) ФГБОУ ВПО «АГТУ» п. Рыбное 141821, Дмитровский р-он, Московская обл. Россия, [kafvba@mail.ru](mailto:kafvba@mail.ru)

Разнообразие экологических условий в водоемах определяет численность и видовой состав обитающих в них рыб и

способствует формированию их паразитофауны. В водоемах Центральной зоны РФ в составе ихтиофауны большую часть занимают карповые рыбы – лещ, плотва, красноперка, линь, густера и другие.

Сложившиеся условия в водохранилищах и реках благоприятны для осуществления жизненных циклов многих гельминтов, для которых рыбы являются дополнительными или дефинитивными хозяевами. В некоторых водоемах сформированы очаги опасных гельминтозов, таких как лигулез, ихтиокотилуроз, диплостомоз, постодиплостомоз (Петухов, 2003, Иванов и др., 2012), что приводит к уменьшению рыбопродуктивности водоемов и ухудшению качества рыбной продукции. У рыб отмечается снижение неспецифической резистентности, торможение роста, а в некоторых случаях и гибель.

Фундаментальные исследования паразитофауны рыб, начиная с 30-х годов прошлого века, проведены во многих водохранилищах Волжско-Каспийского бассейна (Догель, Быховский, 1938; Изюмова, 1977; Иванов, 1990; Жохов, 2011 и др.), но водоемы бассейна р. Дон до настоящего времени остаются практически не обследованными.

В настоящее время сведения о фауне паразитов рыб имеют особую значимость в связи с расширением на водоёмах рекреационных зон и восстановлением промышленного рыболовства.

Целью данной работы являлось провести оценку гельминтофауны карповых рыб из водоемов Центральной зоны РФ.

Паразитологическому анализу было подвергнуто 380 экз. рыб из сем. Cyprinidae. Видовой состав был представлен основными представителями этого семейства лещом, густерой, плотвой, красноперкой, карасем серебряным, линем, уклейкой, жерехом. Материал собирался летом в 2012 – 2014 гг. во время проведения лова рыб из квоты, выделенной для научных целей из Белгородского и Старооскольского водохранилищ (Белгородская обл.), Матырского водохранилища, реки Дон и Воронеж (Липецкая обл.), Тамбовского водохранилищ и реки Цна (Тамбовская обл.).

Паразитологический анализ проводили общепринятыми в ихтиопаразитологии методами (Быховская-Павловская, 1969; Определитель паразитов, 1984, 1985, 1987; Звягина, 1995; Беэр, 2005).

Зараженность рыб гельминтами оценивали: по встречаемости или экстенсивности (Э.И., %), по интенсивности инвазии средней (И.И. ср., экз./рыбу), по амплитуде заражения (А.И.И., экз./рыбу) и индексу обилия (И.О., экз./рыбу).

В Белгородском водохранилище у карповых рыб обнаружено 13 видов гельминтов (таблица 1), основная их часть представлена трематодами (69%) на стадии метацеркарий (исключение составляет *Asymphylodora kubanikum*).

Таблица 1. Гельминтофауна карповых рыб в водоемах Белгородской области

№	Вид гельминтов	Белгородское водохранилище	Старооскольское водохранилище
1.	<i>Diplozoon paradoxum</i>	плотва, лещ	плотва, лещ, густера
2.	<i>Diplostomum chromatophorum</i>	красноперка, лещ, густера, плотва	карась серебряный, плотва, лещ
3.	<i>Tylodelphys clavata</i>	лещ	плотва
4.	<i>Ichtyocotylurus pileatus</i>	лещ	_*
5.	<i>Ichthyocotylurus erraticus</i>	лещ, густера, карась серебряный	-
6.	<i>Postodiplostomum cuticola</i>	красноперка, лещ, плотва	-
7.	<i>Paracoenogonimus ovatus</i>	лещ, красноперка	плотва
8.	<i>Pseudoamphistomum truncatum</i>	лещ	лещ, карась сер.
9.	<i>Asymphylodora kubanikum</i>	линь	-
10.	<i>Ligula intestinalis</i>	лещ	лещ
11.	<i>Digramma interrupta</i>	лещ	-
12.	<i>Caryophyllaeus laticeps</i>	лещ	-
13.	<i>Philometra ovata</i>	лещ	-

Примечание: - \* паразиты этого вида не обнаружены.

Широко распространенными видами являются *Diplostomum chromatophorum* (локализирующиеся в хрусталиках глаз), *Ichtyocotylurus erraticus* (в области сердца), *Postodiplostomum cuticola* (под кожей) и *Paracoenogonimus ovatus* (в мышцах).

Эпидемиологически значимый вид гельминтов *Pseudoamphistomum truncatum*, был обнаружен в мышцах лещей, встречаемость (Э.И.) составляла 11% при И.И. ср. 10 экз./рыбу.

Плероцеркоиды цестод *Ligula intestinalis* и *Digamma interrupta* обнаружены в полости тела лещей, интенсивность инвазии составляла от 3 до 4 экз./рыбу. Одновременно при паразитировании ремнецов выявлены нематоды *Philometra ovata* от 2 до 5 экз./рыбу.

В **Старооскольском водохранилище** у карповых рыб обнаружено 6 видов гельминтов (таблица 1). Моногенеи *Diplozoon paradoxum* были выявлены на жабрах у плотвы, леща и густеры, А.И.И. составляла от 8 до 16 экз./рыбу.

У лещей (Э.И.=30%) в полости тела обнаружены плероцеркоиды *L. intestinalis*. Несмотря на заражение ремнецами, упитанность рыб оставалась высокой.

Остальные 4 вида гельминтов представлены метацеркариями трематод. В стекловидном теле и хрусталиках были обнаружены *T. clavata* (у плотвы) и *D. spathaceum* (у карася, плотвы и леща). В мышцах у плотвы выявлены цисты *P. ovatus* (И.И.=10 экз./рыбу), а у лещей (Э.И.=30%) и серебряных карасей (Э.И.=20%) - *P. truncatum* (И.И.ср.=10 экз./рыбу).

В **Матырском водохранилище** гельминтофауна карповых рыб представлена 9-ю видами. Также же, как и в водохранилищах Белгородской области доминирующими являются трематоды (60%) (таблица 2).

Род *Diplostomum* был представлен 2 видами – *D. spathaceum* (у плотвы, леща и линя), *D. chromatophorum* (у плотвы, леща, густеры и красноперки). У красноперки и плотвы, в стекловидном теле глаз обнаружены ещё и метацеркарии *Postodiplostomum brevicaudatum*.

Метацеркариями трематод *P. ovatus* наиболее интенсивно был заражен лещ И.И. достигала 140 экз./рыбу. *Aspidogaster limacoides* (класс *Aspidogastrea*) обнаружены в кишечниках у красноперки и плотвы (И.И.=1 экз./рыбу).

Зараженность рыб цестодами в Матырском водохранилище оказалась не высокой. Выявлены всего 2 вида из этой группы



паразитов – *Ligula intestinalis* у лещей в полости тела и *Caryophyllaeus laticeps* у них же в кишечнике.

В реке Дон гельминтофауна карповых рыб представлена 8-ю видами. Два вида моногеней были обнаружены на жабрах – у лещей *Dactylogyrus fabcatus* и *Paradiplozoon pavlovskii* – у жереха. Временные эктопаразиты пиявки *Piscicola geometra* выявлены в ротовой полости у лещей. Остальные 63% гельминтов были представлены трематодами видовой состав, которых достаточно близкий во всех обследованных водоемах (таблица 2).

Таблица 2. Гельминтофауна рыб из водоемов Липецкой области

№	Вид паразитов	Матырское водохранилище	р. Дон	р. Воронеж
1.	<i>Dactylogyrus fabcatus</i>	-	лещ	-
2.	<i>Paradiplozoon pavlovskii</i>	-	жерех	-
3.	<i>Tyloodelphys clavata</i>	плотва, лещ, густера, красноперка, линь	-	красноперка, плотва, густера
4.	<i>Diplostomum paraspathaceum</i>	-	-	красноперка
5.	<i>Diplostomum spathaceum</i>	плотва, лещ, линь	карась серебряный	плотва, густера
6.	<i>Diplostomum chromatophorum</i>	плотва, лещ, густера, красноперка	-	-
7.	<i>Postodiplostomum brevicaudatum</i>	плотва, лещ, красноперка	-	красноперка, плотва
8.	<i>Postodiplostomum cuticola</i>	-	-	красноперка
9.	<i>Sphaerostomum bramae</i>	-	лещ	-
10.	<i>Paracoenogonimus ovatus</i>	плотва, лещ, линь, карась серебряный	плотва, язь, жерех	красноперка, плотва, густера
11.	<i>Pseudoamphistomum truncatum</i>	-	плотва	красноперка, густера
12.	<i>Ichthyocotylurus erraticus</i>	плотва, лещ, густера	жерех	густера
13.	<i>Aspidogaster limacoides</i>	плотва, красноперка	-	-
14.	<i>Ligula intestinalis</i>	лещ	-	-
15.	<i>Caryophyllaeus laticeps</i>	лещ	-	-
16.	<i>Piscicola geometra</i>	-	лещ	-

Интенсивность инвазии карповых рыб гельминтами в р. Дон не высокая, что может свидетельствовать только о паразитоносительстве. Наиболее интенсивно был заражен язь мышечными трематодами *P. ovatus*, И.И. составляла 90 экз./рыбу.

В реке Воронеж у карповых рыб обнаружено 8 видов гельминтов. Видовой состав представлен широко распространенными видами гельминтов из р.р. *Diplostomum*, *Tyloodelphys*, *Postodiplostomum*, *Ichthyocotylurus*, *Paracoenogonimus* и *Pseudoamphistomum* (таблица 2).

Массовое заражение метацеркариями трематод *Postodiplostomum cuticola* было выявлено у красноперки. И.И. достигала 120 экз./рыбу, в среднем составляла 33,5 экз./рыбу при встречаемости у 86% рыб. Цисты с метацеркариями локализовались на теле, плавниках, жаберных крышках рыб.

Таблица 3. Гельминтофауна рыб из водоемов Тамбовской области.

№	Вид гельминтов	Тамбовское водохранилище	р. Цна
1.	<i>Paradiplozoon bliccae</i>	лещ	-
2.	<i>Tyloodelphys clavata</i>	линь, лещ	лещ
3.	<i>Diplostomum spathaceum</i>	лещ, карась серебряный	жерех, лещ
4.	<i>Diplostomum mergi</i>	лещ	жерех, густера
5.	<i>Diplostomum paraspathaceum</i>	лещ	-
6.	<i>Postodiplostomum cuticola</i>	лещ, красноперка	-
7.	<i>Paracoenogonimus ovatus</i>	-	лещ, густера
8.	<i>Pseudoamphistomum truncatum</i>	лещ	жерех, лещ, густера
9.	<i>Ichthyocotylurus erraticus</i>	лещ, красноперка	лещ
10.	<i>Ichthyocotylurus pileatus</i>	лещ	лещ
11.	<i>Ichthyocotylurus variegatus</i>	линь, карась серебряный	-
12.	<i>Asymphyiodora demeli</i>	линь	-
13.	<i>Asymphyiodora kubanica</i>	линь	-
14.	<i>Bucephalus polymorphus</i>	линь	-
15.	<i>Caryophyllaeus laticeps</i>	лещ	-
16.	<i>Ligula intestinalis</i>	лещ	-
17.	<i>Digramma interrupta</i>	лещ	-
18.	<i>Philometra abdominalis</i>	лещ	-
19.	<i>Philometra ovata</i>	лещ	-

В 2014 г. интенсивность инвазии *P. ovatus* у красноперки составила до 670 экз./рыбу, у плотвы - до 510 экз./рыбу, у густеры – до 120 экз./рыбу. В предыдущие годы (2012-2013 г.г.) уровень заражения этими паразитами был значительно ниже.

В Тамбовском водохранилище у карповых рыб обнаружено 17 видов паразитов (таблица 3).

Из широко распространенных гельминтов встречались метацеркарии трематод из р.р. *Diplostomum*, *Ichthyocotylurus* 3-х видов (таблица 3).

В 2014 г. наиболее массово был заражен лещ *I. erraticus*, локализуемыми в области сердца (Э.И. достигала до 90%; И.И. ср. составила 33 экз./рыбу; А.И.И. от 1 до 67 экз./рыбу, И.О.=30 экз./рыбу). Другие два вида этого вида (*I. pileatus*, *I. variegates*) были обнаружены на серозных оболочках брюшной полости и почках у леща, серебряного карася и линя в единичных количествах.

Из других видов гельминтов эпизоотическое значение в Тамбовском водохранилище имеют *Ligula intestinalis* и *Digramma interrupta*. Эти паразиты были обнаружены в полости тела у лещей (42%) от 1 до 3 экз./рыбу.

В реке Цна у карповых рыб обнаружено 7 видов паразитов (таблица 3). Метациркулярии из р. *Diplostomum* выявлены 2-х видов: *D. spathaceum* и *D. mergi*, которые локализовались в хрусталиках глаз у лещей, жереха и густеры. Около 90% обнаруженных диплостомид представлены *D. spathaceum*, который имеет эпизоотическое значение.

У 90% лещей в мышцах обнаружены цисты трематод *P. ovatus* и *P. truncatum*. Эти же виды паразитов обнаружены в мышцах у густеры, а у жереха - только единично *P. truncatum*.

У лещей обнаружены метациркулярии трематод из р. *Ichthyocotylurus* двух видов *I. pileatus* и *I. erraticus*.

**Заключение.** Таким образом, гельминтофауна карповых рыб из водоемов Центральной зоны РФ насчитывает 25 видов гельминтов. Большая часть гельминтов представлена трематодами (17 видов), среди которых эпизоотическое значение имеют р.р. *Diplostomum* (5 видов) и *Ichthyocotylurus* (3 вида). Кроме того, эпизоотическое значение в водоемах Центральной зоны РФ у карповых рыб имеют цестоды р.р. *Ligula* и *Digramma*. Одновременно при паразитировании ремнецов обнаружены нематоды *Philometra ovate*.

Во всех обследованных водоемах, за исключением Матырского водохранилища выявлен эпидемиологически значимый гельминт *Pseudoamphistomum truncatum*, метациркулярии, которого обнаруживали в мышцах леща, плотвы, язя и жереха.

Список литературы

Безр С.А. Биология возбудителя описторхоза. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. 336 с.

Быховская - Павловская И.Е. Паразитологическое исследование рыб // Методы паразитологических исследований. Л.: Наука, 1969. вып. 1. 108 с.

Догель В.А., Быховский Б.Е. Паразиты рыб Каспийского моря // М.-Л., 1938. 150 с.

Иванов В.М. Динамика зараженности рыб метацеркариями, вызывающими «чернопятнистое» заболевание в низовьях дельты Волги // В кн.: Заповедники СССР, их настоящее и будущее. Зоологические исследования (тез. Докл.) Новгород, 1990. Ч. 3. С. 58.

Иванов В.М., Семёнова Н.Н., Калмыков А.П. Гельминты в экосистеме дельты Волги. Том 1. Трематоды. Монография. Отв. Редактор к.б.н. Н.А. Литвинова // Астрахань: ГП Ао Издательско-полиграфический комплекс «Волга», 2012. 255 с.

Исюмова Н.А. Паразитофауна рыб водохранилищ СССР и пути ее формирования. Л., «Наука», 1977. 284 с.

Жохов А.Е. Итоги изучения опасных для человека гельминтозов в бассейне Рыбинского водохранилища // Рыбинское водохранилище и прибрежные территории: современное состояние и перспективы развития / Материалы науч.-практич. конф-ции. – Ярославль: ИПК «Индиго», 2011. С. 36-38.

Звягина В.В. Структурно-функциональные особенности метацеркарий *Opisthorchis felineus* оптимизация способов обеззараживания и контроля рыбы, инвазированной личинками возбудителя описторхоза. Автореф. дисс... канд.биол.наук. Тюмень, 1995. 16 с.

Определитель паразитов пресноводных рыб. Под ред. О.Н. Бауера. В 3-х томах Л.: Из-во «Наука». Т.1, 1984. 428 с.; Т.2, 1985. 425 с.; Т.3, 1987. 583 с.

Петухов А.Н. Изменение видового разнообразия и экология паразитических Metazoa рыб Горьковского водохранилища. Автореф. кан. биол. наук. М., 2003. 23 с.

## **HELMINTHOFAUNA IN CARP FISHES FROM WATER BODIES OF THE CENTRAL ZONE OF THE RUSSIAN FEDERATION**

Romanova<sup>1</sup> N.N., Golovina<sup>2</sup> N.A., Golovin<sup>1</sup> P.P.

Helminthofauna in carp fishes from water bodies of the Central Zone of the Russian Federation numbers (by our data) 25 species of helminths. The most part of helminths is represented by trematodes. Helminths from the genera *Diplostomum* and *Ichtyocotylurus* – *Ligula*, *Digramma* – are of the epizootic importance. An epidemiologically important helminth, *Pseudoamphistomum truncatum*, has been revealed, which metacercariae were found in muscles of bream, roach, ide and *Aspius aspius*.

# ПАЗАРЫТЫ ПРЫМЫСЛОВЫХ РАКООБРАЗНЫХ ОХОТСКОГО МОАЯ И ИХ ВЛИАНИЕ НА КАЧЕСТВО ПРОДУКЦИИ

Т.В. Рязанова

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Камчатский научно-исследовательский институт  
рыбного хозяйства и океанографии»,  
Петропавловск-Камчатский, Россия,  
e-mail: [ryazanova.t.v@kamniro.ru](mailto:ryazanova.t.v@kamniro.ru)*

Охотское море является наиболее продуктивным для промысла ракообразных на Дальнем Востоке. В настоящее время промысел основан на трех видах крабоидов (камчатский, синий, раношипый) и трех видах крабов-стригунов (опилио, Бэрда, ангулятус). Из креветок, главным образом, промышленляют северную креветку. Еще несколько видов крабов и креветок считают перспективными в промысловом отношении (Долженков, Кобликов, 2009).

У ракообразных известно множество вирусных, бактериальных и паразитарных патогенных агентов. Некоторые из них наносят серьезный экономический ущерб промыслу и аквакультуре ракообразных и занесены Международным эпизоотическим бюро в список особо опасных (ОИЕ, 2009).

Лишь немногие из патогенов промысловых беспозвоночных опасны для здоровья человека. Актуальные для Российской Федерации заболевания, передаваемые человеку через нерыбные объекты, к которым относят и ракообразных, указаны в санитарных правилах и нормах (Профилактика СанПиН 3.2.1333-03, 2003). Три из них передаются через головоногих моллюсков, два - через двустворчатых моллюсков и лишь одно (парагонимоз) - через ракообразных. Это паразитарное заболевание вызывается несколькими видами трематод рода *Paragonimus* и характеризуется хроническим течением с поражением легких, головного мозга и других органов. Заражение человека происходит при употреблении в пищу пресноводных ракообразных. На Дальнем Востоке случаи парагонимоза связаны

с употреблением в пищу японского мохнаторукого краба *Eriocheir japonica*, который распространен в Амурском и Приморском краях и на о. Сахалин, включая его Охотоморское побережье. Мохнаторукий краб обитает в морских прибрежных районах и способен длительное время находиться в пресных водах, совершая кормовые миграции вверх по рекам до 50 км. В отличие от Китая, в России большого промыслового значения японский мохнаторукий краб не имеет, ведется его ограниченный вылов. За исключением трематод рода *Paragonimus* все известные на сегодняшний день паразиты промысловых ракообразных, обитающих в Охотском море, для человека не опасны. Вместе с тем, некоторые из них напрямую влияют на качество продукции.

Прежде всего, следует отметить паразитическую динофлагеллату рода *Hematodinium*, вызывающую «горькую болезнь» или синдром «горького краба». Название говорит само за себя - мясо зараженных ракообразных приобретает очень горький вяжущий вкус и в пищу не пригодно. Инвазия была впервые обнаружена у крабов *Carcinus maenas* и *Liocarcinus depurator* в Европейских водах и длительное время считалась редкой. За последние три десятка лет паразит был зарегистрирован у широкого круга хозяев во многих точках Мирового океана и в настоящее время признан одним из опаснейших паразитов, причиняющих серьезный ущерб популяциям промысловых ракообразных (Stentiford, Shields, 2005). В Охотском море инвазия *Hematodinium* sp. выявлена у трех видов королевских крабов (камчатского, синего и равношипного) и краба-стригуна опилио (Метелев, Рязанова, 2012; Рязанова и др., 2013). Встречаемость заболевания не превышает 1,5%. Визуальные признаки «горькой болезни» выражены достаточно ярко и включают «меловую» непрозрачную окраску экзоскелета, а также изменение цвета и консистенции гемолимфы ракообразных. У больных животных она густая и желтого оттенка. Кроме того у крабов-стригунов обоих видов отмечают розовый оттенок покровов. На основании этих признаков возможна выбраковка больных экземпляров из уловов.

Непригодны для использования и ракообразные в случае инвазии микроспоридиями. Поскольку большинство микроспоридий ракообразных паразитирует в клетках мускулатуры, обычным визуальным признаком инвазии является белая, непрозрачная, похожая на вареную мускулатура больного животного. В Охотском море зараженные микроспоридиями экземпляры встречаются в уловах северной, углохвостой, равнолапой креветок, шримса охотского. Микроскопические исследования показали, что хотя визуальные признаки инвазии у креветок идентичны, заболевания вызваны микроспоридиями, относящимися к трем родам и, как минимум, к двум семействам (Рязанова, Устименко, 2014). В восточной и северо-западной частях Охотского моря у камчатского, синего и равношипного крабов мускулатуру поражают микроспоридии рода *Ameson*. У крабов этих же видов и крабов-стригунов паразитируют микроспоридии, принадлежащие к роду *Thelohania*, причем эти микроспоридии заселяют не мускулатуру, а соединительную ткань (Рязанова, Елисейкина, 2010; Рязанова и др., 2013). У берегов Аляски это заболевание называют «творог» или «домашний сыр» («cottage cheese») из-за того, что полость тела больных крабов заполнена белыми творожистыми сгустками (Sparks, Morado, 1985). В целом, превалентность микроспоридиозных инвазий у промысловых ракообразных в исследованных районах Охотского моря невысока и составляет от 1 до 2,5% (Рязанова и др., 2013).

Синдром «чёрного налёта» (black mat syndrome) или «асфальтовая» болезнь поражает крабов-стригунов рода *Chionoecetes*. Заболевание вызывает патогенный грибок *Trichomarix invadens*. Название инфекции обусловлено чёрной плотной массой, похожей на асфальт, покрывающей поверхность экзоскелета крабов. Сильно зараженные экземпляры, особенно если налетом покрыты конечности, непригодны для промышленной переработки. В Охотском море больные крабы встречаются в шельфовой зоне о. Сахалин и в районе банки Ионы. Непосредственный ущерб, связанный с выбраковкой из-за этого заболевания, незначительный. В районе банки Ионы среди самцов, достигших промысловой меры, доля больных особей

составляет в среднем около 0,4% (Клинушкин, Рязанова, 2014). У о. Сахалин максимальная превалентность инфекции у самцов достигала 1% (Стексова, 2004). Для сравнения, средняя превалентность заболевания у крабов-стригунов Бэрда в Беринговом море в районе острова Кадьяк достигает 12,7% (Hoskin, 1983).

Корнеголовый рак *Briarosaccus callosus* - паразит нескольких видов крабов-литодид. Под абдоменом зараженного краба развивается крупная фасолевидная экстерна оранжевого цвета, а во все внутренние органы проникают ярко-зеленые тонкие отростки интерны паразита. Товарной ценности такие крабы не имеют. В восточной части Охотского моря *B. callosus* часто встречается у равношипного краба. По нашим данным, в 2010 г. в восточной части Охотского моря, зараженность краба этого вида составляла 10%. По данным В.В. Исаевой с соавторами (2005) в 2000 г. доля крабов этого вида, зараженных *B. callosus*, составляла 6,95%. Отмечены единичные случаи заражения синего и камчатского крабов.

Ракообразные, зараженные микроспоридиями, горькой болезнью, корнеголовым раком, сильно пораженные «асфальтовой» болезнью непригодны для использования и подлежат выбраковке. Метод, используемый на судах, как правило, один - выбрасывание за борт. Чтобы не допускать повышения уровня зараженности корнеголовым раком в популяциях промысловых крабов, неоднократно предлагалось соблюдать элементарное правило - уничтожать выловленных больных особей на борту судна (Полтев, 2008; Исаева и др., 2005). Одним из путей заражения ракообразных микроспоридиозами, «горькой болезнью», вирусными инфекциями является каннибализм. Поэтому выбрасывать инфицированных особей за борт недопустимо. Их необходимо уничтожить, причем следует иметь в виду, что при замораживании споры микроспоридий и вирусы остаются жизнеспособными. Учитывая, что в процессе промысла судно может перемещаться на большие расстояния, речь уже идет не столько о безопасности и качестве продукции из гидробионтов, сколько о безопасности самих гидробионтов в отношении заноса патогенных агентов в свободные от них



популяции. Проблема утилизации погибших особей имеет место и при перевозке живых ракообразных, продаваемых на экспорт. В настоящее время этот вопрос вообще никак не регламентируется.

По сравнению с другими регионами Мирового океана, зараженность промысловых ракообразных Охотского моря патогенами, влияющими на товарное качество продукции в настоящее время, низкая. Так, например, в глубоководных фьордах у берегов Британской Колумбии зараженность корнеголовым раком в популяциях равношипного краба может достигать 40% и более (Sloan, 1984). Из-за массовой зараженности крабов-стригунов Бэрда «горькой болезнью» некоторые районы промысла у юго-западных берегов Аляски длительное время избегались рыбаками (Morado, 2011). Для предотвращения распространения патогенов в популяциях промысловых ракообразных в российских морях следует разработать правила и нормы выбраковки и утилизации гидробионтов в районах промысла и при их перевозке в живом виде для любых целей (пищевых, акклиматизации, искусственного воспроизводства или др.).

#### Список литературы

Ветеринарно-санитарный кодекс водных животных. Всемирная организация охраны здоровья животных (ОИЕ). 12-е издание. 2009. <http://www.oie.int>. 328 с.

Долженков В.Н., Кобликов В.Н. Современное состояние промысловых ресурсов основных видов крабов Охотского моря и перспективы их промышленного изъятия // Тез. докл. X съезда Гидробиологического общества при РАН. Владивосток: Дальнаука. 2009. С. 125.

Исаева В.В., Долганов С.М., Шукалюк А.И. Корнеголовые ракообразные - паразиты промысловых крабов и других десятиногих // Биология моря. 2005. Т. 31. № 4. С. 256-261.

Клинушкин С.В., Рязанова Т.В. «Асфальтовая» болезнь в популяции краба-стригуна *Chionoectes opilio* северной части Охотского моря // Сб. науч. тр. Камчат. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии «Исслед. водных биол. ресурсов Камчатки и северо-зап. части Тихого океана». 2014. Вып. 35. С. 63–73.

Метелёв Е.А., Рязанова Т.В. Некоторые паразиты равношипного краба *Lithodes aequispinus* северной части Охотского моря // Мат. докл. отчётной сессии ФГУП «МагаданНИРО» по рез. науч. исслед. 2012 г. Магадан: МагаданНИРО. 2013. С. 97–100.

Полтев Ю.Н. Паразитирование корнеголового рака *Briarosaccus callosus* (Rhizocephala) на крабе *Paralomis verrilli* (Crustacea: Lithodidae) в водах юго-восточного Сахалина // Биология моря. 2008. Т. 34. № 3. С. 190–195.

Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации. СанПиН 3.2.1333-03. МЗ РФ. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. 2001. 67 с.

Рязанова Т.В., Елисейкина М.Г. Микроспоридии родов *Thelohania* и *Ameson* у двух видов крабов-литодид Охотского моря // Биология моря. 2010. Т. 36. № 6. С. 429-436.

Рязанова Т.В., Устименко Е.А. Основные результаты обследования промысловых ракообразных прикамчатских вод в 2012–2013 гг. // Сб. науч. тр. Камчат. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии «Исслед. водных биол. ресурсов Камчатки и северо-зап. части Тихого океана». 2014. Вып. 34. С. 51–61.

Рязанова Т.В., Харламенко В.И., Устименко Е.А. Инфекционные и инвазионные заболевания и их распространенность у промысловых крабов на шельфе Западной Камчатки // Сб. науч. тр. Камчат. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии «Исслед. водных биол. ресурсов Камчатки и северо-зап. части Тихого океана». 2013. Вып. 29. С. 125–136.

Стексова В.В. Морфофизиологическое состояние краба-стригуна опилио (*Chionoecetes opilio*: Brachyura: Majidae) в водах Сахалина в связи с воздействием на него некоторых организмов эпибиоза. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГТА. 2004. 18 с.

Hoskin G.P. Fungus invasion of legs of the tanner crab, *Chionoecetes bairdi* // Applied and Environmental Microbiology. 1983. V. 46. № 2. P. 499–500.

Morado J.F. Protistan diseases of commercially important crabs: A review // J. Invertebrate Pathol. 2011. V. 106. P. 27–53.

Sloan N.A. Incidence and effects of parasitism by the rhizocephalan barnacle, *Briarosaccus callosus* Boschma, in the golden king crab, *Lithodes aequispina* Benedict, from deep fjords in northern British Columbia, Canada // J. of Experimental Marine Biology and Ecology. 1984. V. 84. № 2. P. 111–131.

Sparks A.K., Morado J.F. A preliminary report on the diseases of Alaska king crabs / Proceedings of the International King Crab Symposium, Alaska Sea Grant Report No. 85–12. - Fairbanks: University of Alaska Fairbanks. 1985. P. 333–339.

Stentiford G.D., Shields J.D. A review of the parasitic dinoflagellates *Hematodinium* species and *Hematodinium*-like infections in marine crustaceans // Diseases of Aquatic Organisms. 2005. V. 66. № 1. P. 47–70.

## **PARASITES OF COMMERCIAL CRUSTACEANS OF OKHOTSK SEA AND THEIR IMPACT ON PRODUCT QUALITY**

T.V. Ryazanova

Some parasitic pathogens may affect on the safety and quality of commercial crustaceans. In the Sea of Okhotsk they are microsporidia, dinoflagellates *Hematodinium* sp., rhizocephalans *Briarosaccus callosus*, parasitic fungi *Trichomarix invadens*. Only trematode *Paragonimus* spp. is dangerous for human health.

**ВЛИЯНИЕ МЕТАЦЕРКАРИЙ ТРЕМАТОДЫ  
*CRYPTOCOTYLE* НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ  
БЫЧКА-КРУГЛЯКА *NEOGOBIOUS MELANOSTOMUS*  
(АЗОВСКОЕ МОРЕ)**

Е.Н. Скуратовская, Т.Б. Ковыршина, И.И. Дорохова,  
А.А. Неганова

*Институт морских биологических исследований  
им. А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь, Россия, e-mail:  
skuratovskaya2007@rambler.ru*

Изучение взаимных адаптаций паразитов и их хозяев представляет несомненный интерес, так как позволяет понять механизмы реорганизации метаболизма двух организмов, существующих совместно в течение достаточно длительного времени. Изменения, происходящие в организме обоих партнеров, могут проявляться на разных уровнях биологической организации, включая молекулярный. Инвазия вызывает биохимические перестройки зараженных тканей и может привести к серьезным структурным и функциональным изменениям в отдельных органах и организме хозяина в целом (Микряков, Силкина, 2006; Соловьев и др., 2010; Руднева и др., 2010; Martinez-Alvarezetal., 2005).

Среди паразитов, вызывающих массовые инвазии морских и пресноводных рыб, наиболее распространенными являются метацеркарии трематод, зачастую оказывающие большее патогенное воздействие на организм хозяина, чем взрослые формы паразита (Соловьев и др., 2010; Извекова, Тюнин, 2011).

В бассейне Черного и Азовского морей распространены трематоды рода *Cryptocotyle*. На стадии метацеркарии они поражают рыб, преимущественно бычковых. Типичными окончательными хозяевами *Cryptocotyle* являются водные и околоводные рыбацкие птицы. Имеются также сведения о паразитировании марит *C. linguay* млекопитающих, даже у человека (Корнийчук, Мартыненко, 2009).

Метацеркарии *Cryptocotyle* локализуются в коже, мышцах и жабрах рыб. Большое количество трематод приводит к развитию

серьезных патологий, значительно снижающих массу и упитанность рыбы. Одним из промежуточных хозяев *Cryptocotyle* является бычок-кругляк *Neogobius melanostomus* – основной промысловый объект Азовского моря. Бычка-кругляка метацеркарии *Cryptocotyle* поражают часто и с высокой интенсивностью инвазии (до нескольких тысяч личинок на поверхности тела рыбы) (Корнийчук, Мартыненко, 2009). Поэтому изучение последствий его зараженности метацеркариями представляет несомненный теоретический и практический интерес.

Цель работы заключалась в изучении влияния метацеркарий трематод рода *Cryptocotyle* на биохимические параметры азовского бычка-кругляка *Neogobius melanostomus*.

Исследования проводили на 2-годовалых самцах (36 экземпляра), отловленных в прибрежной зоне села Семеновка (Арабатский залив Азовского моря) в июне 2014 г. Паразитологический анализ осуществляли путем подсчета численности метацеркарий на теле рыб (Корнийчук, Мартыненко, 2009).

Материалом для биохимических исследований служили мышцы рыб. Активность антиоксидантных ферментов (каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД), пероксидазы (ПЕР), глутатионредуктазы (ГР), глутатион-S-трансферазы (GST)), холинэстеразы (ХЭ) аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаргатаминотрансферазы (АСТ) определяли методами, описанными ранее (Rudneva et al., 2012). Содержание малонового диальдегида (МДА) анализировали по образованию окрашенного комплекса с тиобарбитуровой кислотой. Сравнительный анализ данных осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента.

Паразитологический анализ показал, что все исследованные экземпляры бычка-кругляка были заражены метацеркариями *Cryptocotyle*. Интенсивность инвазии (ИИ) составила от 9 до 360 паразитов.

В результате паразитологического исследования рыб разделили на три группы в зависимости от степени зараженности. В первую (I) группу включили рыб, ИИ которых составила от 9

до 37 цист (низкая степень инвазии), во вторую (II) группу – от 52 до 94 (средняя степень инвазии), в третью (III) группу – от 100 до 360 (высокая степень инвазии). Проводили сравнительный анализ биохимических параметров в мышцах рыб их трех групп.

При изучении влияния заражения метацеркариями *Cryptocotyle* на биохимические параметры установлены определенные отличия у рыб из трех групп (табл.). Метацеркариями трематод *P. ovatus* наиболее интенсивно был заражен лещ ИИ достигала 140 экз./рыбу. *Aspidogaster limacoides* (класс *Aspidogastrea*) обнаружены в кишечниках у красноперки и плотвы (И.И.=1 экз./рыбу).

Таблица. Биохимические показатели в мышцах бычка-кругляка с разной степенью заражения метацеркариями *Cryptocotyle*

Показатель	I группа (n=12)	II группа (n=15)	III группа (n=9)
СОД, усл. ед./мг белка/мин	8,69±1,3	8,67±2,69	11,35±1,16
КАТ, мг H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мг белка/мин	0,015±0,001*	0,015±0,001*	0,01±0,001
ПЕР, опт. ед./мг белка/мин	0,026±0,0018*#	0,02±0,003	0,02±0,001
ГР, нмоль НАДФН/мг белка/мин	0,42±0,08*	0,3±0,04	0,25±0,03
GST, нмольконъюг./мг белка/мин	5,97±1,35	8,75±2,28	5,07±0,77
ХЭ, мкмоль/мг белка/ч	8,06±1,2*#	4,79±0,68	5,22±0,54
АЛТ, мкмоль /мг белка/ч	0,091±0,017	0,065±0,009	0,085±0,024
АСТ, мкмоль /мг белка/ч	0,182±0,021	0,157±0,011	0,169±0,024
МДА, нмоль/мг бел	0,63±0,03*	0,62±0,04*	0,74±0,04

# - различия достоверны по сравнению со значениями рыб II группы, \* - тоже по сравнению со значениями рыб III группы при  $p \leq 0,05$ ; n – количество рыб

В мышцах сильно зараженных рыб активность антиоксидантных ферментов КАТ и ГР ниже, тогда как концентрация МДА выше, чем у особей с низкой и средней степенью инвазии. Активность ПЕР и ХЭ у рыб II и III групп снижена по сравнению с особями I группы. Активность СОД, GST, АЛТ, АСТ не имеет достоверных отличий в мышцах рыб из трех групп (табл.).

Адаптации хозяев к присутствию паразита обеспечиваются защитными системами, деятельность которых направлена на снижение негативного влияния и уничтожение токсичных метаболитов. Одной из защитных систем организма является антиоксидантная (АО) система, предохраняющая организм от окислительного стресса, вызванного биотическими и абиотическими факторами. Баланс процессов перекисного

окисления липидов (ПОЛ) и АО активности отражает адаптационные возможности живых организмов, а его смещение приводит к патологическим изменениям, повреждению молекулярных и клеточных структур (Руднева и др., 2010).

Паразиты, влияя на обмен веществ зараженных рыб, стимулируют окислительный стресс, проявляющийся в усилении свободнорадикальных и перекисных процессов. В результате инвазии в организме хозяев усиливается синтез активных форм кислорода, вызывающих элиминацию паразитов, что может привести к ингибированию активности антиоксидантных ферментов самого хозяина (Микряков, Силкина, 2006; Руднева и др., 2010; Bello, et al., 2000; Martinez-Alvarez et al., 2005).

Обнаруженное в наших исследованиях увеличение концентрации МДА – конечного продукта ПОЛ в мышцах сильно зараженных бычков обусловлено нарушением липидного обмена, индуцируемом усилением свободнорадикальных и перекисных процессов и ослаблением антиоксидантной защиты, о чем свидетельствуют минимальные значения активности КАТ, ПЕР и ГР в мышцах сильно зараженных рыб (табл.). Снижение активности данных ферментов является следствием ингибирующего действия как активных форм кислорода, образующихся в макрофагах хозяина, так и высоких концентраций метаболитов паразитов, вызывающих окислительный стресс у рыб. Отсутствие отличий в активности СОД и GST в мышцах рыб из трех групп может свидетельствовать об устойчивости данных ферментов к присутствию паразитов.

Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, показывающих изменение прооксидантно-антиоксидантных процессов в организме рыб, инвазированных как метацеркариями трематод, так и другими видами паразитов. Так, при заражении пресноводной пятнистой рамдии *Rhamdia quelen* трематодами *Clinostomum detrunctum* активность КАТ и СОД в мышцах не изменялась, тогда как уровень ПОЛ значительно увеличивался (Bello, et al., 2000). Другими авторами было установлено, что пораженные плероцеркоидами *Ligula intestinalis* лещи *Abramis brama* характеризуются высоким

содержанием МДА и низкой антиоксидантной активностью, что связано с повышением стрессирующего влияния паразитов и развитием окислительного стресса (Микряков, Силкина, 2006). Ранее нами было установлено, что у черноморского шпрота *Sprattus sprattus phalericus*, зараженного личинками нематоды *Hysterothylacium aduncum*, активность КАТ и ПЕР значительно снижена (Скуратовская, Завьялов, 2006).

Снижение активности ХЭ в мышцах рыб с высокой степенью инвазии, возможно, является следствием ингибирования фермента антихолинэстеразными метаболитами паразитов, что может привести к блокаде холинэргических синапсов, нарушению двигательной активности, тетании и параличу (Podolska M., Nadolna K., 2014). Можно предположить, что ингибирование ХЭ активности, является одним из адаптивных механизмов паразитов, направленных на снижение степени подвижности хозяев. При ослаблении двигательной активности инвазированных рыб шансы завершения паразитом жизненного цикла возрастают за счет увеличения вероятности селективного выедания таких рыб окончательными хозяевами (Извекова, Тютин, 2011). Аналогичные результаты были получены при исследовании влияния метацеркарий *Cryptocotyle* на состояние бычка-кругляка из устья р. Черная. У рыб с высоким уровнем заражения активность ХЭ была ниже, чем у особей с низкой степенью инвазии (Юрахно и др., 2013).

АЛТ и АСТ играют центральную роль в белковом обмене и широко используются как биомаркеры самых различных состояний гидробионтов, в том числе и для оценки паразитарного влияния (Ali, Ansari, 2012; El-Seifyetal, 2011). Отсутствие отличий в активности аминотрансфераз может свидетельствовать о том, что метацеркарии не оказывают влияния на метаболизм белков бычка-кругляка. Известно, что белки тканей рыб, в отличие от углеводов и липидов, являются более стабильной пластической основой их тела. Чем выше запасы жиров и углеводов, тем меньше колебания белкового состава тканей рыб (Куровская, 2000). В то же время, другими авторами установлено повышение активности аминотрасфераз в крови карпа *Cyprinus carpio*, зараженного моногенеями *Dactylogyrus* и *Gyrodactylus*, (Ali,

Ansari, 2012), сома *Clarias gariepinus* и ориохромиуса *Oreochromis niloticus* при инфицировании моногенными и членистоногими, что указывает на поражение печени и мышц (El-Seifyeta., 2011).

Таким образом, результаты исследований показали, что при сильном заражении бычка кругляка *Neogobius melanostomus* метацеркариями *Cryptocotyle* активность КАТ, ПЕР, ГР, ХЭ в мышцах снижается, а концентрация МДА повышается. Выявленные изменения свидетельствуют о смещении равновесия в проокислительно-антиокислительной системе в сторону усиления перекисных процессов и нарушении работы холинэргических синапсов при высокой интенсивности инвазии.

#### Список литературы

1. Извекова Г.И., Тютин А.В. Встречаемость партенит у моллюсков и влияние метацеркарий *Apophallus muehlingi* (Jagerskiold, 1898) *Posthodiplostomum cuticola* (Nordmann, 1832) на некоторые биохимические характеристики рыб // Биология внутренних вод. 2011. № 3. С. 72–77.
2. Куровская Л.Я. Влияние смешанной инвазии на содержание общего белка в органах годовиков карпа, выращиваемых на теплых водах // Гидробиологический журнал. 2000. Т. 36. № 5. 97.
3. Микряков В.Р., Силкина Н.И. Характеристика показателей перекисного окисления липидов в системе паразит – хозяин на примере *Ligula intestinalis* L. (Cestoda, Hseuodophyllidea) – *Abramis brama* L. // Биология внутренних вод. 2006. № 4. С. 63–66.
4. Руднева И.И., Завьялов А.В., Скуратовская Е.Н. Роль молекулярных систем в защитных реакциях рыб, зараженных паразитами // Рибнегосподарство України. 2010. № 1. С. 2–6.
5. Скуратовская Е.Н., Завьялов А.В. Влияние паразитарной инвазии на активность некоторых антиокислительных ферментов тканей черноморского шпрота (*Sprattus sprattus phalericus* R.) // Рибнегосподарство України. 2006. № 5–6. С. 54–55.
6. Соловьев М.М., Кашинская Е.Н., Глухов В.В. Зараженность метацеркариями сем. Diplostomidae и активность пищеварительных ферментов молоди ельца сибирского *Leucis cusleucis cusbaicalencis* (Dyb) в реке Каргат бассейна озера Чаны // Сибирский экологический журнал. 2010. Т. 5. С. 763–771.
7. Юрахно В.М., Скуратовская Е.Н., Дорохова И.И., Мартыненко И.М., Ткаченко М.Н. О возможном воздействии массовых видов микроспоридий и трематод на биохимические параметры рыб в эстуарии р. Черная (Севастополь) // XV Конференція українського наукового товариства паразитологів (Чернівці, 15 – 18 жовтня 2013 р.): тези доповідей. Київ, 2013. С. 107.
8. Ali H., Ansari K.K. Comparison of hematological and biochemical indices in healthy and monogenean infected common carp, *Cyprinus carpio* // Annals of Biological Research. 2012. 3 (4). P. 1843–1846.



9. Bello A.R.R., Fortes E., Bello-Klein A.A. et al. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctatum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen* // Diseases of Aquatic Organisms. 2000. V. 42. P. 233-236.

10. El-Seify M.A., Zaki M.S., Desouky A.R.Y., Abbas H.H., Hady O.K.A., Zaid A.A.A. Study on Clinopathological and Biochemical Changes in Some Freshwater Fishes Infected With External Parasites and Subjected to Heavy Metals Pollution in Egypt // Life Science Journal. 2011. 8(3). P. 401-405.

11. Martinez-Alvarez RM, Morales AE and Sanz A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. Reviews in Fish Biology and fisheries. 2005. V. 15. P. 75-88.

12. Podolska M., Nadolna K. Acetylcholinesterase secreted by *Anisakis simplex* larva (Nematoda: Anisakidae) parasitizing herring, *Clupea harengus*: an inverse relationship of enzyme activity in the host-parasite system. Parasitology Research. 2014. V. 113. P. 2231-2238.

13. Rudneva, I.I., Skuratovskaya E.N., Dorohova I.I., Kovyrshina T.B. Use of fish blood biomarkers for evaluation of marine environment // World Journal of Science and Technology. 2012. V.2 (7). P. 19-25.

### **INFLUENCE OF TREMATODA *CRYPTOCOTYLE* METACERCARIAE ON BIOCHEMICAL PARAMETERS OF ROUND GOBY *NEOGOBIOUS MELANOSTOMUS* (AZOV SEA)**

Skuratovskaya E.N., Kovyrshina T.B., Dorohova I.I., Neganova A.A.

Comparative study of biochemical parameters in muscles of round goby *Neogobius melanostomus* with different rates of trematoda *Cryptocotyle* metacercariae infection showed decrease of catalase, peroxidase, glutathione reductase and cholinesterase activities and increase of Malonaldehyde level in heavily infected fish. Superoxide dismutase, glutathione-S-transferase, alanine transaminase and aspartate transaminase activities were similar in all fish groups. Our results suggest that high intensity of infection lead to displacement of pro-oxidant - antioxidant equilibrium strengthening the peroxide processes and violation of nerve impulse transmission.

### **МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МОЛЛЮСКА *ANODONTA CYGNEA* (Linne, 1798) ИНВАЗИРОВАННОГО ВОДНЫМИ КЛЕЩАМИ ИЗ РОДА *UNIONICOLA* HALDEMAN, 1842**

А.С. Соколова, О.Д. Жаворонкова, В.Р. Микряков,  
С.В. Кузьмичева

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина  
РАН, 152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н*

*Anodonta cygnea* (Linne, 1798) – один из наиболее распространенных в пресноводных экосистемах двустворчатый

моллюск, обитающий в прибрежных зонах медленно текущих водотоков или постоянных стоячих водах: озерах, прудах, реках и водохранилищах. Живет на глубине не менее 1,5-2 метров на заиленных песчаных грунтах, со слабым течением и хорошо прогреваемых участках. По образу жизни, характеру выполняемой функции относится к донным фильтраторам и играет важную роль в очищении водоема от биологических и абриогенных загрязнителей (Старобогатов, 1988; Алимов, 1967).

Кроме того, *Anodonta cygnea* является окончательными хозяевами для водяных клещей из рода *Unionicola* (Саенко, Балан, 2010; Жаворонкова, Песня, 2013; Hevers, 1980и др.). Водяные клещи имеют сложный цикл развития, имеющий при основной схеме множество вариантов. В частности, онтогенез вида *Unionicola ypsilophora* (Bonz, 1783), представителя рода *Unionicola*, по Геверсу (Hevers, 1980) состоит из 8 онтогенетических стадий: имаго, яйцо, предличинка, предпаразитическая, паразитическая личинка, дейтонимфа и имаго. Паразитическая фаза развития проходит на личинках, куколках и имаго.

Водный клещ, жизнь которых связана с моллюсками, используют ткани хозяина (мантия, нога, жабры) для откладки яиц, развития покоящихся стадий и, в некоторых случаях, как место постоянного жилища для взрослых и нимфических стадий (Hevers, 1980). Существует мнение, что клещи, заражающие моллюсков, вызывают воспалительные процессы у хозяев и служат причиной их массовой гибели (Силина, 2011). Это позволяет выдвинуть положение, что клещи-униониколиды вызывают у моллюсков повреждение механизмов иммунного гомеостаза, и как следствие, снижение иммунитета, приводящие к гибели их хозяев.

К настоящему времени сведения о функциональном состоянии иммунной защиты у инвазированных водяными клещами моллюсков в доступной литературе отсутствуют.

Цель настоящей работы – изучение иммунофизиологических и морфометрических показателей у двустворчатых моллюсков *Anodonta cygnea*, инвазированных водяными клещами из рода *Unionicola*.

Материалом для исследования служит *Anodonta cygnea*, отловленные на открытых прибрежных участках Волжского плеса Рыбинского водохранилища в ноябре 2014 года. Всего было собрано 40 особей моллюска из которых 19 зараженные клещами рода *Unionicola*. После отлова анодонт содержали в аэрируемых аквариумах емкостью 25-50 литров при температуре 5-10°C. Оценку морфометрических и иммунофизиологических показателей проводили в ноябре, феврале и марте по размерно-весовым показателям, содержанию неспецифических иммунных комплексов, интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях мышц и жабр.

Одновременно определяли экстенсивность и интенсивность инвазирования анодонт водяными клещами с помощью бинокулярного микроскопа МБС-9 и исследовательского микроскопа МБИ-3. Морфометрические показатели установили по С.Я. Цалолихин, 2004.

Неспецифические иммунные комплексы (ИК) изучали методом селективной преципитации полиэтиленгликолем с молекулярной массой 6000 (Гриневиц, Алферов, 1981), адаптированным нами для моллюсков. Содержание ИК определяли спектрофотометрически при длине волны 450 нм.

Интенсивность ПОЛ в тканях оценивали 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 (Андреева и др., 1988). Результаты исследований подвергали статистической обработке.

Анализ полученных результатов показал, что зараженные особи отличались от здоровых количественными характеристиками исследуемых показателей (табл.).

При исследовании морфометрических показателей установлено, что у неинвазированных особей общая масса моллюска, масса жабр и ноги в 2-3 раза, а длины в 1,5 раз меньше, чем у инвазированных.

Водяные клещи выявлены среди особей имеющих высокие морфометрические характеристики. У инвазированных

униониколидами показатели длины, общей массы тела, ноги и жабр, неспецифических ИК в тканях ног и жабр существенно превышали таковые у моллюсков без униониколитов.

Установленные различия в морфометрических показателях между паразитами и неинвазированными особями показали, что зараженность моллюсков зависит от возраста. Это свидетельствует о том, что с повышением возраста у *A. cygnea* снижается устойчивость к заражению клещами рода *Unionicola*, что вероятно, обусловлено снижением функции механизмов иммунной защиты. Косвенно это подтверждается данными исследований содержания в тканях мышц и ног ИК.

Известно, что ИК – комплекс антиген-антитело, избыточное образование которых, как правило, происходит при насыщении организма чужеродными агентами (Гриневиц, Алферов, 1981). Данные комплексы выполняют важную роль в процессах регуляции иммунных реакций и поддержании иммунофизиологического гомеостаза. Повышенное содержание ИК в исследуемых тканях инвазированных моллюсков по сравнению со здоровыми особями указывает на снижение клиринговой функции фагоцитарной системы анодонт по нейтрализации и удалению ИК из циркулирующей гемолимфы.

Таблица. Морфометрические и физиологические показатели моллюсков

Показатели	здоровые		зараженные	
	Февраль	Март	Февраль	Март
Число, экз.	7	14	5	14
Общая масса, г	65,00±16,15	52,37±11,04	100,20±9,04	160,64±17,49*
Масса жабр, г	2,56±0,65	1,61±0,37	3,35±0,65	5,16±0,62*
Масса ноги, г	3,90±0,59	2,54±0,50	4,38±0,54	5,25±0,47*
Длина раковины, мм	8,34±0,79	7,42±0,55	10,64±0,76	12,11±0,50*
ИК ноги, ус. ед.	0,01±0,00*	0,92±0,53	0,03±0,00	5,92±1,96*
ИК жабр, ус. ед.	0,04±0,00	0,64±0,50	0,04±0,01	0,85±0,71
МДА ноги, Нмоль/г	34,21±18,34	16,31±2,59	9,53±1,58	6,15±2,76*
МДА жабр, Нмоль/г	16,22±1,46	11,06±1,99	13,16±0,61	5,87±3,12

Примечание: \* – достоверные отличия при  $p \leq 0.05$ .

У пораженных особей уровень содержания МДА в исследуемых тканях был ниже, чем у интактных. Однако стоит

отметить, что показатель ПОЛ был выше у моллюсков, которых исследовали в феврале.

Таким образом, проведенное исследование морфофизиологических показателей моллюска *Anodonta cygnea* показало более высокие размерно-массовые показатели и уровень неспецифических ИК и низкое содержание МДА у зараженных в сравнении со здоровыми особями. Более низкие показатели МДА, выявленные у пораженных клещами моллюсков свидетельствуют о более высоком уровне содержания антиоксидантов в исследуемых тканях анодонт, либо об общем снижении окислительно-восстановительных процессов в связи с депрессией метаболических процессов у старших возрастных групп исследуемых гидробионтов. Так же это может быть обусловлено общим истощением организма или крупными размерами анодонт, защитная система которых не способна противостоять паразитарному заражению водным клещом рода *Unionicola*.

#### Список литературы

1. Алимов А.Ф. О возможной роли животных-фильтраторов в процессах самоочищения водоемов // Моллюски и их роль в биоценозах и формировании фаун. Л.: Наука. 1967. 305-312 с.
2. Андреева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. 1988. № 11. С. 41–43.
3. Вайнштейн Б.А. Определение личинок водяных клещей. Общая часть. Л.: «Наука» 1980. С. 29-41.
4. Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело. 1981. № 8. С. 493–496.
5. Жаворонкова О.Д., Песня Д.С. Некоторые аспекты биологии и экологии водного клеща *Unionicola Ypsilophora* (Bonz, 1783) (Acariformes: Hydrachnidia) в Рыбинском водохранилище // Материалы V Всероссийского симпозиума по амфибиатическим и водным насекомым. – Ярославль: Филигрань, 2013, 254 с.
6. Саенко Е.М., Балан И.В. Первые данные по взаимоотношениям водяных клещей рода *Unionicola* и пресноводных двустворчатых моллюсков (Bivalvia: Unionidae) Хинганского заповедника и прилегающих территорий // Бюлл. Дальневосточного малакологич. Общ. 2010. Вып. 14. С. 61-66.
7. Силина А.Е. Клещевые паразитозы и массовая гибель беззубок (Mollusca) в затоне Матырского водохранилища в 2011 году // Современные проблемы общей и прикладной паразитологии / Материалы V юбил. научно-практ. конфер. Памяти проф. В.А. Ромашова. 2011. ФГУ «Воронежский гос. прир. биосферный заповедник». Воронеж: «Артефакт». С. 64-69.

8. Соколов И.И. *Hydracarina* – водяные клещи (ч. 1: Hydrachnellae) // Фауна СССР. Паукообразные. М.-Л.: Изд-во АН СССР. 1940. Т. 5. вып. 2. 511 с.

9. Старобогатов Я.И. Раки, моллюски. – Лениздат. 1988. 16-30 с.

10. Тузовский П.В. *Hydrachnidia* / водяные клещи / Определитель пресноводных беспозвоночных России ЗИН РАН. Санкт-Петербург. 1997. С. 13-105.

11. Цалолихин С.Я. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. СПб.: Наука, 2004. Т. 6. 12-18 с.

12. Hevers V.J. Biologisch – ökologische Untersuchungen zum Entwicklungszyklus der in Deutschland auftretenden *Unionicola* Arten (*Hydrachnellae*, *Acari*) // Arch. Hydrobiologie. 1980. Vol. 52, No 3. P. 324-327.

### **MORPHO-PHYSIOLOGICAL INDICATORS OF THE MOLLUSK *ANODONTA CYGNEA* (LINNE, 1758) CONTAMINATED WATER MITE OF THE GENUS *UNIONICOLA***

Sokolova A.S., Zhavoronkova O.D., Mikryakov V.R., Kuzmicheva S.V.

Presents the results of studying the level of nonspecific immune complexes and oxidative processes in the tissues (gills and foot) of the bivalve mollusk *Anodonta cygnea* (Linne, 1798) infested water mites of the genus *Unionicola*. It is established that shellfish were of high dimensional-massovymi performance and the level of nonspecific IR and low content of MDA in infected compared with healthy individuals.

### **ВЛИЯНИЕ АНАЛОГА КОРТИЗОЛА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ИНВАЗИИ ХРУСТАЛИКА ГЛАЗ СТЕРЛЯДИ *ACIPENSER RUTHENUS* МЕТАЦЕРКАРИЯМИ *DIPLOSTOMUM PARASPATHACEUM***

Д.В. Микряков, М.А. Степанова, В.Р. Микряков

Институт биологии внутренних вод РАН, Борок Ярославской  
обл., Россия, e-mail: [daniil@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:daniil@ibiw.yaroslavl.ru)

Метацеркария *Diplostomum paraspathaceum* Schigin, 1965 относится к личиночной стадии развития плоских червей класса Trematoda из семейства *Diplostomatidae* Poiriere, 1986 ведут паразитический образ жизни (Определитель паразитов пресноводных рыб, 1987; Бауер и др., 1977; Грищенко и др., 2013). Они являются этиологической причиной паразитарной катаракты. Массовое инвазирование рыб происходит в основном в весенне-летний период. У пораженных рыб они вызывают

помутнения и разрушения хрусталика глаз и как следствие потерю зрения. Пораженные метацеркариями рыбы становятся легкой добычей дефинитивных хозяев – рыбоядных птиц.

Интенсивность и экстенсивность заражения, как в природе, так и в условиях аквакультуры диплостоматидами вероятно зависит от иммунологического статуса рыб, поскольку частота встречаемости их на рыбах сильно колеблется от 3-20 и более экземпляров на особь (Изюмова, 1977; Соусь, Ростовцев, 2006; Румянцев 2007). Сходные получены нами на 2-х летках стерляди, выращенных на Череповецком тепловодном рыбном хозяйстве «Диана» до начала постановки опытов в лабораторных условиях.

Целью исследования – изучение влияния иммуносупрессивного гормона на инвазирование метацеркариями *D. paraspathaceum* хрусталика стерляди *Acipenser ruthenus*.

Опыты ставились на стерляди в возрасте 2+ средней массой 250–300 г. Рыб содержали в принудительно аэрируемых бассейнах при температуре воды 16–18°C. В качестве гормонального препарата использовали дексаметазон-фосфат (аналог кортизона) фирмы КРКА, Novo mesto, Slovenia. Выбор данного гормона обусловлен тем, что он как это установлено ранее вызывает снижение фагоцитарной активности лейкоцитов, бактерицидную активность сыворотки крови, напряженность иммунитета к бактериям *A. punctata*, и стимулирует интенсивность заражения рыб дактилогирозами (Микряков, 2004, Микряков и др., 2009). Дексаметазон-фосфат – синтетический глюкокортикоидный гормон, отличающийся от природного кортизона прочностью связи со специфическими гормонсвязывающими рецепторами клеток-мишеней (Шрейбер, 1987). Обработку рыб гормоном проводили путем парентеральных инъекций в дозе 0.2 мл или 0.8 мг активного вещества дексаметазон-фосфата на особь, что соответствует уровню содержания кортизола находящихся в состоянии стресса осетровых рыб (Баюнова и др., 2000). Рыбам контрольной группы вводили такой же объём физиологического раствора. Пробы для анализа отбирали перед началом опыта у интактных особей (0 сут) и через 1, 3, 7, 14 сут и после него. Каждая выборка состояла из пяти особей.

Паразитологический анализ рыб проводили по общепринятой методике (Быховская-Павловская, 1985). Зараженность рыб оценивали по индексу обилия метацеркариев приходящихся на 1 особь и частоте встречаемости паразитов в исследуемых выборках.

Результаты исследований подвергали статистической обработке при помощи стандартного пакета программ (приложение Statistica) с использованием  $t$ -теста,  $p < 0.05$ .

Анализ полученных данных показал, что стерлядь на введение физраствора и дексаметазона реагировала изменением исследуемых показателей (таблица). У рыб обработанных физраствором индексы обилия паразитов у особей исследованных до начала опыта, по сравнению с контрольными, существенных изменений не претерпевали, тогда как после обработки гормоном на 3 и 7 сутки превышали таковые по сравнению с интактными (до начала опыта) более чем в 2-3 раза. Контрольные и опытные рыбы отличались показателями экстенсивности заражения хрусталика в исследуемых выборках. Метацеркарии среди контрольных особей на 3-7 сутки были выявлены у 60-40 % рыб, тогда как все опытные стерляди были поражены *D. Paraspithaceum*. Однако к концу срока наблюдения доля пораженных особей снижалась до двух из пяти исследуемых рыб.

Таблица. Частота встречаемости.

Дата отбора проб	<u>физр аство р</u>	<u>дексамета зон</u>
до начала опыта 0 сутки	$\frac{2,60 \pm 0,92}{80}$	$\frac{2,60 \pm 0,92}{80}$
Через 1 сутки	$\frac{3,66 \pm 0,33}{100}$	$\frac{3,20 \pm 0,86}{100}$
Через 3 суток	$\frac{1,33 \pm 0,88}{60}$	$\frac{8,80 \pm 3,85}{100}$
Через 7 суток	$\frac{0,66 \pm 0,66}{40}$	$\frac{5,8 \pm 0,58}{100}$
Через 14 суток	$\frac{1,33 \pm 0,33}{100}$	$\frac{1,40 \pm 0,60}{40}$

Примечание: в числителе индекс обилия, в знаменателе экстенсивность инвазии, %



Незначительное повышение количества паразитов через сутки после начала опыта, вероятно, обусловлены незначительной супрессией механизмов иммунной защиты вызванное хэндлингом и инъекцией. Установленные различия количества метацеркарий трематод между контрольной и опытной группами рыб в первые 3-7 сут указывают на снижение уровня иммунной защиты, вследствие супрессивного влияния дексаметазона на механизмы антипаразитарного иммунитета. Дальнейшее снижение уровня заражения вероятно связано с восстановлением функции иммунной защиты или нейтрализацией последствий влияния гормона на иммунный статус рыб.

Аналогичные направления изменения в первые сут наблюдения были отмечены нами при изучении уровня заражения карпа *Cyprinus carpio* дактилогирусами *Dactylogyrus sp.* после введения адреналина и глюкокортикоидных гормонов (Микряков и др., 2009; 2011). Однако в последующие сроки наблюдения показатели заражения у рыб, обработанных адреналином – снижались, тогда как у особей, обработанных кортизолом – повышались.

Отмеченное увеличение количества трематод в хрусталике глаз, видимо, связано с гормониндуцируемой супрессией функций иммунной системы и созданием благоприятных условий для миграции метацеркарий до стекловидного тела рыб.

#### Список литературы

1. Бауер О.Н., Мусселиус В.А., Николаева В.М., Стрелков Ю.А. Ихтиопатология. М. 1977. с.
2. Баюнова Л.В., Баранникова И.А., Дюбин В.П., Семенкова Т.Б. 2000. Гормональные характеристики осетровых в условиях стресса // Тез. докл. междунар. конф. Осетровые на рубеже XXI века. Астрахань. С. 122-123.
3. Быховская-Павловская И.Е. 1985. Паразиты рыб. Руководство по изучению. Л., Наука, 122 с.
4. Грищенко Л.И., Акбаев М.Ш., Васильков Г.В. Болезни рыб и основы рыбоводства. Учебник. М.: Колос. 2013. 479 с.
5. Изюмова Н.А. Паразитофауна рыб водохранилищ СССР и пути ее формирования. Л., 1977. 284 с.
6. Микряков Д.В. 2004. Влияние некоторых кортикостероидных гормонов на структуру и функцию иммунной системы рыб. Дис. ... канд. биол. наук. М.: ИПЭЭ РАН, 127 с.
7. Микряков Д.В., Микряков В.Р., Степанова М.А. Влияние гормонов стресса (адреналина и глюкокортикоидов) на зараженность карпа *Cyprinus*

*carpio* L. дактилагирусами *Dactylogyrus* sp. // Паразитология, 2009, № 43 (1). С. 90-96.

8. Микряков В.Р., Микряков Д.В., Степанова М.А. Влияние инсулина на инвазирование карпа *Cyprinus carpio* моногенетическим сосальщиком *Dactylogyrus vastator* // Паразитология. 2011. № 4. С. 317-323.

9. Определитель паразитов пресноводных рыб. Л: Наука. 1987.

10. Румянцев Е.А. Паразиты рыб в озерах Европейского Севера. Петрозаводск. 2007. 252 с.

11. Соусь С.М., Ростовцев А.А. Паразиты рыб Новосибирской области. Тюмень 2006. 194 с.

10. Шрейбер В. 1987. Патолофизиология желез внутренней секреции. Прага: Авиценум, 493 с.

### **INFLUENCE OF ANALOGUE CORTISOLE ON INTENSITY INVASION OF THE CRYSTALLINE LENS OF EYES OF STERLET *ACIPENSER RUTHENUS DIPLOSTOMUM PARASPATHACEUM***

Mikryakov D.V., Stepanova M.A., Mikryakov V.R.

Article is devoted studying of influence of dexamethasone on infection of a crystalline lens of eyes of sterlet *Acipenser ruthenus Diplostomum paraspathaceum*. It is shown, that the stress hormone raises an abundance index *Diplostomum paraspathaceum*. The conclusion is drawn, that dexamethasone at fishes suppresses function of antiparasitic immunity.

## **ЛЕРНЕОЗ РЫБ В ЦИМЛЯНСКОМ ВОДОХРАНИЛИЩЕ ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ**

С.Н. Федоткина

ФГБОУ ВПО Волгоградский государственный аграрный  
университет, г. Волгоград, Россия, e-mail: [dyshanbesveta@mail.ru](mailto:dyshanbesveta@mail.ru)

Цимлянское водохранилище – водоем, расположенный на реке Дон в Волгоградской и Ростовской областях, одно из самых продуктивных водохранилищ в России по вылову рыбы. Основными обитателями водохранилища являются такие виды рыбы как карп, щука, сазан, окунь, карась, судак, густера, сом, синец, плотва и другие. На водоёме ловля рыбы происходит в течение всего года, как летом, так и зимой.

Мониторинг гельминтофауны разных видов рыб имеет как теоретическое, так и прикладное значение по показателям естественной рыбопродуктивности. Поэтому мониторинг инвазионных болезней рыб Цимлянского водохранилища

Волгоградской области в настоящее время является актуальным [1].

Лернеоз инвазионная болезнь, возбудителем, которого являются самки рачков из рода *Lernaea*. Рачки из рода *Lernaea* паразитируют на коже рыб, тем самым развивается воспаление, отек, гиперемия с последующим образованием язв, что приводит к гибели рыб.

В 2013 году при мониторинге гельминтофауны рыб Цимлянского водохранилища отмечено большое количество зараженных рыб рачками из рода *Lernaea*. Рыбы, пораженные лернеями, становятся распространителями болезни на следующий год [2].

Сбор материала проводили в ходе полевых исследований с мая по сентябрь 2013 – 2014 гг. в Цимлянском водохранилище. Отлов и изучение рыб проводился по общеизвестным методикам [3]. Лов рыб производился ставным неводом и ставной сетью размером ячеек 35x35; 40x40; 55x55 см. Сбор паразитов проводили общепринятыми методами [4]. Зараженность раб паразитами оценивали по экстенсивности инвазии.

Таблица 1. Результаты ихтиопатологических исследований рыб в Цимлянском водохранилище на зараженность рачками из рода *Lernaea* в 2013 – 2014 годах.

Вид рыб	год					
	2013			2014		
	кол-во иссл-х	кол-во зарж-х	ЭИ	кол-во иссл-х	кол-во зарж-х	ЭИ
Красноперка	16	1	6,25	35	30	85,7
Линь	34	2	5,88	36	28	77,7
Судак	10	1	10	26	10	38,4
Щука	1	-	-	1	-	-
Лещ	12	10	83,3	10	10	100
Густера	20	18	90	9	9	100
Карп	12	9	75	7	5	71,4
Окунь	8	1	12,5	10	5	50
Итого	114	42	36,8	134	97	72,3

По результатам проведенных исследований можно сделать следующий вывод, что наиболее в 2013 году зараженными рачками из рода *Lernaea* были следующие виды рыб: густера (ЭИ 90%), лещ (ЭИ 83,3%), в 2014 году лещ и густера (ЭИ 100%), красноперка (ЭИ 85,7%), линь (ЭИ 77,7%), карп (ЭИ 71,4%), не регистрировали зараженность рачками из рода *Lernaea* у щук.

Таким образом, в водохранилище, имеет место опасное для рыб заболевание – лернеоз, что следует учитывать при проведении рыбохозяйственных мероприятий на этом водоеме. Паразитологам, работающим в данной территориальной зоне, следует продолжать контролировать эпизоотологическую ситуацию по лернеозу рыб, а так же периодически проводить оздоровительные мероприятия, направленные на его ликвидацию.

Список литературы

1. Шинкаренко А.Н., Федоткина С.Н. Паразитофауна рыб в естественных и искусственных водоемах Волгоградской области // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: наука и высшее профессиональное образование. 2007. №4 (8). С. 98-100.
2. Изюмова Н.А. Паразитофауна рыб водохранилищ СССР и пути ее формирования // Л.: Наука, 1977. С. 284.
3. Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных). 4-е изд. перер. и доп. // М.: Пищевая промышленность, 1966. С. 25.
4. Быховская-Павловская, И.Е. Паразитологическое исследование рыб // Л.: Наука. 1969. С. 108.

# СЕКЦИЯ IV. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ОСОБИ, ПОПУЛЯЦИЙ И ЭКОСИСТЕМЫ

## НАКОПЛЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ БЫЧКА-ПЕСОЧНИКА *NEOGOBIOUS FLUVIATILIS* (PALLAS, 1814) В НИЖНЕМ ТЕЧЕНИИ Р. КУРА

Р.Ф. Аббасова<sup>1</sup>, С.Н. Надилов<sup>2</sup>, С.Э. Гумбатова<sup>1</sup>, Н.Ф. Ахмедова<sup>1</sup>,  
С.А. Гусейнова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Бакинский Государственный Университет*

<sup>2</sup>*Азербайджанский Научно-Исследовательский Институт  
рыбного хозяйства, E-mail: [salamat1964@mail.ru](mailto:salamat1964@mail.ru)*

Тяжелые металлы (ТМ), являются одной из приоритетных групп загрязняющих веществ (ЗВ), поступающих в экосистему р. Кура (Абдуев, 2012). Их источники - коммунально-бытовые, сельскохозяйственные и промышленные стоки, включая сточные воды кожевенного производства, предприятий металлургической и горнодобывающей промышленности. Дополнительным источником загрязнения бассейна р. Кура служат многочисленные несанкционированные свалки твердых бытовых отходов, расположенных вдоль побережья в населенных пунктах.

Сведения о микроэлементном составе органов и тканей рыб можно использовать для оценки качества водоема. Рыбы занимают в биоценозах водных экосистем верхний трофический уровень и обладают ярко выраженной способностью, наряду с другими гидробионтами, накапливать ТМ. Повышенное содержание в организме рыб металлов свидетельствует о значительной их концентрации в водной среде, аккумуляции последних в пищевых цепях, функциональном нарушении во всех звеньях экосистемы.

В настоящей работе проанализированы результаты обработки органов и тканей 17 экз. бентофага бычка-песочника *Neogobius fluviatilis* (Pallas, 1814), выловленных в 2013 г. в нижнем течении р. Кура. Рыб препарировали, затем органы и ткани (печень, жабры,

мышца, гонады, мозг) высушивали в сушильном шкафу марки 2В-151 до постоянной массы при температуре 105<sup>0</sup>С. В дальнейшем сухие пробы тканей рыб тщательно растирались в агатовой ступке, а затем подвергались в микроволновой печи MSW-2 фирмы Berghof кислотному разложению в концентрированной азотной HNO<sub>3</sub> (осч) по программе Р 6 в 5 мл 30 % HNO<sub>3</sub> (Т<sub>1</sub> -130° 8 мин, Т<sub>2</sub>-155° 5 мин, Т<sub>3</sub> -170° 12 мин, мощность на всех стадиях 80 %). Полученные растворы анализировались на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно связанной аргоновой плазмой (OES-ICP) Optima 2100 Dv фирмы Perkin Elmer (США) (<http://www.servicelab.ru/docs/as>). Пробы анализировали на наличие валового содержания следующих ТМ: Cu; Zn; Ba; Al; Cd; Cr; Co; As; Fe; Mn; Mo, Ni, Zr, Sr, Ni; Pb; Hg.

Распределение ТМ в тканях и органах гидробионтов характеризуется неравномерностью, что связано с их функциональными особенностями, а также химической активностью самого металла. Металлы по чувствительности к их токсическому действию рыбам располагают в ряд: Ag > Hg > Cu > Pb > Cd > Al > Zn > Ni > Cr > Co > Mn > Sr (Шитиков и др., 2003).

При исследовании органов и тканей на предмет накопления и распределения в них металлов установлены характерные ряды по убыванию концентраций элементов. Ниже приводятся ранжированные ряды по накоплению металлов в органах и тканях бычка-песочника:

Мозг: Fe > Zn > Mn > Zr > Mo > Sr > Rb > Co > Ni > Cu > As > Pb > Cr

Печень: Fe > Zn > Mn > Mo > Zr > Sr > Rb > Cr > Co > Ni > Cu > As > Pb

Жабры: Fe > Zn > Sr > Mn > Zr > Mo > Rb > Cr > Co > Ni > Cu > As > Pb

Мышцы: Zn > Mo > Zr > Sr > Rb > Fe > Mn > Cr > Ni > Co > Cu > As > Pb

Гонады: Zn > Fe > Mo > Zr > Mn > Sr > Rb > Co > Cr > Ni > As > Cu

Анализы показали, что по суммарному содержанию в органах и тканях бычка-песочника микроэлементы образуют следующие ряды:

Ca: жабры > мозг > печень > мышцы > гонады  
Mn: печень > мышцы > жабры > гонады > мозг  
Zn: жабры > печень > гонады > мозг > мышцы  
Fe: печень > жабры > мышцы > мозг > гонады  
Mo: печень > гонады = мышцы > жабры > мозг  
Sr: жабры > гонады > печень > мышцы > мозг  
Rb: печень > мышцы > жабры > гонады > мозг  
Zr: мозг > печень > мышцы = гонады > жабры  
Cr: жабры > печень > мышцы > гонады > мозг  
As: жабры > мышцы > печень > мозг > гонады  
Cu: жабры > гонады > печень > мышцы > мозг  
Pb: гонады > жабры > печень > мышцы > мозг

Максимальные концентрации многих ТМ наблюдаются в контактирующих с внешней средой органах – жабрах и также в печени. Полученные нами данные показали максимальную концентрацию свинца в жабрах и гонадах. В гонадах бычков содержание Pb превышает ПДК и варьирует в пределах 0,4-1,5 мг/кг. Это вызывает серьезное беспокойство, так как, может быть причиной мутаций в последующих поколениях.

Таким образом, проведенные исследования позволяют судить об общих тенденциях по локализации элементов в тканях рыб и выявить из числа ТМ наиболее опасные для данной зоны мониторинга.

#### Литература

1. Абдуев М.А. Роль реки Куры в загрязнении Каспийского моря / М.А. Абдуев, Р.А. Исмаилов // Научный журнал Пермского университета «Географический Вестник» 2012. № 3 (22). С. 72-76.

2. Атомная спектроскопия: Руководство по выбору подходящего метода анализа и прибора. От мирового лидера в ААС, ИСП-ОЭС и ИСП-МС Perkin Elmer <http://www.servicelab.ru/docs/as.pdf>

3. Шитиков В.К. Количественная гидроэкология: методы системной идентификации / В.К.Шитиков, Г.С.Розенберг, Т.Д. Зинченко Тольятти: ИЭВБ РАН, 2003. 463 с.

#### **ACCUMULATION OF HEAVY METALS IN ORGANS AND TISSUE OF *NEOGOBIUS FLUVIATILIS* (PALLAS, 1814) IN THE DOWNSTREAM OF THE KURA RIVER**

Abbasova<sup>1</sup> R.F., Nadirov<sup>2</sup> S.N., Humbatova<sup>1</sup> S.E., Achmedova<sup>1</sup> N.F., Guseynova<sup>1</sup> S.A.

In this article study brings out the results about content evaluation of bioaccumulation of the heavy metal in the organs and tissues of the *Neogobius fluviatilis* (Pallas, 1814). Inequal division of metals in the organisms of fish depends of the physical and chemical features of the elements, as well as the features of organs and tissues.

## **ИЗМЕНЕНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВОДЕ И ГРУНТЕ В МОДЕЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ КАСПИЙСКОЙ НЕФТИ**

О.В Баджаева, Н.А Каниева

*Астраханский государственный технический университет,  
г. Астрахань, Россия, [kanievana52@mail.ru](mailto:kanievana52@mail.ru),  
[oliape4enkina@yandex.ru](mailto:oliape4enkina@yandex.ru)*

Нефтепродукты относятся к числу наиболее распространенных в глобальном масштабе опасных веществ, вызывающих тяжелые экологические последствия при загрязнении ими водных объектов. Основными источниками поступления нефтепродуктов в водные объекты являются сточные воды предприятий нефтеперерабатывающей, нефтедобывающей, химической, металлургической и других отраслей промышленности; нефтепродукты часто попадают в воду в результате аварий при перевозке их водным путем и в результате интенсивного судоходства, а также с хозяйственно-бытовыми сточными водами (РД 52.24.476-2007).

В настоящее время предложен широкий спектр технологий с применением различных средств для очистки нефтезагрязненных водных и почвенных объектов, в том числе с использованием биопрепаратов на основе природных углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ).

Эффективность использования биопрепарата для очистки от нефтезагрязнений обусловлена деструктивной активностью микроорганизмов, входящих в его состав, и зависит от дозы загрязнения, норм внесения, интенсивности биодеструкции, соответствия природным условиям объекта, а при использовании иммобилизованных форм биопрепаратов еще и от характеристик носителя (нефтеемкость, гидрофобность) и способа иммобилизации микроорганизмов (Шарапова, 2012).



Целью данной работы явилось исследование воды и из модельных микроэкосистем на микробную обсемененность при дополнительном внесении углеводородокисляющих микроорганизмов.

Для эксперимента отбирали речную воду и грунт из реки Бузан Астраханской области. В качестве биодеструкторов нефти использовали штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов *Serratia grimesii* и *Bacillus sp.* Опыт был поставлен согласно методике постановки экспериментов (Строганов, 1979; Лукьяненко, Карпович, 1989). Добавление нефтеокисляющих микроорганизмов осуществляли по методу Одума, 1986. Были поставлены три опытных варианта модельных микроэкосистем с добавлением нефти в концентрациях: 0,5; 1,0 и 1,5 мл.

Эксперимент по суммарному влиянию нефти и суспензии нефтеокисляющих микроорганизмов на микрофлору модельной системы проводили в течение 30 суток. Отбор проб из модельных систем производили 3 раза: 1- начальная точка 2– через 15 суток; 3 – через 30 суток.

Общую численность сапрофитов определяли методом десятикратных разведений и проращиванием их на плотной питательной среде. Инкубировали посеы в течении 4 суток при температуре 25-27° С. Определение нефтеокисляющей микрофлоры проводили методом десятикратных разведений с последующим проращиванием на плотной минеральной среде М9 с добавлением каспийской нефти 1% по объему. Посевы инкубировали при температуре 25-27°С (Методы..., 1991; Белоусова, 2004; Держинская, 2008).

Результаты исследований выявили, что на начальном этапе эксперимента средняя численность микроорганизмов была на одном уровне порядка  $5-7 \cdot 10^{-4}$  КОЕ/мл. При дальнейшем наблюдении численность микроорганизмов в контрольном варианте несколько увеличилась и на протяжении всего времени эксперимента оставалась на одном уровне ( $16,36-17,7 \cdot 10^{-4}$  КОЕ/мл). Для микроэкосистем, в которые вносили разные концентрации нефти, наблюдалась другая картина. Так, в варианте 1 на 15-е сутки отмечен незначительный рост микрофлоры до  $14,09 \cdot 10^{-4}$  КОЕ/мл, однако на 30 сутки

численность микроорганизмов увеличилась на порядок и достигла  $211,82 \cdot 10^{-4}$  КОЕ/мл. В данном варианте в аквариумы вносили по 0,5 мл нефти, являясь дополнительным источником углерода, данная концентрация нефти спровоцировала резкое увеличение численности микроорганизмов. Кроме этого в начале эксперимента в варианты 1, 2, 3 вносили суспензию исследуемых штаммов, что также могло повлиять на численность микроорганизмов.

В вариантах 2 и 3 наблюдалась похожая картина – увеличения численности микроорганизмов на 30 сутки эксперимента в пределах от 54 до  $70 \cdot 10^{-4}$  КОЕ/мл.

Таблица 1. Общая численность микроорганизмов в воде модельных систем

Вариант модельной системы	Начальные показатели, КОЕ/мл	Через 15 суток эксперимента, КОЕ/мл	Через 30 суток эксперимента, КОЕ/мл
Контроль	$6,82 \cdot 10^{-4}$	$17,7 \cdot 10^{-4}$	$16,36 \cdot 10^{-4}$
Вариант 1	$7,02 \cdot 10^{-4}$	$14,09 \cdot 10^{-4}$	$211,82 \cdot 10^{-4}$
Вариант 2	$5,21 \cdot 10^{-4}$	$6,8 \cdot 10^{-4}$	$54,09 \cdot 10^{-4}$
Вариант 3	$6,36 \cdot 10^{-4}$	$7,27 \cdot 10^{-4}$	$70,45 \cdot 10^{-4}$

Учет численности нефтеокисляющих микроорганизмов до внесения нефти и суспензии штаммов *Serratia grimesii* и *Bacillus sp.* 3 и в течение всего эксперимента представлен в таблице 2.

Результаты, представленные в таблице 2, отражают, что в контроле численность УВО микроорганизмов не изменялась в течение всего эксперимента и оставалась в пределах  $12-17 \cdot 10^{-2}$  КОЕ/мл. Для вариантов 1, 2, 3 отмечается незначительное увеличение численности УВО микроорганизмов. Таким образом, добавление нефти в аквариумы и внесение суспензии нефтеокисляющих микроорганизмов не привело к резкому скачку численности данной группы микроорганизмов.

Таблица 2. Численность углеводородокисляющих микроорганизмов в воде модельных систем

Вариант модельной системы	Начальные показатели, КОЕ/мл	Через 15 суток эксперимента, КОЕ/мл	Через 30 суток эксперимента, КОЕ/мл
Контроль	$12,25 \cdot 10^{-2}$	$15,27 \cdot 10^{-2}$	$17,05 \cdot 10^{-2}$
Вариант 1	$14,12 \cdot 10^{-2}$	$27,2 \cdot 10^{-2}$	$43,18 \cdot 10^{-2}$
Вариант 2	$15,31 \cdot 10^{-2}$	$33,63 \cdot 10^{-2}$	$31,34 \cdot 10^{-2}$
Вариант 3	$12,56 \cdot 10^{-2}$	$27,72 \cdot 10^{-2}$	$21,00 \cdot 10^{-2}$

Под действием различных физических и химических факторов нефть попадает на дно, где накапливается в донных осадках. Поэтому изучение численности микроорганизмов в грунте также важно, как и в воде. Результаты определения общего микробного числа в грунте представлены в таблице 3.

Таблица 3. Общая численность микроорганизмов в грунте модельных систем

Вариант модельной системы	Начальные показатели, КОЕ/мл	Через 15 суток, КОЕ/мл	Через 30 суток, КОЕ/мл
Контроль	$6,12 \cdot 10^{-4}$	$6,36 \cdot 10^{-4}$	$11,02 \cdot 10^{-7}$
Вариант 1	$8,31 \cdot 10^{-4}$	$18,18 \cdot 10^{-4}$	$19,6 \cdot 10^{-7}$
Вариант 2	$6,25 \cdot 10^{-4}$	$17,18 \cdot 10^{-4}$	$24,60 \cdot 10^{-7}$
Вариант 3	$7,56 \cdot 10^{-4}$	$19,50 \cdot 10^{-4}$	$25,90 \cdot 10^{-7}$

Результаты, представленные в таблице 3 свидетельствуют, что в контроле численность микроорганизмов с течением времени практически не изменяется и находится в пределах  $6-11 \cdot 10^{-7}$  КОЕ/мл. Численность микроорганизмов в экспериментальных вариантах (вариант 1, 2, 3) не значительно увеличивается от  $6-7 \cdot 10^{-7}$  КОЕ/мл до  $19-25 \cdot 10^{-7}$  КОЕ/мл.

Численность нефтеокисляющих микроорганизмов в грунте представлена в таблице 4.

Анализ результатов характеризует, что численность УВО микроорганизмов в контроле изменяется незначительно в течение всего эксперимента от  $8,56$  до  $18,2 \cdot 10^{-5}$  КОЕ/мл. Не значительно увеличивается численность УВО микроорганизмов в варианте 2 - от  $6,51$  до  $21,36 \cdot 10^{-5}$  КОЕ/мл. Численность УВО микроорганизмов в варианте 1 на 15-е сутки эксперимента возрастает до  $40,00 \cdot 10^{-5}$  КОЕ/мл и на 30 сутки находится почти в тех же пределах ( $35,5 \cdot 10^{-5}$  КОЕ/мл). Для варианта 3 отмечается постепенное увеличение численности с увеличением времени с  $7,56 \cdot 10^{-5}$  КОЕ/мл до  $20,45 \cdot 10^{-5}$  КОЕ/мл на 15 сутки и до  $64,55 \cdot 10^{-5}$  КОЕ/мл на 30 сутки эксперимента.

Таким образом, сложные микробные сообщества осуществляют с большей полнотой и скоростью окисление НУГВ в водных средах и почвах, так как микроорганизмы в таких сообществах взаимодействуют по типу протокооперации и

получают преимущества за счет совместной «метаболической атаки» на углеводороды (Шарапова, 2012).

Таблица 4. Численность углеводородоксиляющих микроорганизмов в грунте модельных систем

Вариант модельной системы	Начальные показатели, КОЕ/мл	Через 15 суток эксперимента, КОЕ/мл	Через 30 суток эксперимента, КОЕ/мл
Контроль	$8,56 \cdot 10^{-2}$	$13,6 \cdot 10^{-5}$	$18,2 \cdot 10^{-5}$
Вариант 1	$7,12 \cdot 10^{-2}$	$40,00 \cdot 10^{-5}$	$35,5 \cdot 10^{-5}$
Вариант 2	$6,51 \cdot 10^{-2}$	$18,18 \cdot 10^{-5}$	$21,36 \cdot 10^{-5}$
Вариант 3	$7,56 \cdot 10^{-2}$	$20,45 \cdot 10^{-5}$	$64,55 \cdot 10^{-5}$

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что численность гетеротрофной микрофлоры с изменением условий среды (внесение нефти и суспензии нефтеокисляющих микроорганизмов) увеличивается. Однако увеличение не значительное и находится в пределах одного порядка. В контрольных пробах увеличения численности гетеротрофной микрофлоры практически не наблюдается.

Численность нефтеокисляющих микроорганизмов изменяется с увеличением времени воздействия нефти – до 30 суток эксперимента в различной степени для изученных компонентов экосистем. Так, для воды показатели увеличились до  $43 \cdot 10^{-2}$  КОЕ/мл в варианте 2. В грунте максимальные значения численности нефтеокисляющих микроорганизмов характерна для варианта 3 и составила  $64,55 \cdot 10^{-5}$  КОЕ/мл.

#### Список литературы

1. Белоусова Н.И., Шкидченко А.Н. Деструкция нефтепродуктов различной степени конденсации микроорганизмами при пониженных температурах / Н.И. Белоусова, А.Н. Шкидченко // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. №3. С. 312-316.
2. Держинская И.С. Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов / И.С. Держинская. Астрахань. Изд-во АГТУ, 2008. 348 с.
3. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: изд-во МГУ, 1991. 304 с.
4. Лукьяненко В.И.; Карпович Т.Ф.; Биотестирование на рыбах. Методическая рекомендация. Рыбинск, 1989. С.96.
5. Одум Ю. Экология. М.: Мир. 1986. Т.1. С. 328.
6. РД 52.24.476-2007. Массовая концентрация нефтепродуктов в водах. Методика выполнения измерений ИК- фотометрическим методом. 2007.

7. Строганов Н. С. Допустимые уровни загрязнения водоемов. В кн.: Влияние загрязняющих веществ на гидробионтов и экосистемы водоемов. Л., 1979. С. 9-16.

8. Шарапова И.Э. Разработка комплексных форм биопрепарата для биоремедиации загрязненных нефтяными углеводородами почв и водных сред: Автореф. дис. . канд. техн. наук / И.С. Шарапова. Сыктывкар, 2012. С. 153.

#### **THE CHANGE IN THE NUMBER OF MICROORGANISMS IN WATER AND SOIL IN MODEL ECOSYSTEMS UNDER THE IMPACT OF CASPIAN OIL**

Badjaeva O.V., Kanieva N.A.

Experiments were performed to identify the effects of various concentrations of the Caspian oil on some ecosystem components in the experiment with the introduction of the consortium of oil-oxidizing microorganisms, consisting of strains of *Serratia grimesii* and *Bacillus* sp.

#### **МОНИТОРИНГ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ НИЖНЕВОЛЖСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ СТЕРЛЯДИ (*ACIPENSER RUTHENUS*) (ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИССЛЕДОВАНИЙ 2013-2014 гг.)**

М.А. Барегамян, Н.В. Козлова, Е.Г. Макарова, Н.Н. Базелюк  
ФГБНУ «Каспийский научно-исследовательский институт  
рыбного хозяйства», Астрахань, Россия,  
e-mail: [kaspiy-info@mail.ru](mailto:kaspiy-info@mail.ru), [ahchik\\_em@rambler.ru](mailto:ahchik_em@rambler.ru),  
[natali19\\_12@mail.ru](mailto:natali19_12@mail.ru)

Генетическое разнообразие особей в популяции отражается на интенсивности внутривидовых процессов, репродуктивном потенциале особей и экологической пластичности, позволяющей адаптироваться к варьирующим условиям среды обитания. Уровень генетического разнообразия популяции определяется естественным отбором, мутациями, миграциями и случайным дрейфом генов (Хедрик, 1989). Микроэволюционные процессы и экологические факторы неоднозначно влияют на генетическое разнообразие особей и численность популяции стерляди. В 1960-1990 гг. промысловый запас нижеволжской популяции стерляди оценивался в 60,0-80,0 т, вылов составлял 0,1-1,0 т. С 2000 г. её коммерческий лов был приостановлен и изъятие осуществлялось только для целей воспроизводства и научно-исследовательских

работ в качестве прилова при промысле полупроходных и речных видов рыб (Калмыков, Гутенёва, 2011).

Цель исследования – изучить генетическое разнообразие стерляди, выловленной в естественной и искусственной среде в 2013-2014 гг. Стерлядь является широко распространенным ценным видом речных осетровых рыб, она относится к 120-хромосомной группе осетровых (Vasil'ev, 2009).

Материалом для исследования служили пробы фрагментов плавников стерляди (*Acipenser ruthenus*), собранные в 2013-2014 гг. у рыб, выловленных выше г. Астрахани в р. Волге на тоневом участке «Балчуг» (58 экз.) и в районе с. Замьяны (37 экз.). В 2014 г. дополнительно пробы получены от доместичированных производителей и молоди стерляди на НЭБ Центр «БИОС» ФГУП «КаспНИРХ» (31 экз.).

Методы исследований: выделение ДНК солевой экстракцией (Aljanabi, Martinez, 1999), полимеразно-цепная реакция (ПЦР), микросателлитный анализ пяти локусов ядерной ДНК (STR) (Zaneetal., 2006). Гетерозиготность популяции (наблюдаемую и ожидаемую) определяли по частотам аллелей пяти исследуемых локусов. Отрицательное значение разницы между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью характеризует дефицит гетерозигот. Положительное значение разницы между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью характеризует избыток гетерозигот и отражает высокую степень генетического разнообразия в популяции (Сурсо, 2009).

В 2013 г. у стерляди, выловленной на т. «Балчуг», отмечены 41 аллель в пяти исследованных локусах и выявлен дефицит гетерозигот по 4 локусам из 5 исследованных. В выборке стерляди, выловленной в районе с. Замьяны, отмечено 37 аллелей в пяти исследованных локусах и зафиксирован дефицит гетерозигот по 5 локусам. Полученные результаты свидетельствовали о прохождении популяцией стадии «бутылочного горлышка» (одного из микроэволюционных процессов), что ведет к потере аллелей в популяции, снижению интенсивности обмена генетическим материалом между локальными популяциями (Макарова, 2014).

В выборках 2014 г., выловленных на т. «Балчуг» и в районе с. Замьяны, отмечено 43 и 35 аллелей в пяти локусах соответственно. Дефицит гетерозигот в среднем отмечен по 1 локусу из 5 исследованных. В природных популяциях дефицит гетерозигот может возникать в результате низкой численности особей и близкородственного скрещивания производителей (Политов, 2007).

У доместичированных производителей стерляди, исследованных в 2014 г., отмечено 30 аллелей в пяти исследованных локусах, дефицита гетерозигот не зафиксировано. У молоди, полученной в результате близкородственного скрещивания, отмечено 25 аллелей в пяти исследованных локусах и дефицит гетерозигот по 2 локусам.

Таким образом, по результатам молекулярно-генетического анализа пяти локусов ядерной ДНК, проведенного в лаборатории физиологии и генетики рыб научно-экспериментального комплекса по молекулярно-генетическим исследованиям, было отмечено, что выборка стерляди в 2013 г. отличалась дефицитом гетерозигот по нескольким локусам, возникшим, вероятно, в результате прохождения популяцией одного из микроэволюционных процессов (стадии «бутылочного горлышка»). Количество аллелей у исследованных особей, выловленных в районе т. «Балчуг» было выше, чем у выборки в районе с. Замьяны и доместичированной стерляди. Самое низкое количество аллелей отмечено у молоди, полученной в искусственных условиях при близкородственном скрещивании. Проблема снижения генетического разнообразия стерляди и выживаемость популяции является актуальной в настоящий период и требует дальнейшего изучения.

#### Список литературы

1. Калмыков В.А., Гутенева Г.И. Современное состояние промыслового запаса стерляди (*Acipenser ruthenus*) L. (1758) в Волго-Каспийском рыбохозяйственном подрайоне (р. Волга и ее водотоки) // Современное состояние биоресурсов внутренних водоемов: мат. докл. 1 Всерос. конф. (12-16 сентября 2011 г., Борок). Т.1. М.:«АКВАРОС», 2011. С. 289-295.

2. Макарова Е.Г., Козлова Н.В., Базелюк Н.Н., Барегамян М.А. Генетические процессы в естественной популяции стерляди // Сохранение водных биоресурсов. Астрахань: АГТУ, 2014. С. 77-82.

3. Политов Д.В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых (*сем. Pinaceae*) Северной Евразии: автореф. дис. на соиск. уч. степ. доктора биол. наук. М.: Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 2007. 47 с.

4. Сурсо М.В. Генетический полиморфизм популяций хвойных европейского севера. Самара: Известия Самарского научного центра РАН, 2009. Т. 11. № 1(3). С. 389-393.

5. Хедрик Ф. Генетика популяций. М: Техносфера, 2003. 592с.

6. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal andrapidsalt – extraction of high quality gnomc DNA for PCR – based techniques // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25 (20). P. 4692-4693.

7. Vasil'ev V. P. Mechanisms of Polyploid Evolution in Fish: Polyploidy in Sturgeons // Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons / Eds. R. Carmona et al.: Springer Science + Business Media B. 2009. Vol. P. 97 – 117.

8. Zane L., Patarnello T., Ludwig A., Fontana F., Congiu L. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) // Mol. Ecol. Notes. 2002. V. 2. P. 586–588.

#### **THE MONITORING OF THE GENETIC DIVERSITY OF THE LOWER VOLGA POPULATION OF STARLET (*ACIPENSER RUTHENUS*) (BY RESULTS OF THE RESEARCHES OF 2013-2014)**

Baregamjan M.A., Kozlova N.V., Makarova E.G., Bazeljuk N.N.

The genetic processes in the population of starlet are under the influence of the environmental factors and micro-evolutional processes, which have an influence on the genetic diversity and quantity of the population. The deficit heterozygote in the sampling of starlet in 2013-2014 showed low genetic diversity and likely passage of the population of the stage “bottleneck”.

#### **ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ МОРФОМЕТРИЧЕСКОГО И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА ИХТИОПОПУЛЯЦИЙ РЕК РОВЕНСКОГО ПЛАТО**

О.А. Бедункова

*Национальный университет водного хозяйства и  
природопользования, Ровно, Украина, [bedunkovaolga@mail.ru](mailto:bedunkovaolga@mail.ru)*

В рамках концепции "здоровья" гидроэкосистем одним из методологических приемов является регистрация физиологических и генетических изменений рыб, что позволяет отразить уровень влияния среды, в частности комплексный характер загрязнения с учетом явлений синергизма действующих



факторов (Garry, 1996). Однако большинство методов являются достаточно сложными и поэтому не могут широко использоваться при исследованиях природных водоемов, а отсутствие программы ихтиологического мониторинга для отдельных физико-географических регионов является препятствием для диагностики "здоровья" гидроэкосистем (Моисеенко, 2010).

Среди наиболее показательных и относительно простых методов оценок состояния гидроэкосистем с использованием рыб в качестве биоиндикаторов, можно отметить микроядерный тест (МЯ-тест) на клетках периферийной крови рыб, который является индикатором стресса и отражает благоприятность водной среды для ихтиопопуляций в данный момент (Shmid, 1965; Моисеенко, 2010). Еще одним оправданным подходом является оценка уровней флуктуирующей асимметрии (ФА) морфологических структур рыб, которая позволяет получить представление об условиях, в которых находился организм на ранних стадиях онтогенеза (Захаров, 2000). Доказано, что регистрация подобных генетических изменений у отдельной особи или группы особей позволяет диагностировать ранние нарушения биотических сообществ и оценить их значимость для всей гидроэкосистемы в ближайшем и отдаленном будущем (Моисеенко, 2000, 2010; Гандзюра, 2004).

Целью наших исследований было определение цитогенетического и морфометрического гомеостаза ихтиопопуляций рек в пределах Ровенского плато (северо-западная часть Украины) и установление их функциональной зависимости для подтверждения возможности объективного использования данных критериев при оценках «здоровья» гидроэкосистем в физико-географических условиях региона.

Контрольные обловы проводились на репрезентативных реках, которые испытывают антропогенную нагрузку разной интенсивности и являются показательными с точки зрения необходимости проведения токсикологических исследований (табл. 1). Исследования вели на протяжении весеннее-летней межени 2013-2014 гг. в после нерестовый период ихтиопопуляций.

Таблица 1. Репрезентативные пункты проведения контрольных обловов рыб рек Ровенского плато

Название и категория реки	Номер пункта	Расстояние от устья, км	Обоснование необходимости проведения токсикологических исследований
Случ (средняя)	1	94,5	влияние сброса сточных вод о/с КП "Коммунальщик" (фон)
	2	71,0	влияние сброса сточных вод о/с КП "Коммунальщик" (0,5 км ниже сброса)
Устья (малая)	3	65,0	верховья реки, природный фон
	4	23,0	влияние сброса сточных вод г. Ровно
	5	0,7	контрольный пункт в устье

Выборки рыб в каждом пункте насчитывали не менее 17 особей (возрастной категории от одно до четырехлеток) наиболее массовых представителей ихтиофауны исследуемого региона (Сондак, 2009): верховодка (*Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758)), карась серебристый (*Carassius auratus gibelio* (Linnaeus, 1758)), лещ (*Abramis brama* (Linnaeus, 1758)), красноперка (*Scardinius erythrophthalmus* (Linnaeus, 1758)), плотва (*Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758)), окунь речной (*Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758)).

Морфометрический гомеостаз ихтиопопуляций оценивали по показателю флуктуирующей асимметрии (ФА). Всего было использовано 9 билатеральных меристичних признаков: количество лучей в грудных и брюшных плавниках; количество жаберных тычинок на первой жаберной дуге; количество лепестков в жаберной перепонке; количество чешуек в боковой линии, количество чешуек с сенсорными канальцами; количество рядов чешуек над и под боковой линией; количество чешуек со стороны хвостового плавника. В качестве показателя асимметрии для межпопуляционного сравнения использовали среднюю частоту асимметричного проявления (ЧАП), которую рассчитывали по формуле Захарова, как отношение числа признаков, которые проявляют асимметрию, к общему числу учтенных признаков (Захаров, 2000).

Цитогенетический гомеостаз оценивали по микроядерному тесту эритроцитов периферической крови рыб. Окраску мазков осуществляли сразу после их доставки в лабораторию, по Романовскому-Гимзе. Учет микроядер проводили под микроскопом с увеличением 10x100 с иммерсией. При подсчете клеток учитывались все виды микроядер и ядерного материала

(Shmid W.). Анализировали от 1000 до 2500 клеток от каждой особи. Результаты расчетов выражали в промилле (‰).

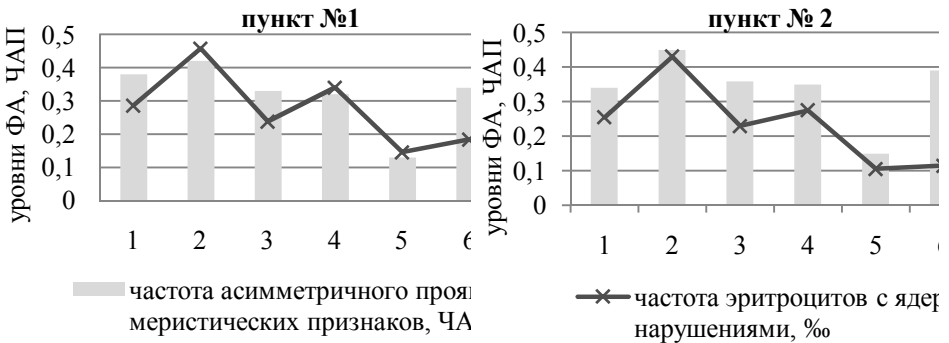


Рис. 1. Сравнение показателей морфометрического и цитогенетического гомеостаза ихтиопопуляций в контрольных пунктах р. Случ: 1 – верховодка; 2 – плотва; 3 – красноперка; 4 – окунь речной; 5 – карась серебристый; 6 – лещ.

Полученные результаты частоты асимметричного проявления меристических признаков рыб и частоты встречаемости эритроцитов с ядерными нарушениями представлены на рисунках 1, 2.

Так, стабильность развития ихтиопопуляций р. Случ характеризовалась средними значениями ЧАП  $0,32 \pm 0,04$  в пункте №1 и  $0,34 \pm 0,05$  в пункте №2, что характеризовало качество водной среды как «начальные (незначительные) отклонения от нормы», а стабильность развития ихтиопопуляций в пределах II баллов.

Цитологические изменения по МЯ-тесту наблюдались только в клетках периферической крови плотвы ( $4,57 \pm 0,42\%$  в п. №1 и  $6,02 \pm 0,19\%$  в п. №2), что свидетельствует о превышении уровня спонтанных мутаций рыб. У остальных проанализированных видов средняя частота ядерных нарушений находилась в пределах физиологической нормы (0,5-4 %) (Житенева, 1997).

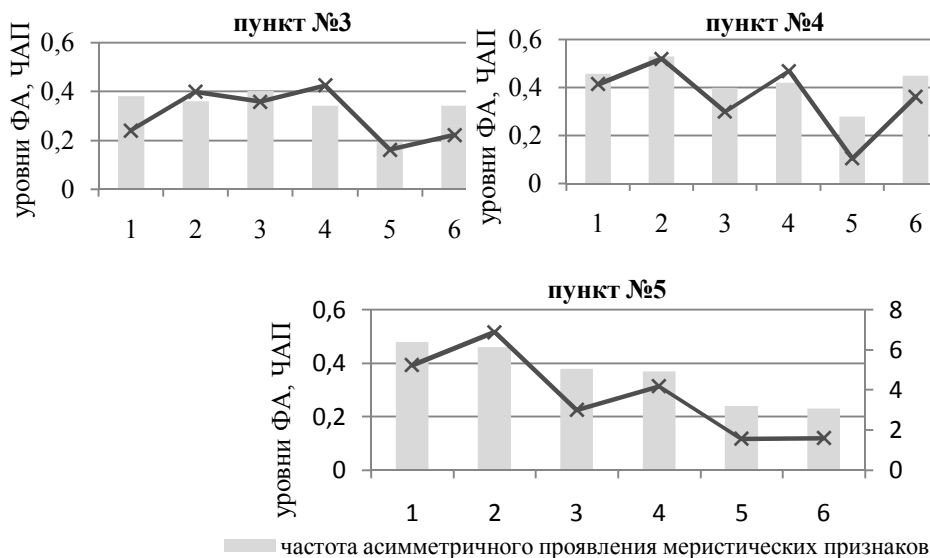


Рис. 2. Сравнение показателей морфометрического и цитогенетического гомеостаза ихтиопопуляций в контрольных пунктах р. Устья: 1 – верховодка; 2 – плотва; 3 – красноперка; 4 – окунь речной; 5 – карась серебрястый; 6 – лещ.

Стабильность развития ихтиопопуляций р. Устья характеризовалась средними значениями ЧАП  $0,34 \pm 0,03$  в п.№3, что характеризовало качество водной среды как «начальные (незначительные) изменения», II балл стабильности развития ихтиопопуляций;  $0,42 \pm 0,04$  в п.№4 - «существенные (значительные) отклонения от нормы» - IV балл;  $0,36 \pm 0,05$  в п.№5 - «средний уровень отклонений от нормы», III балл.

Средний уровень ядерных нарушений периферийной крови рыб в п.№3 составил  $2,98 \pm 0,18\%$ ; в п.№4  $4,7 \pm 0,28\%$ ; в п.№5  $3,44 \pm 0,23\%$ . Превышение уровня спонтанных мутаций наблюдалось у окуня (п.№1) и плотвы во всех контрольных пунктах.

Сравнение полученных показателей ФА и МЯ-теста дает возможность отметить, что синхронность изменений обоих показателей была присуща всем проанализированным видам рыб, кроме леща в п.№1 и п.№2, а также окуня в п.№3 и п.№4. Вероятно, объяснение этому может быть дано при рассмотрении

особенностей физиологических реакций организма, которые могут возвращаться к норме при условии устранения стрессового фактора (Гандзюра, 2004).

Для установления соответствия показателей ФА ихтиопопуляций по отношению к результатам МЯ-теста периферической крови рыб, нами был применен метод простого регрессионного анализа с помощью трендовых моделей (рис. 3).

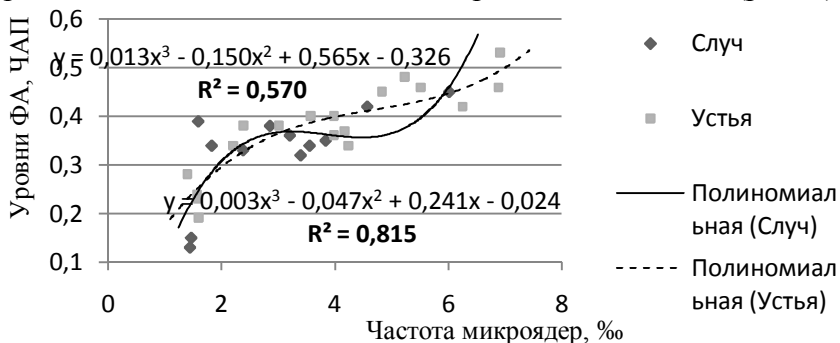


Рис. 5. Функциональная зависимость морфогенетического и цитогенетического гомеостаза ихтиопопуляций репрезентативных рек Ровенского плато

Так, функциональную зависимость между морфометрическим и цитогенетическим гомеостазом ихтиопопуляций описывали полиномиальные модели третьей степени с коэффициентом аппроксимации  $R^2=0,570$  для р. Случ и  $R^2=0,815$  для р. Устья, что свидетельствовало о средней и сильной связи параметров, соответственно. Предполагаем, что при большем наборе параметров теснота связи несколько увеличится, что делает необходимым проведение подобных исследований на дополнительных контрольных створах репрезентативных рек. Однако, установленные уровни функциональной зависимости, свидетельствуют о необходимости применения комплексного подхода для оценки «здоровья» гидроэкосистем региона Ровенского плато. В частности, отзыв ихтиопопуляций на стрессовые факторы водной среды целесообразно оценивать по нескольким показателям (в данном случае по морфометрическому и цитогенетическому гомеостазу), что позволит получить более объективную информацию.

### Список литературы

1. Биологические методы оценки качества вод: Часть 1. Биоиндикация. / Т.И. Моисеенко, С.Н. Гашев, Селюков А.Г. [и др.] // Вестник Тюменского государственного университета. 2010. № 7. С. 20-40.
2. Aquatic Ecosystem Health and Integrity: Problems and Potential Solutions Garry J. Scrimgeour and Dan Wicklum Journal of the North American Benthological Society. Vol. 15, No. 2 (Jun., 1996), pp. 254-261.
3. Захаров В.М., Чубинишвили А.Т., Дмитриев С.Г., Баранов А.С., Борисов В.И., Валецкий А.В., Крысанов Е.Ю., Кряжева Н.Г., Пронин А.В., Чистякова Е.К. Здоровье среды: практика оценки. Центр экологической политики России. Центр здоровья среды. М., 2000. 320 с.
4. Гандзюра В. П. Продуктивність біосистем за токсичного забруднення середовища важкими металами: автореферат дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біол. наук: спец. 03.00.16 “екологія” / Гандзюра Володимир Петрович; Чернівецький націон. ун-т ім. Ю. Федьковича. Чернівці, 2004. 35 с.
5. Shmid W. / The micronucleus test. // Mutat. Res., 1975. V.31, № 1. P. 9-15.
6. Моисеенко Т.И. Морфофизиологические перестройки организма рыб под влиянием загрязнения (в свете теории С.С. Шварца) / Т. И. Моисеенко // Экология, 2000. №6. С. 463-472.
7. Эколого-гематологические характеристики некоторых видов рыб. Справочник / Л.Д. Житенева, О.А. Рудницкая, Т.И. Калужная. Ростов-на-Дону: Изд-во «Молот», 1997. 152 с.
8. Сондак В.В. До питання реабілітації умов відтворення аборигенної іхтіофауни та формування стійкості водного середовища у трансформованій річковій мережі Західного Полісся України / В.В. Сондак // Рибогосподарська наука України. К. 2009. 3 (9). С. 54-60.

### **FUNCTIONAL DEPENDENCE OF MORPHOMETRIC AND CYTOGENETIC HOMEOSTASIS ICHTHYOPOPULATION OF RIVNE PLATEAU RIVERS**

Biedunkova O.A.

The average levels of fluctuating asymmetry reflect minor deviation in the developmental processes of ichthyopopulation in the representative rivers of Rivne plateau with different anthropogenic load. An excess level of spontaneous nuclear violations in red blood cells was observed in perch and roach in paragraphs waste water discharge. The functional relationship between the parameters of homeostasis ichthyopopulation described coefficient approximation  $R^2=0,570$  for r. Slush and  $R^2=0,815$  for r. Ustyа. This demonstrates the need for a comprehensive assessment of the "health" hydroecosystems of this region at the morphometric and cytogenetic homeostasis.

# РЕАКЦИЯ КРОВИ МОЛОДИ ОСЕТРОВЫХ РЫБ НА УСЛОВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ПРИ ТОВАРНОМ ВЫРАЩИВАНИИ

В.Н. Валова, Д.Ю. Амвросов

*Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный  
центр, Владивосток, Россия, e-mail: [vera.valova@yandex.ru](mailto:vera.valova@yandex.ru),  
[vera.valova@tinro-center.ru](mailto:vera.valova@tinro-center.ru)*

Биологических переменных характеризующих состояние отдельных особей, групп организмов, целых популяций и экосистем, теоретически может быть бесконечное множество. Однако среди них имеется относительно небольшое количество параметров тесно связанных с важнейшими показателями состояния группы организмов или отдельных особей. К ним, прежде всего, относятся признаки предетального состояния организма или группы организмов: нарушение репродуктивных способностей, жизненного цикла и др. Исследование популяций любого вида не может обойти вопросы оценки состояния отдельных ее особей. В связи с этим возникает необходимость разработки инструментариев определяющих физиологическое состояние осетровых рыб в современных условиях (в частности, в условиях интенсивного индустриального выращивания), позволяющих своевременно выявлять изменения в состоянии организма рыб вызываемые влиянием абиотических и биотических факторов. Одним из возможных методов, применяемых к этим задачам, может быть анализ гематологических показателей. Кровь, являясь полифункциональной системой организма, чутко реагирует на все изменения как внутренней, так и внешней среды. Реакции крови на изменения функционального состояния особи в ответ на воздействие внешних факторов являются неспецифичными и могут быть использованы как средство диагностики нормального или патологического состояния.

В современном индустриальном рыбоводстве, при интенсивном выращивании осетровых рыб, необходимо проведение мониторинговых работ по оценке физиологического

состояния рыб для выявления ранних признаков различного рода заболеваний, являющихся бичом всех рыбоводных хозяйств, как в России, так и за рубежом.

Цель работы – выявить реакцию крови молоди амурских осетровых рыб на сезонные изменения условий окружающей среды при товарном выращивании.

Сбор материала осуществлялся на НИС Лучегорская ФГБНУ «ТИНРО-Центр» в 2010-2011 гг. в течение зимовки и вегетационного периода. Объектом исследования служила разновозрастная молодь амурского осетра и калуги. В ходе исследований для определения воздействия факторов окружающей среды на организм рыб использовались методы гематологического анализа. Исследовались следующие показатели: общее число эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, СОЭ, общее количество гемоглобина в периферической крови, гематокрит, МСН, МСV, МСНС, наличие патоморфологических изменений в клетках красной и белой крови. Обработка гематологического материала проводилась по общепринятым методикам (Ромейс, 1954, Лилли, 1969, Иванова, 1984) в 2010 г. Весь материал обработан статистически с помощью пакета Excel.

Результаты, полученные в ходе исследований, представлены в таблицах 1, 2. Непосредственно перед зимовкой у разновозрастной молоди амурских осетровых рыб наблюдалось увеличение общего числа эритроцитов в крови, гемоглобина, значений МСН, гематокрит, МСНС на фоне резкого снижения объема эритроцитов и значений СОЭ, что

Таблица 1. Динамика количественных показателей крови у разновозрастной молоди амурских осетровых рыб во время зимовки

Показатели	Калуга		Амурский осетр	
	1+ – 2	0+ – 1	1+ – 2	0+ – 1
Перед зимовкой 25.10-01.11.2010 г.				
Общее количество эритроцитов, млн/мкл	1,130±0,04	0,298±0,05	1,399±0,10	0,80±0,08
Тромбоциты, тыс./мкл	55,30±1,87	93,60±1,26	53,60±1,61	65,00±2,29
Гемоглобин, г/л	84,30±5,41	33,00±2,04	95,4±8,72	51,80±5,24
Гематокрит, об. %	24,79±1,02	16,90±2,14	24,79±1,02	7,59±2,24



Скорость оседания эритроцитов (СОЭ), мм/час	3,90±0,84	12,00±0,42	2,50±0,52	10,60±2,56
Объем 1 эритроцита (MCV), мкм <sup>3</sup>	223,59±14,1 3	631,59±111, 05	186,65±17,0 9	99,05±26,12
Количество гемоглобина в 1 эритроците (MCH), пг	76,10±6,16	146,41±12,8 3	71,30±8,26	70,55±8,41
Концентрация гемоглобина в 1 эритроците (MCHC), г/%	34,11±1,97	34,11±1,97	29,33±4,25	124,07±30,9 9
Во время зимовки 17.02.2011 г.				
Общее количество лейкоцитов, тыс./мкл	42,70±0,37	41,70±0,40	42,20±0,42	42,40±5,37
Общее количество эритроцитов, млн./мкл	1,096±0,07	0,779±0,11	1,223±0,06	0,956±0,05
Тромбоциты, тыс./мкл	85,50±3,28	100,20±3,50	104,40±3,09	107,90±5,37
Гемоглобин, г/л	119,71±27,7 2	46,20±2,86	71,90±4,72	42,80±4,50
Гематокрит, об. %	22,20±1,23	17,19±1,94	24,85±6,03	14,42±1,87
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ), мм/час	4,10±0,86	4,70±0,93	3,10±0,59	5,40±0,91
Объем 1 эритроцита (MCV), мкм <sup>3</sup>	208,25±13,0 2	280,03±57,4 0	201,75±48,8 2	154,22±19,4 4
Количество гемоглобина в 1 эритроците (MCH), пг	121,43±32,8 1	69,49±10,10	59,57±3,92	45,03±3,77
Концентрация гемоглобина в 1 эритроците (MCHC), г/%	53,81±11,80	31,22±5,11	36,06±3,53	31,40±3,23
Окончание зимовки (28.03.2011 - 02.04.2011)				
Общее количество лейкоцитов, тыс./мкл	42,60±0,40	42,2±0,42	43,3±0,42	41,70±0,42
Общее количество эритроцитов, млн./мкл	1,300±0,07	1,144±0,07	1,422±0,04	1,021±0,06
Тромбоциты, тыс./мкл	90,60±1,45	92,10±0,85	80,80±1,51	91,40±1,16
Гемоглобин, г/л	69,10±3,84	50,00±2,09	64,80±4,40	60,70±4,99
Гематокрит, об. %	25,50±2,42	19,55±1,92	27,25±3,27	21,19±2,73
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ), мм/час	3,10±0,62	5,30±0,97	6,20±1,04	2,80±0,42
Объем 1 эритроцита (MCV), мкм <sup>3</sup>	200,57±22,2 3	175,99±20,8 3	195,07±25,2 9	217,09±32,9 3
Количество гемоглобина в 1 эритроците (MCH), пг	54,37±4,47	45,39±3,59	47,03±3,99	61,80±6,90

Концентрация гемоглобина в 1 эритроците (МСНС), г/%	29,21±3,28	30,12±5,18	26,30±2,56	31,78±3,20
---	------------	------------	------------	------------

свидетельствовало о повышении физиологического статуса молодежи. В лейкоцитарной картине крови у двухлеток отмечалось повышение числа эозинофилов, также у обеих возрастных групп молодежи калуги отмечалась нейтрофилопения со сдвигом в сторону незрелых клеток. Необходимо отметить, что произошло снижение на порядок количества тромбоцитов и моноцитов у всей исследованной молодежи. Это означает то, что иммунный статус двухлеток калуги обуславливался практически полностью лимфоцитами.

У сеголетков калуги перед зимовкой в эритроцитарной картине также преобладали юные формы эритроцитов, что свидетельствовало о высоком уровне эритропоэза. У сеголетков калуги в периферической наблюдалось довольно низкое число эритроцитов и очень низкий уровень общего гемоглобина в периферической крови, низкий гематокрит, маленький объем эритроцитов, на фоне очень высокого СОЭ (5,5 мм/час), довольно высоких значений МСН и МСНС. На мазках крови выявлялись патоморфологические изменения красных кровяных клеток такие, как гипо - ортохромазия, кариорексис, вакуолизация цитоплазмы эритроцитов, тени эритроцитов, их гемолиз. Данные изменения обусловлены, как правило, нарушениями обменных процессов и функций печени. Это подтверждается лейкоцитарной картиной крови: лейкоцитопенией (снижение общего числа лейкоцитов при возрастании доли лимфоцитов), нейтрофилопенией со сдвигом в сторону незрелых форм (практически полное отсутствие сегментоядерных нейтрофилов), моноцитопенией и увеличением числа эозинофилов (признак аллергической реакции). Сходная картина красной и белой крови наблюдалась и у сеголетков амурского осетра. Картина крови у сеголетков калуги в начале зимовки свидетельствовала о развитии микроцитарной анемии, вызванной тяжелой степенью липоидной дегенерации печени.

В сравнении с началом зимовки в состоянии эритрона у сеголетков амурского осетра произошли некоторые изменения. Практически в 2 раза снизились значения СОЭ (до 5,4 мм/час

против 10,6 мм/час), что свидетельствует об улучшении физиологического состояния молодежи. Также увеличилось общее число эритроцитов в периферической крови на 156 тыс./мкл. Наблюдалось увеличение значений MCV (объем 1 эритроцита) и гематокрита, при снижении общего гемоглобина в периферической крови и параметров MCH и MCHC (таблица 1). Одновременно понизился цветной показатель, то есть развилась гипохромия (Висмонт и др., 2011; Бяловский и др., 1999), что служит показателем дефицита железа или нарушения его метаболизма. В середине зимовки лейкограмма крови сеголеток амурского осетра стала носить ярко выраженный лимфоидный характер (доля лимфоцитов увеличилась до 77,2%) при этом соотношение больших и малых лимфоцитов сдвинулось в сторону больших (таблица 2). Удельный вес эозинофилов снизился почти в два раза, при резком увеличении в 2,82 раза индекса ядерного сдвига влево на фоне повышения общего количества лейкоцитов в периферической крови. Также уменьшилась доля моноцитов и базофилов, однако, возросла доля пенистых клеток. У сеголеток калуги картина крови в конце зимовки сходна с таковой у сеголеток амурского осетра с незначительными отклонениями.

В конце зимовки у сеголеток амурского осетра в состоянии эритрона произошли изменения: увеличилось общее число эритроцитов, количество общего гемоглобина в периферической крови; снизились по сравнению с данными, полученными перед зимовкой значения MCH, MCHC, зато произошло увеличение значений MCV и гематокрита. Цветной показатель значительно увеличился в сравнении с предыдущим периодом (середина зимовки), но остался на высоком уровне (табл. 1), что в совокупности с увеличением объема 1 эритроцита (MCV) и низкими значениями MCHC говорит о развитии нормоцитарной анемии. У всех исследованных рыб отмечались патоморфологические изменения клеток красной крови, в частности адгезия эритроцитов («монетные столбики»), анизоцитоз, пойкилоцитоз, гемолиз и кариорексис (рис. 1). Часто встречались эритроциты с фестончатыми краями, безъядерные эритроциты, тени эритроцитов. Доля лейкоцитов в периферической крови у молодежи в конце зимовки несколько

увеличилась. В лейкоцитарной формуле крови у молоди также отмечались некоторые изменения. Лейкограмма у всех исследованных рыб по окончанию зимовки носила ярко выраженный лимфоидный характер, на фоне преобладания малых лимфоцитов (табл. 2). Почти в два раза (в сравнении с серединой зимовки) снизилась доля эозинофилов в периферической крови, значения которой достигли верхнего предела нормы для молоди осетровых рыб (9,05%). При этом значительно уменьшилось значение индекса ядерного сдвига в сторону юных форм нейтрофилов (сдвиг влево) на фоне увеличения доли пенистых клеток. У сеголеток калуги в конце зимовки картина крови значительно ухудшилась в сравнении с серединой зимовки.

В период повышения температуры воды в апреле-мае с увеличением пищевой активности показатели красной крови выравнивались у всей исследованной молоди амурских осетровых рыб.

Таблица 2. Динамика количественных показателей крови у разновозрастной молоди амурских осетровых рыб в течение вегетационного периода

Показатели	Калуга		Амурский осетр	
	трехлетки	двухлетки	трехлетки	двухлетки
Преднерестовый период (13.05.2011-20.05.2011)				
Общее количество лейкоцитов, тыс./мкл	39,20±1,04	37,90±1,33	41,70±0,51	38,30±1,25
Общее количество эритроцитов, млн./мкл	1,216±0,11	0,859±0,08	1,109±0,10	1,025±0,08
Тромбоциты, тыс./мкл	57,50±2,54	60,70±3,84	61,00±5,60	58,30±1,04
Гемоглобин, г/л	60,40±5,05	46,40±3,84	70,20±6,08	59,50±3,47
Гематокрит, об. %	30,97±3,47	18,02±1,60	37,53±2,07	25,34±2,46
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ), мм/час	4,20±1,21	2,80±0,47	4,50±0,43	5,30±1,12
Объем 1 эритроцита (MCV), мкм <sup>3</sup>	266,38±30,66	227,95±26,56	359,18±33,39	257,08±26,09
Количество гемоглобина в 1 эритроците (MCH), пг	51,58±3,19	59,96±9,59	65,94±5,94	59,99±5,42
Концентрация гемоглобина в 1 эритроците (MCHC), г/%	23,11±4,40	27,91±3,53	19,14±1,99	25,34±2,58
Период высоких температур воды (29-30 <sup>0</sup> С- 12-18 июля 2011г.)				
Общее количество лейкоцитов, тыс./мкл	42,70±0,33	42,60±0,37	42,6±0,37	43,20±0,44

Тромбоциты, тыс./мкл	70,60±0,54	64,50±2,59	63,2±4,46	61,20±1,88
Общее количество эритроцитов, млн./мкл	1,502±0,07	1,288±0,06	1,373±0,07	1,281±0,12
Гемоглобин, г/л	96,50±4,39	80,00±6,45	76,70±0,28	59,80±2,75
Гематокрит, об. %	28,67±3,06	34,07±2,34	45,56±1,52	24,76±4,42
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ), мм/час	3,90±1,14	3,60±0,58	3,00±0,83	5,60±0,99
Объем 1 эритроцита (MCV), мкм <sup>3</sup>	189,84±18,71	273,71±27,31	347,10±17,88	202,36±42,40
Количество гемоглобина в 1 эритроците (MCH), пг	66,63±4,77	69,74±5,16	56,96±3,07	46,96±4,03
Концентрация гемоглобина в 1 эритроците (MCHC), г//%	39,39±6,30	25,11±3,36	16,50±0,45	32,70±6,03
Перед зимовкой 18.10.-21.10. 2011 г.)				
Общее количество лейкоцитов, тыс./мкл	42,00±0,33	42,4±0,34	42,80±0,39	42,70±0,47
Тромбоциты, тыс./мкл	80,10±2,20	79,30±1,68	79,90±1,89	82,00±1,16
Общее количество эритроцитов, млн./мкл	1,446±0,08	1,359±0,06	1,302±0,05	1,351±0,07
Гемоглобин, г/л	78,10±0,42	75,60±5,31	84,00±5,23	70,20±2,99
Гематокрит, об. %	22,67±1,71	27,27±2,27	29,03±1,86	25,67±2,86
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ), мм/час	4,50±0,70	3,90±1,35	4,30±0,47	7,40±1,35
Объем 1 эритроцита (MCV), мкм <sup>3</sup>	158,31±11,6	204,50±18,38	227,88±20,09	192,30
Количество гемоглобина в 1 эритроците (MCH), пг	54,66±2,95	54,91±4,39	63,43±3,80	55,04±4,11
Концентрация гемоглобина в 1 эритроците (MCHC), г//%	35,56±1,88	28,37±2,64	29,70±2,15	30,88±3,86

Однако наблюдалось значительное увеличение значений гематокритного числа, объема 1 эритроцита (MCV), при снижении концентрации гемоглобина в 1 эритроците (MCHC) у двухгодовиков амурского осетра показывающее на развитие патологических процессов в организме рыб. В целом физиологическое состояние разновозрастной молодежи амурских осетровых рыб в этот период можно считать удовлетворительным.

Несмотря на высокие температуры (29-33<sup>0</sup>С) в середине июля количественные показатели крови у двухлеток амурского осетра и калуги и трехлеток калуги находились в пределах нормы.

У трехлеток амурского осетра отмечалось повышение значений гематокритного числа при резком снижении концентрации гемоглобина в 1 эритроците (анемия с абсолютной гипохромией эритроцитов), что было вызвано снижением активности дыхательных ферментов, вызванным запредельно высокими температурами воды.

Перед зимовкой, несмотря на то, что количественные показатели красной крови у всей молодежи амурских осетровых рыб находились в пределах нормы, в лейкоцитарной формуле отмечался высокий процент эозинофилов (достигающий у отдельных особей 69-72%), свидетельствующий о развитии кумулятивного политоксикоза связанного с загрязнениями водной среды. Также отмечались патоморфологические изменения клеток красной крови: вакуолизация цитоплазмы: гемолиз, гипохромия, кариорексис, пойкилоцитоз.

#### **REACTION BLOOD OF YOUNG STURGEON ENVIRONMENTAL CONDITIONS DURING COMMERCIAL CULTIVATION**

Valova V.N, Ambrosov D.Yu.

Results quantitative and qualitative studies of peripheral blood of juvenile Amur sturgeon during the winter and the growing season have been presented. It was found that the temperature and hydrochemical regimes have a significant impact on red and white blood uneven juvenile Amur sturgeon. This applies particularly to temperature and oxygen regime during the winter and during the very high summer temperatures.

#### **КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ КАСПИЙСКИХ КИЛЕК**

Е.А. Воронина, А.В. Дубовская

*Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства» (ФГБНУ «КаспНИРХ»), Астрахань, Россия, e-mail: kaspiy-info@mail.ru*

В настоящее время загрязнение водной среды остается одним из основных факторов в патологии ихтиофауны. Жизнедеятельность североатлантического вселенца – представителя хищного зоопланктона *Mnemiopsis leidyi* определила масштабные и многообразные функциональные сдвиги в экологических процессах Каспийского моря, начиная от

скорости прохождения биохимических циклов биогенных веществ, структурных качественных и количественных изменений на всех трофических звеньях, включая трофологические аспекты и перераспределение потока энергии через гетеротрофные и миксотрофные (синезеленые водоросли) звенья питания до значительного понижения рыбопродуктивности (Катунин и др., 2013). Не последнюю роль в ухудшении эколого-токсикологического состояния Каспия играет нефтедобыча, которая за последнее десятилетие привела к существенному увеличению содержания нефтяных углеводородов в среднекаспийских водах (Карыгина и др., 2013). Как известно, любые масштабные и устойчивые нарушения качества водной среды способствуют ухудшению состояния промысловых запасов биоресурсов (Евланов и др., 2000; Седов, 2008). В 2001 г. была зарегистрирована массовая гибель каспийских килек, вызванная совокупностью природно-техногенных и антропогенных факторов (Седов и др., 2007). Вследствие существенного снижения промысловых запасов этих видов рыб возникла необходимость в комплексном изучении эпизоотического состояния морской экосистемы.

Основу работы составили материалы ихтиопатологических исследований каспийских килек в сочетании с гистоморфологическим анализом некоторых из них. Отбор проб анчоусовидной и обыкновенной килек осуществляли летом и осенью (2003-2013 гг., 2012 и 2013 гг., соответственно по видам) на стандартных килечных разрезах акватории Среднего и Южного Каспия. Всего проанализировано 12020 экз. анчоусовидной и 935 экз. обыкновенной килек. Ихтиопатологические исследования проводились согласно общепринятым методикам (Лабораторный практикум, 1983). Идентификацию микроскопических грибов осуществляли по определителю патогенных и условно-патогенных грибов (Саттон и др., 2001). Обработка материала для гистологических исследований проводилась стандартными методами (Волкова, 1982). В качестве фиксатора использовали жидкость Буэна и 10% формалин. Просмотр препаратов проводили под микроскопом Olympus Vx100.

Результаты. На начальном этапе исследований (2003-2004 гг.) нарушения, встречавшиеся в органах и тканях рыб, носили слабо выраженный характер. В дальнейшем, с 2005 г., развитие патологического процесса в организме килек проходило с образованием разноразмерных специфических гранул (новообразований), сопровождавшееся гиперемией, гипертрофией и деструктивными изменениями органов обследованных рыб. С 2010 по 2013 гг. основными клиническими признаками нарушений в печени и селезенке килек оставались воспалительные процессы, атрофия и гемосидероз. Одной из причин, вызывающих патологии, в том числе и вышеописанные, является влияние токсических веществ, как экзогенного, так и эндогенного действия (Грищенко и др., 1999).

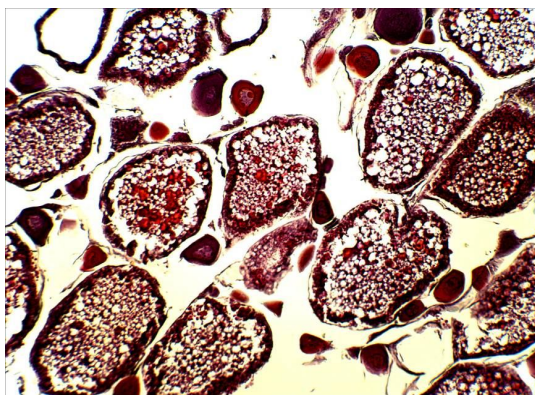


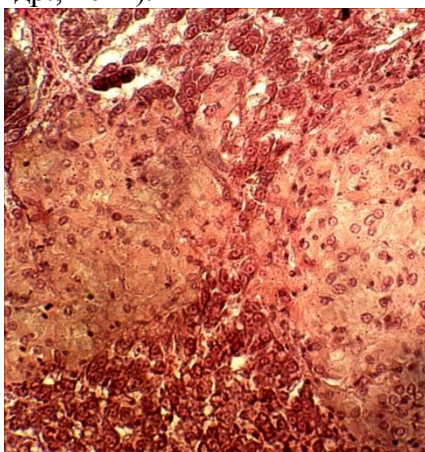
Рисунок 1. Тотальная резорбция ооцитов в яичнике обыкновенной кильки IV стадии зрелости. Окраска кислым фуксином с докраской по Маллори. Увеличение 22 x10

Ответная реакция каспийских килек на негативное воздействие изменившихся условий обитания проявляется и в наличии самок с резорбцией половых продуктов. В период с 2007 по 2011 гг. в Среднем Каспии отмечен последовательный рост частоты встречаемости таких особей анчоусовидной кильки, составивших свыше 50,0 % от числа исследованных. Некоторое снижение этого показателя наблюдалось в 2012 и 2013 годах. Резорбция имела место на всех этапах трофоплазматического роста ооцитов, преобладая у самок III и IV стадий зрелости гонад. Чаще всего данное нарушение не носило массового характера, а

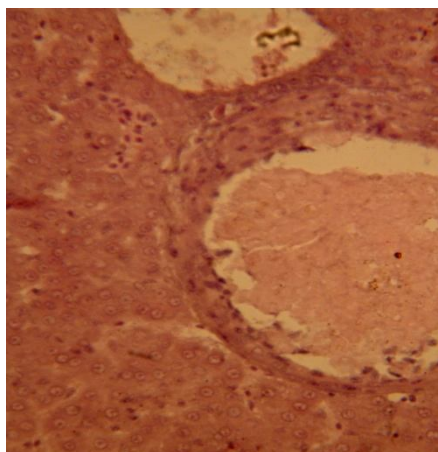


особи с тотальной резорбцией, встречавшиеся в популяции обыкновенной кильки, не превышали в выборке 6,0 % (рис. 1).

Ежегодно с 2005 г. в паренхиматозных (печень, селезенка) и репродуктивных органах анчоусовидной кильки регистрируются злокачественные новообразования (инсулокарциномы) в ассоциации с микозным поражением тканей этих органов (Федорова и др., 2010). Подобные новообразования отмечаются и во внутренних органах обыкновенной кильки. По клиническим признакам они также относятся к злокачественным опухолям, классифицированным как инсулокарциномы (рис. 2) (Федорова и др., 2014).



а



б

Рисунок 2. Фрагмент печени анчоусовидной (а) и обыкновенной (б) килек. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 22 x 40

При микроскопировании мазков-отпечатков печени и селезенки с новообразованиями отмечали наличие гифов грибов, однако это было характерно не только для килек, пораженных опухолями, но и для внешне здоровых рыб, что свидетельствовало о латентной форме болезни. Данную категорию рыб можно отнести к группе риска.

Проведенные микологические исследования позволили выявить в пораженных органах кильки условно-патогенные грибы, относящиеся к классу плесневых грибов (*Euscomycetes*) с доминированием микромизетов рода *Aspergillus*, способные

продуцировать гепатотропные и канцерогенные микотоксины. Особенностью массового развития аспергилл является приуроченность их к нефтезагрязненным районам (Патин, 2008; Слинкина, 2009). Однако роль этих грибов в развитии онкологического заболевания каспийских килек до настоящего момента не выяснена.

Частота встречаемости анчоусовидной кильки с висцеральными опухолеобразованиями за период исследований варьировала в широком диапазоне: от 9,0 % в 2005 г. до 31,5 % в 2008 г. (пик заболевания). В остальные годы уровень заболеваемости был выше ошибки среднего многолетнего значения ( $24,4 \pm 2,80$  %). Средний показатель заболеваемости обыкновенной кильки составил 15,0 % обследованных особей. Ежегодно клинические признаки болезни наиболее ярко проявлялись у половозрелой части популяции: у трех-четырёхлеток анчоусовидной кильки и у пятилеток обыкновенной кильки.

В сезонном аспекте максимальное число рыб со злокачественными новообразованиями отмечали осенью, когда концентрация нефтяных углеводородов и органических веществ в воде достигала самых высоких показателей (Карыгина и др., 2013). В этот период чаще всего встречались самцы с измененными семенниками. Похожие нарушения имели место и в яичниках килек различных стадий зрелости гонад. В отдельных случаях (4,0–5,0 %) они в значительной степени замещали генеративную ткань. Наличие подобных патологий может привести к стерилизации особей.

Таким образом, в настоящее время сложились условия, способствующие развитию онкозаболевания и микозной инфекции в органах каспийских килек. Хроническое загрязнение морской экосистемы привело к тому, что в популяции ранее самого массового промыслового вида - анчоусовидной кильки сформировалась определенная группа рыб, наиболее подверженная данному заболеванию и производимая ослабленное, восприимчивое к болезни поколение. Сейчас аналогичная картина наблюдается и в популяции обыкновенной кильки. Наличие вышеописанных нарушений в сочетании с

резорбтивными изменениями половых клеток снижает репродуктивный потенциал популяции каспийских килек.

Ежегодное выявление онкологического заболевания в сочетании с условно-патогенными микромицетами во внутренних органах каспийских килек свидетельствует о сохранении естественного очага болезни и факторов, обеспечивающих непрерывность эпизоотического процесса в морской экосистеме, в целом, характеризуя состояние каспийских килек как неблагоприятное.

#### Список литературы

1. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Гистология с основами гистологической техники. М.: Медицина, 1982. 304 с.
2. Грищенко Л.И., Акбаев М.Ш., Васильков Г.В. Болезни рыб и основы рыбоводства: учебное пособие. М.: Колос, 1999. 450 с.
3. Евланов И.А., Козловский С.В., Розенберг Г.С. Современное состояние рыбного хозяйства Средней Волги (Материалы к докладу на заседании Ассоциации «Большая Волга»). Тольятти: ИЭВБ РАН, 2000. 24 с.
4. Катунин Д.Н., Азаренко М.Н., Дегтярева Л.В. и др. Экологические последствия современных внутриводоемных процессов в пелагиали Каспийского моря (2000-2012 гг.) и возможные при дополнительной углеводородной нагрузке // Проблемы сохранения экосистемы Каспия в условиях освоения нефтегазовых месторождений: мат. V межд. научно-практич. конф. (26-27 сентября 2013, Астрахань). Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2013. 236 с.
5. Карыгина Н.В., Воронина Е.А. Нефтяное загрязнение и эпизоотическое состояние экосистемы Среднего Каспия // Проблемы сохранения экосистемы Каспия в условиях освоения нефтегазовых месторождений: мат. V межд. научно-практич. конф. (26-27 сентября 2013, Астрахань). Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2013. С. 97-100.
6. Лабораторный практикум по болезням рыб / Под ред. В.А. Мусселиус. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. 296 с.
7. Патин С.А. Нефтяные разливы и их воздействие на морскую среду и биоресурсы. М.: ВНИРО, 2008. 508 с.
8. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно-патогенных грибов: пер. с англ. М.: Мир, 2001. 486 с.
9. Седов С.И. О миграционных циклах морских рыб в современных климатических и экологических условиях Каспийского моря // Комплексный подход к проблеме сохранения и восстановления биоресурсов Каспийского бассейна: мат. науч.-практ. конф. Астрахань: Изд-во КаспНИРХ, 2008. 485 с.
10. Седов С.И., Парицкий Ю.А. Современное состояние запасов морских промысловых рыб Каспия // Рыбное хозяйство. 2007. № 3. С. 53-54.
11. Слинкина Н.Н. Грибы аквапочвшельфово́й зоны острова Сахалин. Автореф. на соиск. уч. ст. к.б.н. Владивосток, 2009. 20 с.

12. Федорова Н.Н., Иванов В.П., Воронина Е.А., Дубовская А.В. Метастазирующие карциномы эндокринных органов – новое заболевание тюлек Каспийского моря // Естественные науки. 2010. № 3 (32). С. 149-156.

13. Федорова Н.Н., Воронина Е.А., Дубовская А.В., Алтуфьева Н.С. Морфопатологические изменения внутренних органов каспийской тюльки (*Glueo nellacultriventris caspia*) // Вестник АГТУ. Сер. Рыбное хозяйство. 2014. № 1. С. 84-88.

## **THE INTEGRATED ASSESSMENT OF A STATE OF THE CASPIAN KILKA**

Voronina E.A., Dubovskaja A.V.

The article presents the integrated assessment of a state of the Caspian kilka in conditions of the chronic pollution of the ecosystem of the Caspian Sea. Malignant new formations and pathological changes in the organs of the examined fishes, corresponding to the clinical signs of the toxicosis were diagnosed. From the parenchymatous organs with swellings were selected opportunistic fungi with a predominance of the genus *Aspergillus*. The morbidity level exceeded the average long-term values every year. Due to the changed habitat conditions on the part of females marked resorption of eggs. The detection of malignant swellings in organs of Caspian kilka in combination with conditionally pathogenic micromycota indicates about the depressed state of the population and epizootic troubles of their environment.

## **ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД НА ВЫКЛЕВ НАУПЛИЕВ *ARTEMIA SALINA***

М.А. Габдуллин, М.В. Нарушко, С.А. Петров, В.А. Мальчевский,  
А.С. Бажин

*Тюменский научный центр СО РАН, г. Тюмень, Россия, e-mail:  
accipiter87@list.ru*

В настоящее время наиболее активно развивающейся отраслью сельского хозяйства в РФ является рыбоводство (Богерук, 2006). Основной проблемой тормозящей развитие рыбного хозяйства является отсутствие качественного, питательного и дешевого стартового корма. Применение качественных кормов обеспечивает наибольший выход взрослых особей из личинок и мальков рыб и уменьшает смертность на ранних стадиях, тем самым увеличивая производительность и снижая себестоимость продукции. По мнению (Соловов и др.,

2001) наиболее оптимальным, экологически чистым вариантом стартового корма для рыб являются рачки *Artemia salina*.

Гипергалинный рачок *Artemia salina* обитает в водоемах с высокой степенью солености. Результатом проживания в стрессовых экстремальных условиях стала его физиологическая адаптация к жизни в экстремальных условиях соленых водоемов путем развития самой эффективной среди гидробионтов осморегулирующей системы (Бойко и др., 2012). Рачки *A. salina* содержат целый комплекс аминокислот, витаминов, микроэлементов, жирных кислот, ферментов, а его цисты способны переносить длительное хранение, сохраняя жизнеспособность (Иванова и др., 2013).

Одной из основных нерешенных проблем в культивировании *Artemia salina*, является недостаточно высокий выклев науплиусов, что уменьшает производительность и повышает себестоимость конечной продукции. Существует несколько путей решения проблемы увеличения выклева науплиев: применение химических декапсулирующих растворов, искусственных и органических активаторов выклева. Использование химических декапсулирующих растворов и искусственных активаторов выклева не является экологически чистой технологией и обуславливает высокие затраты на производство науплиев. На наш взгляд, наиболее оптимальной технологией культивирования науплиев сочетающую в себе экологическую чистоту и невысокие затраты на производство является применение органических активаторов выклева. Среди органических активаторов выклева наибольшим потенциалом обладают микроорганизмы рода *Bacillus* выделенные из многолетнемерзлых пород, которые согласно ряда исследований (Каленова и др, 2014) могут резко активировать процессы адаптации у макроорганизмов. В связи с вышеизложенным, актуальность оценки результатов влияния микроорганизмов из многолетнемерзлых пород на процент выклева науплиев артемии не подлежит сомнению.

Цель работы – оценить результаты влияния микроорганизмов из многолетнемерзлых пород рода *Bacillus* на процент выклева науплиев рачка *Artemia salina*.

Объектом для исследования в данном эксперименте послужили цисты рачка *Artemia salina* из оз. Большое Медвежье, Курганской области.

В работе использованы штаммы микроорганизмов рода *Bacillus*, выделенные из ММП и идентифицированные методом сиквенса по 16S RNA: В1М – *B. sp. (cereus?)*, В1Т - *B. megaterium*.

Цисты были разделены на 6 опытных групп. Критерием формирования опытных групп являлась концентрация микроорганизмов. В рассол первой опытной группы добавлялись микроорганизмы штамма В1М в концентрации 5 миллионов микробных клеток в миллилитре раствора (м.к./мл.), во вторую группу добавляли В1М в концентрации 50 млн.м.к./мл, в третью группу В1М в концентрации 100 млн.м.к./мл., в четвертую штамм В1Т в концентрации 5 млн. м.к./мл., в пятую В1Т в концентрации 50 млн.м.к./мл, в шестую В1Т в концентрации 100 млн.м.к./мл.

Штаммы бактерий высевали в 2 пробирки на скошенный питательный агар и культивировали в термостате 24 часа при  $t=26^{\circ}\text{C}$ . Затем производили смыв микроорганизмов из каждой пробирки 5 мл дистиллированной воды. После определения количества клеток бактерий в исходной суспензии плотность культур доводили до рабочих концентраций в  $5 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^{10}$  и  $1 \times 10^{11}$  м.к./мл.

Для инкубации цист были использованы конические сосуды объемом 2 л с открытым верхом. Рассол для инкубации был приготовлен на дистиллированной воде с добавлением солевой смеси для морских аквариумов «TetraMarine SeaSalt» в концентрации 30г/л. Цисты артемии помещались в рассол из расчета 2,5г сухой массы на 1л. Раствор аэрировался подачей воздуха ко дну конического сосуда. Данный способ аэрации обеспечивает равномерное распределение цист по рассолу, предотвращая оседание их и полученных науплиусов на дно. Инкубируемые цисты освещались круглосуточно, при интенсивности 2000 люкс, согласно рекомендациям (Литвиненко, Гуженко, 2007). В опытные группы добавляли м/о из ММП. Для каждой опытной группы было заложено по три повторности. Подсчет выклюнувшихся цист производился через 24 и 48 часов, трехкратным отбором автоматической пипеткой по 200 мкл и

помещением содержимого на чашку Петри, расчерченную для удобства подсчета квадратами. Отобранный материал фиксировался раствором Люголя. Затем под биноклем МБС-10 подсчитывалось количество живых науплиев, науплиев в стадии парашюта и полные цисты. После этого добавляли гипохлорит кальция для растворения верхней оболочки цист и подсчитывали количество непроклюнувшихся науплиусов артемии. В качестве контроля использовали цисты в соляном растворе без добавления микроорганизмов. Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы «SPSS ver. 11.5.for Windows» (среднее значение, дисперсия средних, параметрическое сравнение по *t*-критерию Стьюдента, частотный анализ).

Через 24 часа в контрольной группе процент науплиев, вышедших из цист, составил в среднем  $1\pm 0,34\%$ , процент науплиев в стадии парашюта  $4,57\pm 1,28\%$ , полных цист -  $94,43\pm 1,16\%$  (результаты представлены в табл. 1).

В опытных группах при концентрации 5 млн м.к./мл показатели выхода артемий из цист в для штамма В1Т, был достоверно выше, чем в варианте со штаммом В1М. Процент выклева для В1Т составил в среднем  $6,63\pm 2,77\%$ , науплиев в стадии парашюта  $9,93\pm 4,13\%$ , полных цист  $83,44\pm 6,84\%$ , а для штамма В1М -  $0,28\pm 0,19\%$ ,  $4,40\pm 0,50\%$  и  $95,32\pm 0,53\%$  соответственно. Результаты группы штамма В1Т, достоверно превосходили показатели как контрольной группы, так и в группе с добавлением штамма В1М.

Кроме того, было установлено, что в опытном варианте со штаммом В1Т в концентрации 50 млн м.к./мл, процент выклюнувшихся науплиев после 24 часов инкубации достигал  $15,74\pm 1,83\%$ , что не только достоверно превосходило показатели выклева в варианте с В1М ( $0,61\pm 0,26\%$ ) в той же концентрации  $0,61\pm 0,26\%$ , но и являлось наилучшим результатом по сравнению со всеми опытными группами на 1 сутки эксперимента. Показатель количества науплиев в стадии парашюта для штамма В1Т составил  $31,70\pm 2,58\%$ , что так же было достоверно выше, чем в группе В1М, для которой значение этого показателя составило  $1,64\pm 0,48\%$ .

Таблица 1. Результаты инкубации науплиев рачка *Artemia salina* на 1 и 2 сутки эксперимента в процентах (M±m)

№ группы	1 сутки			2 сутки		
	Количество живых науплиев	Количество стадий парашюта	Количество не выклюнувшихся цист	Количество живых науплиев	Количество стадий парашюта	Количество не выклюнувшихся цист
К	1,00±0,34	4,57±1,28	94,43±1,16	41,58±2,01	7,03±1,13	51,39±2,40
1	0,28±0,19*	4,40±0,50	95,32±0,53	54,35±4,64**	12,13±2,12*	33,53±6,15**
2	0,61±0,26	1,64±0,48*	97,75±0,41*	32,60±1,60***	4,99±0,98*	62,42±2,48**
3	10,22±2,78***	21,87±4,87***	67,91±7,33**	47,26±5,03	13,18±2,12*	39,56±6,48*
4	6,63±2,77**	9,93±4,13	83,44±6,84*	43,85±4,92	11,26±1,65*	44,89±4,43
5	15,74±1,83***	31,70±2,58***	52,56±2,56**	64,98±3,09***	5,74±1,16	29,29±2,71*
6	11,53±1,65***	29,99±2,32***	61,52±5,17***	49,97±4,25*	8,07±2,29	41,97±5,95*

Примечание: \* - достоверность различия опыта с интактным контролем (\*- p<0,05, \*\*- p<0,01, \*\*\*- p<0,001), К - контроль

В концентрации 100 млн м.к./мл, оба исследуемых штамма оказали положительный стимулирующий эффект относительно контроля. По количеству живых науплиев, достоверных различий между штаммами В1Т (11,53±1,65%) и В1М (10,22±2,78%) выявлено не было. Количество науплиев в стадии парашюта в группе штамма В1Т составило 29,99±2,32% и было достоверно выше, чем в группе В1М со значением этого показателя 21,87±4,87%. Данный показатель для обоих штаммов достоверно превосходил значения в контроле.

Через 48 часов процент выклева в контроле составил 41,58±2,01% для науплиев, вышедших из цист, 7,03±1,13% для науплиев в стадии парашюта и 51,39±2,40% для полных цист.

Процент выклева науплий в пробах со штаммом В1М в концентрации 5 млн м.к./мл достиг 54,35±4,64%, что было достоверно выше, чем в варианте со штаммом В1Т (43,85±4,92%). Процент науплиев находящихся в стадии парашюта в обоих вариантах достоверно не отличался между штаммами, однако установлено достоверное повышение данного показателя относительно контроля.



При концентрации 50 млн м.к./мл доля науплиев, вышедших из цист, для варианта со штаммом В1Т составила  $64,98 \pm 3,09\%$ , что превосходило данный показатель в варианте В1М в 2 раза; достоверных различий по доле науплиев на стадии парашюта между штаммами не обнаружено. Доля полных цист в варианте В1Т ( $29,29 \pm 2,71\%$ ) была достоверно ниже, чем в варианте В1М ( $62,42 \pm 2,48\%$ ).

Показатели выклева науплиев в варианте В1Т в концентрации 100 млн м.к./мл были достоверно выше контрольных значений. В варианте В1М доля науплиев на стадии парашюта достоверно превышала контроль. Достоверных различий между опытными вариантами не выявлено.

Обобщая результаты эксперимента можно заключить, что штаммы В1Т и В1М *Bacillus* из ММП оказывают положительное влияние на процесс выклева науплиусов из цист *A. salina*. Наиболее выраженный стимулирующий эффект оказывает штамм В1Т в концентрации 50 млн м.к./мл.

Факт положительного влияния штаммов В1Т и В1М на выклев науплиев рачка *Artemia salina* обуславливает актуальность дальнейшего изучения механизмов их взаимодействия.

#### Список литературы

1. Богерук А.К., Биотехнологии в аквакультуре: теория и практика. М.: Б 73 ФГНУ Росинформагротех, 2006. 232 с.
2. Соловов В.П., Подуровский М.А., Ясюченя Т.Л. Жаброног артемия: история и перспективы использования ресурсов. М.: Барнаул: ОФО «Алтайский полиграфический комбинат», 2001. 144с.
3. Бойко Е.Г., Литвиненко Л.И., Куцанов К.В., Габдуллин М.А. Особенности биологии артемии в озерах Урала и Западной Сибири // журнал Экология. 2012. № 4. С. 308–316
4. Иванова В.И., Экологическое Состояние и генезис биоты гипергалинных водоемов калмыкии 03.02.08 – экология (биология) Автореф... дис. Канд. Биол. Наук. – Саратов. 2013. 20 с.
5. Калёнова Л.Ф., Субботин А.М., Бажин А.С. Влияние бактерий из многолетнемерзлых пород разного геологического возраста на иммунную систему / Л.Ф. Калёнова, А.М. Субботин, А.С. Бажин // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2013. № 1. С. 128.
6. Литвиненко Л.И. Гуженко М.В. Определение оптимальных параметров инкубации цист Сибирских популяций Артемии. // Рыбное хозяйство. 2007. №2. С. 82-86.

## **ESTIMATION OF INFLUENCE OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM PERMAFROST ON HATCHING OF NAUPLII OF *ARTEMIA SALINA***

Gabdullin M.A., Narushko M.V., Petrov S.A., Malchevskiy V.A., Bazhin A.S.

The work is based on observations of incubation of 7 populations hyperhaline crustacean *Artemia salina*. In the experiment, six populations were processed by various strains of microorganisms of the genus *Bacillus* isolated from permafrost. An assessment of the impact of bacterial strains used in the cysts hatching of the crustacean *Artemia salina*. It was found that the studied strains B1T and B1M increase the percentage of hatching nauplii crustacean *Artemia*. It is proved that the most pronounced stimulatory effect of nauplii hatching is seen in the strain B1T concentration of 50 million microbial cells/ml.

## **ВЕЩЕСТВЕННО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ И ИНФОРМАЦИОННЫЕ КРИТЕРИИ СОСТОЯНИЯ БЛАГОПОЛУЧИЯ ОСОБИ, ПОПУЛЯЦИИ, СООБЩЕСТВА И ЭКОСИСТЕМЫ**

В.П. Гандзюра, Л.А. Гандзюра, Н.И. Корево

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,  
Киев, Украина, e-mail: gandzyura@gmail.com*

Проблема оценки состояния особи, популяции, сообщества и экосистемы – безусловно, одна из центральных в современной гидробиологии, ихтиологии и экологии. Важную информацию для оценки состояния гидробиоценозов и гидроэкосистем дают продукционно-гидробиологические исследования (Абакумов, 1987, Брагинский, 1988; Гандзюра, 1993, 2002). Исследованы общие механизмы действия токсикантов на гидробионтов (Филенко, 1990; Филенко, Михеева, 2007). Имеются примеры успешного решения вопроса о интегральной токсичности вод (Брагинский, 1993). Есть попытки оценить суммарный эффект влияния стрессоров на гидробионтов (Neugens et al., 2001).

Однако, несмотря на огромное количество публикаций этого направления, практически нерешенной остается проблема количественной оценки на единой методологической основе состояния благополучия био- и экосистем разного уровня организации и интеграции.

Краеугольным камнем нашего подхода является количественное определение состояния благополучия любых

систем (организм, популяция, сообщество, экосистема), а также системная оценка влияния всех негативных факторов внешней среды по снижению состояния благополучия соответствующей системы. Для этого мы использовали вещественные, энергетические и информационные показатели.

Среди вещественных особое место занимают показатели сбалансированности обмена веществ (на уровне биосистем) и биогеохимических круговоротов экосистем. Во главу угла энергетических показателей нами предложено использовать структуру энергетического баланса, интенсивность энергетического потока и эффективность функционирования био- и экосистем как трансформаторов энергии.

И формационные критерии являются наименее изученными (Алимов, 1994), но именно они обеспечивают адекватные реакции любой системы на ту или иную ситуацию, что, в итоге, обеспечивает процветание, увядание или исчезновение данной системы. Здесь можно использовать поведенческие реакции гидробионтов, скорость и адекватность ответных реакций на внешнее влияние. На уровне гидроэкосистем чаще используют индексы видового и ценотического разнообразия и т.п.

Установлены общие закономерности изменений сопряженности вещественно-энергетических процессов у гидробионтов разных групп в условиях токсического загрязнения среды тяжелыми металлами. Особенности физиолого-биохимических процессов гидробионтов в процессе роста исследованы при разных режимах обеспечения их веществом и энергией при разной концентрации соединений тяжелых металлов в среде.

Детально исследована структура энергетического баланса автотрофных и гетеротрофных гидробионтов и их популяций в различных условиях. Показана возможность приспособления к определенному уровню токсической нагрузки при достаточном энергетическом обеспечении. Резкое возрастание уровня стандартного обмена (в 3-5 раз) в условиях повышенного содержания тяжелых металлов при снижении соотношения общий обмен/стандартный обмен обусловлен значительным увеличением энергетических трат на поддержание жизнедеятельности

организма в токсической среде. При этом ресурсов на рост, развитие и размножение остается все меньше (пропорционально уровню загрязнения среды).

Одновременно установлено возрастание (на порядок и более) амплитуды колебаний значений удельной скорости роста, эффективности трансформации вещества и энергии у гетеротрофов и величины чистой и валовой продукции, дыхания и других параметров – у автотрофов.

Существенное разбалансирование вещественно-энергетических процессов установлено у рыб при повышенном уровне тяжелых металлов в воде. В этих условиях резко возрастает интенсивность экскреции фосфора. Нарушение фосфорного обмена отмечено у всех исследованных видов рыб. Установлены особенности фосфорного обмена у рыб различных трофических групп разного возраста при различных трофических условиях как в контроле, так при токсической нагрузке. В обычных условиях уровень экскреции фосфора зависит от видовой принадлежности, этапа развития, возраста и условий кормления. При этом при питании уровень экскреции резко снижается у большинства трофических групп. Лишь у ихтиофагов питание до насыщения приводит к возрастанию экскреции фосфора (по сравнению с голодавшими рыбами) более чем в 5 раз. При этом у зоопланктонофагов и бентофагов в условиях токсического загрязнения среды установлено снижение содержания общего фосфора в теле в процессе роста, в то время как у ихтиофагов (щука, сом) такого снижения не отмечено, что объясняется особенностями их питания (относительное содержание фосфора в их рационе в 1,5-2,0 раза выше, чем у бентофагов и зоопланктонофагов. Коррекция рационов рыб в условиях токсического загрязнения водной среды позволяет решить этот вопрос путем повышенного содержания фосфора в кормах, что компенсирует его потери вследствие усиленной его экскреции. Вскрыты особенности влияния величины доступной гидробионтам энергии на уровень проявления токсических эффектов на разных стадиях токсикоза.

В экспериментальных условиях исследованы изменения основных биопродукционных показателей – удельной скорости

роста и накопления энергии, эффективности трансформации вещества и энергии, величины накопленной в биомассе энергии на единицу доступного ее потока, соотношения между величинами накопленной в биомассе энергии и уровнем дыхания автотрофных (гидромакрофиты) и гетеротрофных организмов (гидр, молоди рыб и личинок бесхвостых амфибий), лабораторных популяций (инфузорий, дафний и цериодафний) и сообществ при разных уровнях ионов тяжелых металлов ( $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) в водной среде. Методика исследований детально описана нами ранее (Гандзюра, 2002). Установлено, что даже незначительное повышение содержания тяжелых металлов в воде (от 0,1 ПДК и выше) вызывает резкие колебания значений всех биопродукционных показателей организмов и популяций.

Наиболее информативным для растений оказалось соотношение  $Rч/R$ , в то время, как чистая продукция ( $Rч$ ) и величина дыхания ( $R$ ) изменялись в токсичной среде не прямо пропорционально концентрации ионов тяжелых металлов в воде.

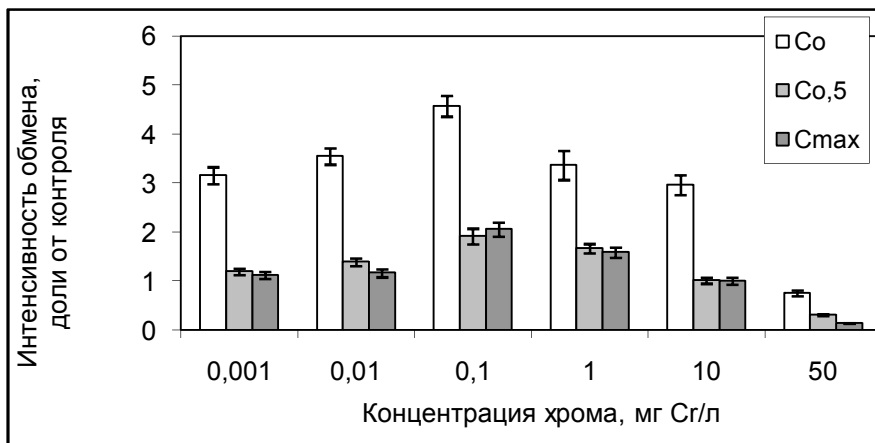


Рис. 1. Интенсивность обмена у мальков *Rutilus rutilus* при голодании ( $C_0$ ), питания до насыщения ( $C_{max}$ ) и при рационе, составляющем половину от максимального ( $C_{0,5}$ ) при разных концентрациях  $\text{Cr}^{6+}$  в воде

Нами установлены особенности влияния величины доступной гидробионтам энергии на уровень проявления токсических эффектов на разных стадиях токсикоза. Во всех случаях отмечено резкое усиление токсических эффектов при ограничении доступного биосистеме потока вещества и энергии

на первых стадиях токсикоза и ослабление этой зависимости на заключительных этапах, что связано с существенным угнетением всех процессов жизнедеятельности вплоть до летального исхода (рис. 1).

Использование индекса оптимальности среды (Гандзюра, 1993) позволяет эффективно диагностировать уровень токсической загрузки для различных токсикантов (рис. 2).

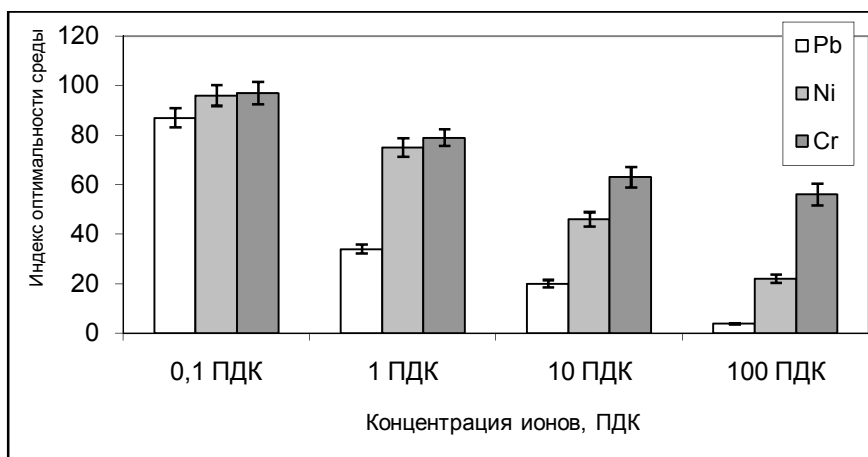


Рис. 2. Значения индекса оптимальности среды для *Pelmatohydra oligactis* при разных концентрациях ионов тяжелых металлов в воде

Установлены общие закономерности изменения энтропии в био- и экосистемах при разных уровнях токсической нагрузки, в частности, существенное увеличение энтропии гидроекосистемы и относительно постоянный ее уровень в гидробиоценозе при незначительном уровне токсического загрязнения экосистем и снижение энтропии в экосистеме при высоком уровне токсической нагрузки, что сопровождается возрастанием энтропии в биосистеме. На уровне организма это проявляется в резком возрастании стандартного обмена при повышении концентрации токсикантов в среде. Дальнейшее увеличение концентрации токсикантов приводит к угасанию обменных процессов и в итоге – к летальному исходу.

Особое внимание уделено нами для решения вопроса о возможности повышения токсикорезистентности рыб к

повышенному содержанию соединений тяжелых металлов в воде. Нашими исследованиями установлено, что предварительное влияние невысоких (в пределах 1 ПДК) концентраций тяжелых металлов приводит к достоверному увеличению токсикорезистентности рыб при последующих токсических нагрузках этих же тяжелых металлов при концентрациях в несколько (1-100) ПДК.

Таким образом, показана возможность повышения токсикорезистентности рыб путем предварительного влияния невысоких концентраций токсикантов.

В токсической среде происходит нарушение сопряженности вещественно-энергетических и информационных процессов автотрофных и гетеротрофных гидробионтов: существенное изменение структуры энергетического баланса, резкое возрастание экскреции фосфора, что в большинстве случаев приводит к снижению его содержания в теле, существенные изменения показателей роста и эффективности трансформации вещества и энергии. Первой реакцией на токсическое воздействие является резкое увеличение амплитуды колебаний всех исследованных физиолого-биохимических показателей, дальнейшая картина существенно зависит от величины доступной энергии, уровня токсичности среды, видовой и возрастной чувствительности.

В зависимости от концентрации токсикантов выделены пять основных уровней токсичности: 1 – имеют место незначительные отклонения средних значений биопродукционных показателей от контроля на фоне резкого увеличения амплитуды их колебаний, 2 – значительное увеличение энергозатрат на поддержание жизнедеятельности; 3 – снижение значений биопродукционных показателей, что связано со снижением уровня жизнедеятельности биосистем, при этом отмечается затухание колебаний их значений; 4 – резкое снижение интенсивности биопродукционного процесса; 5 – прекращение биопродукционных процессов и отмирание гидробионтов.

В токсической среде существенно нарушается сопряженность вещественно-энергетических процессов у

гидробионтов. В частности, наблюдается дисбаланс фосфорного обмена, проявлением которого является резкое увеличение его экскреции на фоне снижения его общего содержания в организме.

Уровень токсических эффектов существенно зависит от величины доступной биосистеме энергии, уровня токсиканта в среде и стадии токсикоза: ограничение доступной биосистеме энергии существенно усиливает токсический эффект (особенно на первой и второй его стадии). На третьей стадии развития токсикоза величина доступной энергии уже не так существенна, а на четвертой она уже не играет роли: в этих условиях продукционный процесс практически прекращается.

Установленные нами закономерности биопродукционного процесса у гидробионтов, их популяций и сообществ в токсической среде могут эффективно использоваться для диагностики уровня токсического загрязнения и качества водной среды в целом.

Для адекватных оценок состояния организма, популяции, сообщества и экосистемы необходимо использование компаративного подхода с учетом отклонения интегральных вещественно-энергетических и информационных показателей от их значений в оптимальных условиях среды.

Предложено также использовать понятие «вредоносность» для количественной системной оценки общего эффекта влияния всех негативных факторов среды на организм, популяцию, сообщество или экосистему. При этом оценка вредоносности отдельно взятого фактора, их группы, или же всех негативных факторов в целом производится по снижению состояния благополучия системы (в процентах от оптимального состояния).

Это позволяет производить адекватную оценку состояния гидробионтов, их популяций и сообществ, равно как и экосистем в целом по отклонению их состояния от оптимального (используя наиболее информативные вещественно-энергетические и информационные показатели).

Список литературы

1. Абакумов В.А. Продукционные аспекты биомониторинга пресноводных экосистем // Продукционно-гидробиологические исследования водных экосистем. Л.: Наука, 1987. С. 51-61.



2. Алимов А.Ф. Разнообразие, сложность, стабильность, выносливость экологических систем // Журн. общ. биологии. 1994. Т. 55, №3. С. 288–302.
3. Брагинский Л.П. Биопродукционные аспекты водной токсикологии // Гидробиол. журн. 1988. Т. 24, №3. С. 74–83.
4. Брагинский Л.П. Интегральная токсичность водной среды и ее оценка с помощью методов биотестирования // Гидробиол. журн. 1993. Т. 29, №6. С. 66–73.
5. Гандзюра В.П. Продукционно-энергетические критерии качества среды // Вестник Днепропетровского ун-та. Биология и экология. 1993. Вып. 1. С. 33–34.
6. Гандзюра В.П. Продуктивність біосистем за токсичного забруднення середовища важкими металами. Київ: Обрії, 2002. 248 с.
7. Филенко О.Ф. Некоторые универсальные закономерности действия химических агентов на водные организмы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.17. М.: МГУ, 1990. 36 с.
8. Филенко О.Ф., Михеева И.В. Основы водной токсикологии. М.: Колос, 2007. 144 с.
9. Heugens, E.H.W., A.J. Hendriks, T. Reede, N.M. van Straalen and W. Admiraal. A review on the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment // Crit. Rev. Toxicol. 2001. Vol. 31, №3. P. 247-284.

#### **MATTER-ENERGETIC AND INFORMATION CRITERIA OF BIO- AND ECO-SYSTEMS PROSPERITY STATUS**

Gandzyura V.P., Gandzyura L.A., Korevo N.I.

The following interconnections were revealed: the general laws of environment pollution influence by heavy metals on specific growth rate and accumulation of energy; efficiency of substance and energy transformation; size of the energy, saved in biomass, on unit of its accessible flow; ratio between sizes of the energy, saved in biomass, and respiration level. Is also shown, that even the insignificant increase of heavy metals' level ( $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  etc.) in water causes essential fluctuations of meaning of all parameters of biosystems. The general laws of these fluctuations were investigated at a different level of water pollution. In addition, the following points were revealed: the essential infringements of biosystems' energetic balance structure in toxic environment; general laws of change of entropy in bio- and ecosystems under conditions of a various level of toxic pressure; the relative sensitivity of bioproductive parameters towards action of heavy metals. Besides, the accumulation levels of heavy metals in aquatic organisms were determined. The essential infringements of matter-energetic and information process under the conditions of heavy metals environment pollution were revealed and the changes entropy in those conditions were considered. Offered new interpretation of «harmfulness» as to reduce ability of certain factor the state of prosperity of the system. Estimating function of prosperity of the system in percents from the reference state of the system (which is adopted after 100%), it is possible in number to estimate «harmfulness» after the decline of function of prosperity of the system to

the zeroing values, below which system the existence halts. It first does possible integral high-quality and quantitative estimation of the most various unfavorable influences (toxic, biological, anthropic and others like that) on the biological and ecological systems at all levels of their structurally-functional organization – from organism, population, community to ecosystem.

## **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ САНИТАРНО-ЭПИЗООТИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ГОРБУШИ ЗАПАДНОГО И ВОСТОЧНОГО ПОБЕРЕЖИЙ КАМЧАТКИ**

Е.А. Грицких, К.В. Козлов

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Камчатский научно-исследовательский институт рыбного  
хозяйства и океанографии»,*

*Петропавловск-Камчатский, Россия, e-mail:*

*Kozlov.k.v@kamniro.ru*

Рыба является важным источником белка в питании человека. Однако некоторые виды рыб могут быть поражены тем или иным заболеванием или же заражены паразитами, которые ограничивают их промысел и пищевое использование. В этой работе проанализировали данные о видовом и количественном составе патогенов, снижающих качество рыбопродукции и потенциально опасных для здоровья человека и животных, которые выявили у горбуши восточного (Карагинская подзона) и западного (Камчатско-Курильская подзона) побережий Камчатки в 2011–2014 гг.

Всего визуально просмотрели 5000 экз. рыб, на комплексные исследования отобрали 484 экз. При осмотре отмечали признаки, снижающие товарное качество рыбопродукции (табл. 1). Видовую принадлежность инвазионных агентов устанавливали с помощью отечественных и зарубежных определителей (Определитель паразитов..., 1987; Fagerholm, 1982; Guide to the parasites..., 1989). Статистическую обработку проводили общепринятым методом (Ройтман, Лобанов, 1985).

От горбуши Карагинской и Камчатско-Курильской подзон изолировали бактерии рода *Vibrio*. Бактерии этого рода относятся к группе санитарно-значимых микроорганизмов, так как у

человека могут вызывать пищевые токсикоинфекции. Вибрионы выявляли у горбуши Карагинской подзоны ежегодно, встречаемость их варьировала от 18,3 до 26,7%. От рыб Камчатско-Курильской подзоны эти бактерии выделяли значительно реже - 6,7–15% (рис. 1).

Таблица 1. Визуальные признаки патологии горбуши, %

Признаки патологии	Подзона	
	Карагинская	Камчатско-Курильская
Мягкая мускулатура	0,2	0,1
Язвы	0,3	1,2
Паразитические ракообразные	22,6	8,3
Укус мор. зверя	3,6	3,4

Среди паразитов у горбуши было обнаружено 4 вида имеющих санитарно-эпидемиологическое значение: личинки скребней *Corynosoma strumosum* и *Bolbosoma caenoforme*; плероцеркоиды цестод *Diphyllobothrium* sp.; личинки нематод *Anisakis* sp. При попадании личинок скребней и дифиллоботриид в организм человека, они могут развиваться в половозрелую форму, вызывая у людей тяжелые заболевания. Анизакиды в организме человека продолжать жизненный цикл не могут. Но они внедряются в слизистую желудка, кишечника, вызывая на этом месте воспаление. Заболевание сопровождается острой болью (Гаевская, 2004).



Рисунок 1. Встречаемость бактерий рода *Vibrio* у горбуши из Карагинской и Камчатско-Курильской подзон в 2010–2014 гг.

По результатам 4 лет исследований были получены средние значения зараженности горбуши паразитами, опасными для здоровья человека и снижающими качество рыбопродукции (рис. 2).

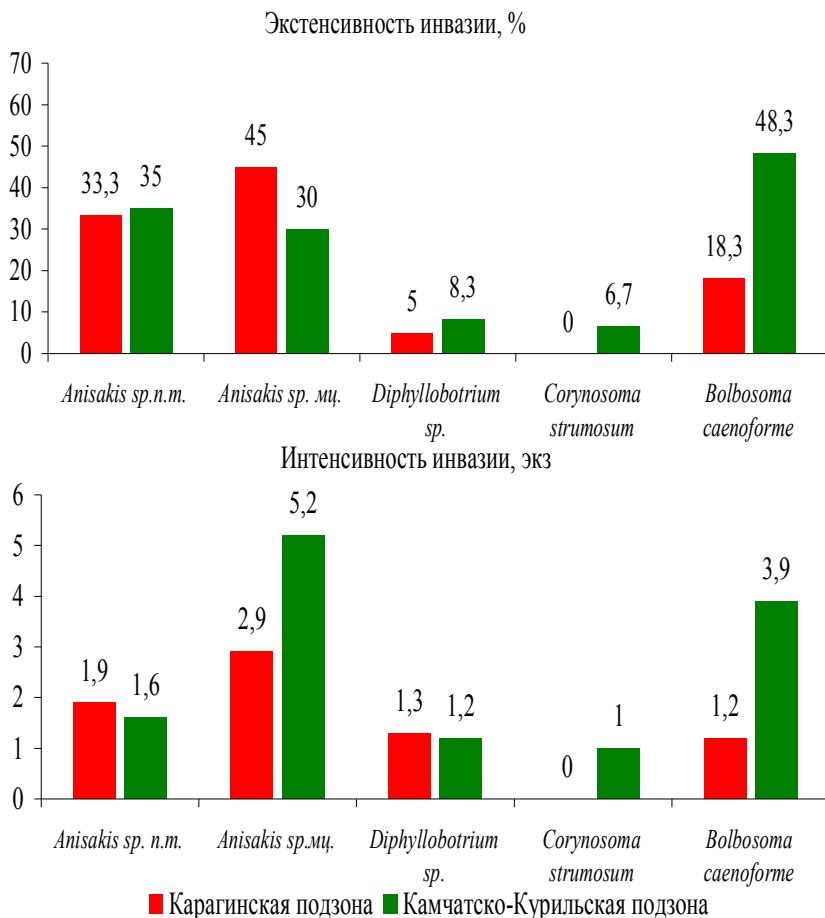


Рисунок 2. Зараженность горбуши паразитами, потенциально опасными для здоровья человека

Встречаемость анизакид в мышцах у горбуши в Карагинской подзоне была выше, и достигала 45%, тогда как в Камчатско-Курильской - 30%. При этом интенсивность инвазии, то есть количество паразитов в одной зараженной особи, у рыб на восточном побережье была ниже, чем на западном. Встречаемость анизакид и дифиллоботриид в полости тела горбуши была

примерно на одном уровне в обеих подзонах. Скребней *S. strumosum* отмечали у рыб только на западном побережье. Зараженность ими была невысокой.

Личинок *B. caeniforme* в два раза чаще и с большей интенсивностью инвазии обнаруживали у горбуши в Камчатско-Курильской подзоне (рис. 2).

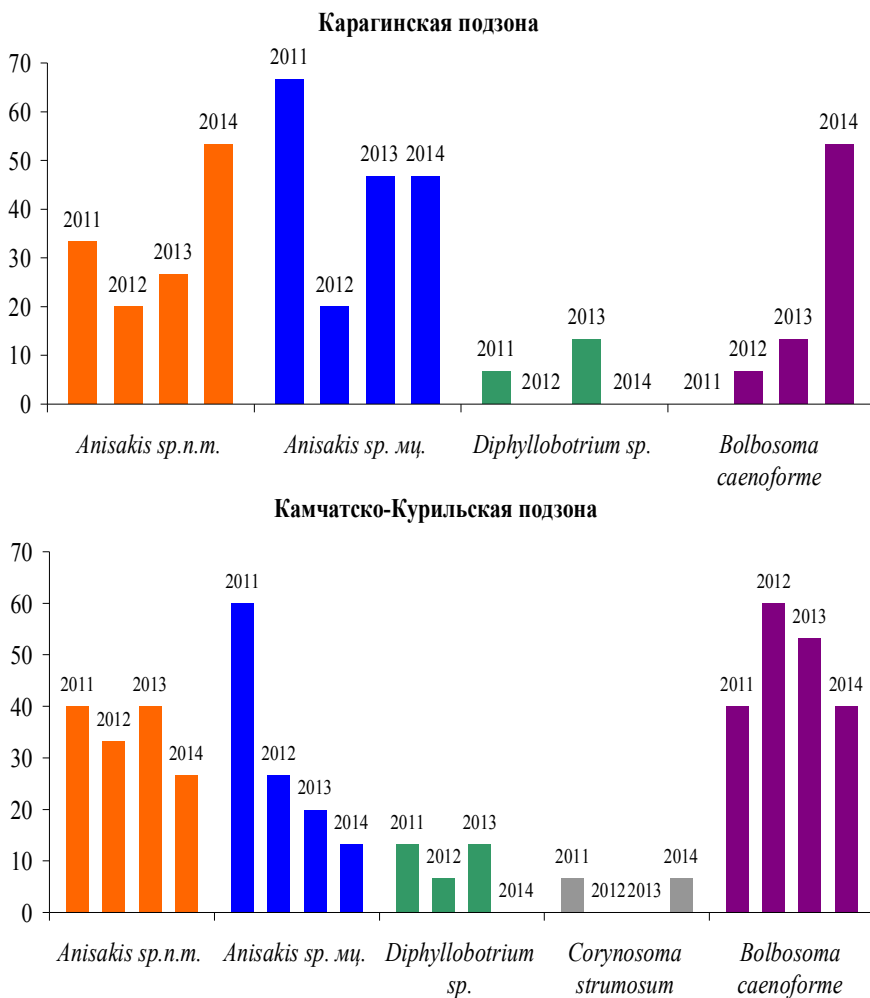


Рисунок 3. Экстенсивность инвазии горбуши в Карагинской и Камчатско-Курильской подзонах, %

Самые высокие показатели инвазии анизакидами горбуши отмечали в 2011 г. в обеих подзонах. Экстенсивность инвазии

превышала 60%, интенсивность у рыб в Карагинской подзоне была более 3 экз., в Камчатско-Курильской - более 10 экз. (рис. 3, 4).

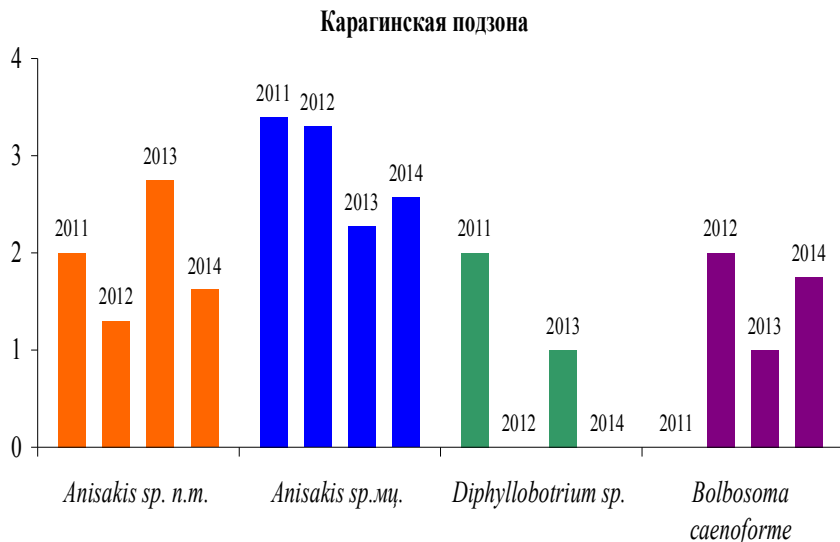


Рисунок 4. Интенсивность инвазии горбуши в Карагинской и Камчатско-Курильской подзонах, экз.

Встречаемость дифиллоботриид варьировала от 6,7 до 13,3%, средняя интенсивность – от 1 до 2 экз. Коринозом встречали только в 2011 и 2014 годах с одинаковой частотой, интенсивность инвазии равнялась единице. Зараженность горбуши больбосомами в Камчатско-Курильской подзоне была на высоком уровне во все годы исследований, в Карагинской варьировала от 6,7% в 2012 г. до 53,3% в 2014 г.

В результате исследований у горбуши были выявлены бактерии рода *Vibrio* и 4 вида гельминтов имеющих санитарно-эпидемиологическое значение: *Anisakis* sp., *Diphyllobothrium* sp., *C. strumosum*, *B. caenoforme*. Вибрионы выявляли у 6,7–26,7% рыб. Среди гельминтов чаще встречали анизакид и больбосом до 66,7 и 60%, соответственно. Плероцеркоиды *Diphyllobothrium* sp. обнаруживали у 6,7–13,3% рыб, личинки *C. strumosum* – у 6,7%.

В Карагинской подзоне количество рыб, зараженных анизакидами, было больше чем в Камчатско-Курильской, а количество гельминтов в зараженной рыбе меньше. Зараженность горбуши больбосомами была значительно выше в Камчатско-Курильской подзоне. Дифиллоботриид и коринозом у рыб на обоих побережьях встречали примерно с одинаковой частотой.

В связи с наличием данных патогенов необходимо строго соблюдать режимы обеззараживания свежей рыбы при ее переработке на рыбоперерабатывающих предприятиях согласно действующим технологическим инструкциям (СанПиН 2.3.2.1078-01; СанПиН 3.2.569-96).

#### Список литературы:

Гаевская А.В. Паразиты и болезни морских и океанических рыб в природных и искусственных условиях. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2004. 237 с.

Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Паразитические многоклеточные. Под ред. О.Н. Бауера. 1987. Л.: Наука. Т. III. 583 с.

Ройтман В.А., Лобанов А.А. Метод оценки численности гемипопуляций паразитов в популяции хозяина. В кн.: Исследования по морфологии, таксономии и биологии гельминтов птиц. Тр. Гельминтол. Лабор. АН СССР. 1985. Т. 33. С. 102–123.

СанПиН 2.3.2.1078-01 Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Утв. Гл. сан. врач РФ Г.Г. Онищенко 06.11.2001 г.

СанПиН 3.2.569-96 Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации. Утв. Постановлением Госкомсанэпиднадзора России от 31 октября 1996 г.

Fagerholm H.P. Parasites of fish in Finland. VI Nematodes // Inst. of Abo Academ. 1982. 128 p.

Guide to the parasites of fishes of Canada. *Acanthocephala*. Ed. L. Margolis, Z. Kabata // Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. 1989. № 107. Part III. 95 p.

### **SANITARY AND EPIZOOTIC CHARACTERISTIC OF PINK SALMON (*ONCORHYNCHUS GORBUSCHA*) OF WESTERN AND EASTERN COASTS OF KAMCHATKA**

Gritskikh E.A., Kozlov K.V.

The comparative analysis of contamination of pink salmon from eastern and western coasts of Kamchatka, influencing on their commodity quality and having epidemiological value by results of researches of 2011–2014 is carried out.

### **БИОСЕНСОРНЫЙ МОНИТОРИНГ И ТЕСТИРОВАНИЕ ДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА ПО ПОВЕДЕНЕСКИМ РЕАКЦИЯМ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ**

А.В. Гудимов

*Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН,  
Мурманск, Россия, e-mail: alexgud@mail.ru*

Биосенсорный мониторинг, основанный на непрерывном мониторинге поведенческих реакций двустворчатых моллюсков начал интенсивно развиваться во всем мире, особенно в последнее десятилетие. В поведении, как первой реакции организма на любые воздействия, интегрируются изменения как внешней, так и внутренней среды (Гудимов, 2012). По поведенческим реакциям, регистрируемым в режиме он-лайн, мы можем узнать не только о качестве окружающей среды и ее экологических изменениях, но и об изменениях в состоянии самого организма, его «здоровье» и уровне его активности.

Выбор поведения в качестве показателя общего состояния организма, а также основного индикатора оперативного контроля условий среды и стрессовых воздействий закономерен. Изменения в поведении обычно обнаруживаются уже при самых низких концентрациях тестируемых веществ. По отношению к токсическому воздействию поведенческие реакции рыб и



двустворчатых моллюсков оцениваются как наиболее «демонстративные, экспрессные и удобные» для аппаратной регистрации (Крайнюкова, 1991). Особое значение поведения в том, что оно представляет собой целостную реакцию всего организма, а не одной его системы.

Скрининг тест был выполнен для оценки самых низких концентраций нефтеуглеводородов, которые способны инициировать быстрый поведенческий отклик у морских гребешков на токсический нефтепродукт. Ранее подобный эксперимент был проведен на мидиях по исследованию токсичности меди (Гудимов, 2008).

Эксперимент проводился в константных условиях (температура 3-4° С и аэрация) в аквариумах с натуральной морской водой, отобранной в губе Дальняя Зеленецкая (Баренцево море).

Морские гребешки *Chlamys islandica* были помещены в маленькие аквариумы (2 для тестирования и 2 для контроля) и акклимированы в течение 3 дней. Верхняя створка каждой раковины моллюска была соединена с вальвометром (прибором для регистрации движений створок раковины) на основе тензометра. Движение створок регистрировалось тензометром непрерывно в течение эксперимента.

Дизельное топливо добавляли в аквариум в возрастающей концентрации от 1, к 5 и 15 ppm. Экспозиции были короткие (1-3 часа) с целью обнаружения первых значимых откликов, важных для биосенсорного мониторинга.

Каждый индивидуальный отклик анализировался по двум основным поведенческим параметрам – аддукции (число частичных схлопываний створок в час) и уровню раскрытия створок (в % от максимального). Построен график зависимости и проведен статистический анализ данных.

В результате эксперимента было установлено что дизельное топливо производит сильный токсический эффект на поведение гребешка в любой концентрации кроме 1 ppm (этот отклик был заметен, но статистически незначим, - рис. 1). Частота аддукции у гребешка усиливалась при концентрации токсиканта от 1 до 5 ppm, и значительно, при 10-15 ppm, - в 3-6 раз в первые 20-30 мин

опыта. Уровень раскрытия створок уменьшается при этих концентрациях в 3-10 раз соответственно.



Рис. 1. Экспозиция гребешка в 1 ppm дизельного масла (между стрелками), затем был включен проток. Время – в часах записи.

После экспонирования моллюсков в дизельном топливе гребешки и аквариумы были промыты на протоке. В чистой воде гребешки широко раскрывали створки, даже больше чем в контроле, стараясь восстановить газообмен («отдышаться») и очистить мантию и жабры от частиц топлива.

Таким образом, мы можем заключить, что респираторный стресс был замечен как в самом эксперименте при действии дизельного топлива, так и в течение нескольких часов после экспозиции. Однако через неделю после эксперимента гребешки были живы и имели нормальный уровень раскрытия створок.

Следовательно, самые низкие концентрации дизельного топлива, которые способны надежно продуцировать «сигнал тревоги» составляют около 5 ppm (5 мг/л). От 5 до 15 ppm возрастающий «наркотический» эффект был обнаружен как во время экспозиции, так и в течение 2-6 часов после нее.

Надежное обнаружение токсического эффекта в природных условиях и определение его последствий является сегодня ключевым вопросом оперативного экологического биомониторинга.

Еще недавно непрерывная регистрация жизнедеятельности водных животных в природе была технически проблематична. Теперь существует более десятка устройств, применяемых в онлайн биомониторинге, отличающихся степенью автономности, надежности и универсальности.

Данное исследование ММБИ было выполнено на новой оригинальной установке биосенсорного мониторинга последнего поколения, применимой для многих видов моллюсков, как морских, так и пресноводных.

Однако, не столько техника регистрации, сколько технология выявления экологически опасных ситуаций является сегодня приоритетом. Обнаружение токсического стресса в он-лайн режиме дело новое, технологически (и методически) незавершенное. Проблема биосенсорного мониторинга не только в выявлении стресса на фоне комплексного влияния природных факторов и их колебаний. Основная трудность заключается в достоверности и надежности экологической оценки того или иного воздействия в режиме он-лайн, т.к. требует соответствующей квалификации и опыта этологических исследований, и потому является камнем преткновения для всех существующих систем оперативного (автоматического) биомониторинга.

#### Список литературы

Гудимов А.В. Оперативный биологический мониторинг – современный подход к контролю экологической безопасности // Нефть и газ арктического шельфа 2008: материалы Международной конференции. Мурманск, 12 – 14 ноября. Мурманск : ММБИ КНЦ РАН, 2008. С. 99-105.

Гудимов А.В. Первые записи поведенческих реакций двустворчатых моллюсков исландского гребешка *Chlamys islandica* и модиолуса *Modiolus modiolus*. Вестник КамчатГТУ. № 20. 2012. С. 50-55.

Крайнюкова А.Н. Система токсикологической оценки и контроля источников загрязнения водных объектов // Бiotестирование в решении экологических задач. Санкт\_Петербург: Зоол.ин-т РАН, 1991. С. 46-62.

Работа выполнена при финансовой поддержке компании TOTAL.

### **BIOSENSOR MONITORING AND BIOASSAY OF DIESEL OIL BY BEHAVIORAL RESPONSES OF THE BIVALVES**

A.V. Gudimov

Behavior of some bivalves is the proper basis for biosensor monitoring as a promising tool for immediate detecting environmental changes and aquatic pollutants. Background behavioral responses must be evaluated prior to field experiments, focusing on the range of stresses in natural conditions and problems of the distinguishing between natural and toxic changes in the behavior.

A screening test was performed to estimate the lowest concentrations which are able to produce a significant and quick behavioral response (a pronounced ‘alarm response’) in the Icelandic scallop *Chlamys islandica* to a toxic oil product. The

diesel oil was added to aquaria in the increasing concentration from 1 to 5 and 15 ppm. The exposures were short (1-3 hours) to find out the first reliable responses, critical to biosensor monitoring.

Mean values of behavioral parameters as adduction (number of partial closures per hour) and shell gape size (shell gaping, in % of maximal) for each concentration were statistically estimated (one-way ANOVA). A toxic sublethal effect of diesel oil was significant and well-detected by the scallop behavior.

Nowadays the main task for biosensor monitoring is the development of new biomonitoring technology for reliable recognizing any harm pollution effects online.

## **ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ОСЕТРОВЫХ РЫБ**

Э.Л. Елеев<sup>1</sup>, Л.И. Грищенко<sup>1</sup>, Е.А. Заботкина<sup>2</sup>, В.Н. Пономарёв<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>*Московская государственная академия ветеринарной медицины  
и биотехнологии имени К.И. Скрябина. Москва. Россия, e-mail:*

*[ruel@bk.ru](mailto:ruel@bk.ru), [htiopatolog@mail.ru](mailto:htiopatolog@mail.ru),*

<sup>2</sup>*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,  
Борок, Россия, e-mail: [zabel@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:zabel@ibiw.yaroslavl.ru)*

<sup>3</sup>*Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии,  
Покров, Россия*

В России герпесвирус впервые выделен от больных особей сибирского осетра в 2006 г. в одном из осетровых хозяйств России (Щелкунов и др., 2007, Щелкунов и др., 2010). Также герпесвирус обнаружен у белого осетра в Северной Америке в 90-х годах XX века (Watson et al., 1995). За прошедшие годы в России исследованы молекулярные, физико-химические, биологические свойства герпесвируса сибирского осетра (SbSHV), доказана его этиологическая роль, описаны симптомы болезни. В тоже время патогенное действие вируса на патоморфологическом уровне не изучено, что сдерживает разработку клинико-морфологической диагностики и расшифровку патогенеза болезни.

Цель исследований – изучить патоморфологические изменения при герпесвирусной инфекции осетровых рыб при экспериментальном воспроизведении болезни и в условиях неблагополучного хозяйства.

Экспериментальная работа выполнена в лаборатории здоровья гидробионтов ГНУ ВНИИВВиМ (Покров) и на кафедре мелкого животноводства ФГБОУ ВПО МГАВМиБ.

Материал для гистологических исследований собран от сеголеток сибирского осетра и его гибрида с русским осетром в 3-х опытах по экспериментальному заражению рыб герпесвирусом. Опыты ставили в аквариумах по 100 л. с проточной артезианской водой при 15-16<sup>0</sup>С. Рыб заражали методом ванн (Щелкунов и др., 2009). В опытах вели клиническое наблюдение, вскрытие и отбор проб перед гибелью рыб, для гистологических и электронно-микроскопических исследований. Кусочки кожи, жабр и внутренних органов фиксировали в 10% растворе нейтрального, забуференного формалина и в жидкости Корнуа. Параллельно проводили вирусологические исследования для определения содержания вируса в органах рыб. Кроме того, собран патматериал от подозреваемых в заболевании сеголеток из неблагополучного осетрового хозяйства. Всего гистологическим исследованиям подвержено 63 экземпляра больных и контрольных рыб.

Заболевание воспроизведено во всех опытах, но тяжесть течения и проявления болезни зависела от вида и возраста подопытных рыб. Первые симптомы у сеголетков сибирского осетра возрастом до 2 мес. наблюдались через 6-10 сут., у гибрида русского и сибирского осетров возрастом 6 мес.- через 21 сут. Заболеваемость и гибель рыб составили - сеголетков сибирского осетра -100%, гибрида русского и сибирского - 25%.

Вирус идентифицирован в культуре клеток SSO-2 по цитопатическому действию в соответствии с принятой методикой (Щелкунов И.С. и др. 2009) и выявлен с помощью электронной микроскопии (рис 1).

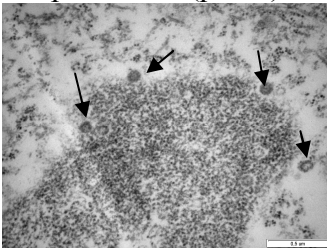


Рис 1 Эпителиальная клетка кожи инфицированная вирусом SbSHV( вирусные капсиды указаны стрелками).

**Клинические признаки и патолого-анатомические изменения.** Симптомы и патолого-анатомические изменения, наблюдавшиеся у экспериментальных рыб, были аналогичны с описанными нами ранее (Елеев и др., 2014). Вначале они проявлялись угнетением и отказом рыб от корма. На разных участках тела в основании жучек и по краю плавников появлялись пятнистые кровоизлияния, небольшие узелки сероватого цвета на коже и утолщения краевой зоны плавников. У погибших рыб на коже и плавниках отмечали небольшие очаги некроза, а также осложнение инфекции сапролегнией или флексибактериозом. При вскрытии в брюшной полости увеличено количество серозной жидкости, печень бледная, желудок и кишечник запустевшие, селезенка и почки немного размягчены, практически не увеличены. У сеголеток сибирского осетра из неблагополучного хозяйства отмечали в основном кровоизлияния под жучками и некротические поражения кожи в области хвостового стебля.

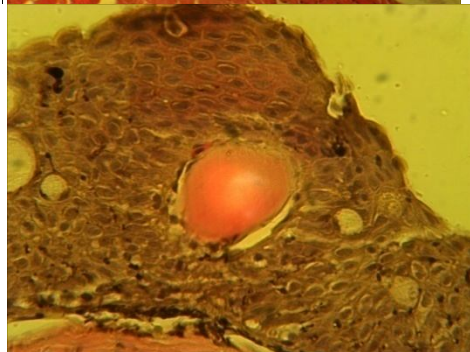


Рис 2. Очаг гиперплазии эпидермиса (бляшки). Окраска Г-Э. х100.

рис 3 Очаг гиперплазии эпидермиса, в центре гомогенная масса. Окраска Г-Э. х400.

**Гистологические изменения.** У экспериментально заражённый рыб основные микроскопические изменения обнаружены в срезах кожи и плавников. Они проявились гиперпластическим разрастом эпидермиса в виде узелковых образований (бляшек) (рис 2,3), состоящих из малодифференцированных эпителиальных клеток.

Узелки чётко ограничены в центре содержится гомогенная масса, окружённая многослойным эпителием. Некоторые узелки сращиваются с образованием оголённых участков кожи. Слизистые клетки сильно переполнены слизью, увеличены в размере, видны разрывы наружной части оболочки и выделения слизи наружу (рис 4).

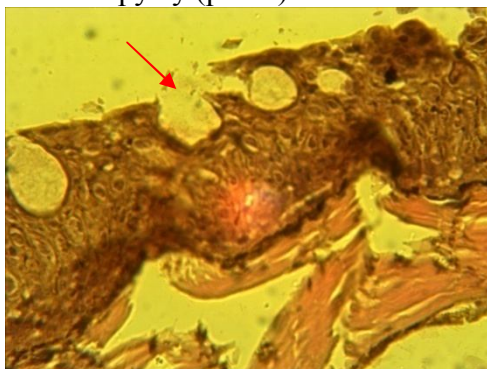


Рисунок 4. Кожа и мышцы. Гипертрофия слизистых клеток, десквамация эпидермиса на хвостовом стебле. Окраска Г-Э. х 400.

Во многих местах наблюдается десквамация и распад эпидермиса вплоть до оголения жучек и повреждения на плавниках. Обнаруживаются очаги некроза эпидермиса, подкожной клетчатки и мускулатуры.

В печени выражена зернистая и вакуольная дистрофия гепатоцитов, выражающаяся декомплексацией и деформацией клеток и их ядер, в единичных их них кариопикноз.

В почках выявились вблизи клубочков очаги гиперплазии гематоэтической ткани. В ряде случаев четко выражена гиалиново-капельная дистрофия эпителия мочевых канальцев, которая проявляется скоплением многочисленных эозинофильных капель в цитоплазме клеток. В других органах патологические изменения были менее выражены.

У спонтанно больных рыб в целом микрокартина сходна с выше описанной, но требуется дальнейшая ее детализация и дифференциация в связи с частым осложнением флексибактериозом.

Проведённые исследования показывают, что герпесвирусная инфекция вызывает существенные патологические изменения не только в кожных покровах, но и во внутренних органах, то есть имеет генерализованный характер, что подтверждается положительными результатами вирусологических исследований. В целом, клинико-анатомическая картина при данной инфекции достаточно специфична. Она отличается характерными поражениями кожи в виде образования гиперпластических очагов, чётко выраженной гиалиново-капельной дистрофией почечного эпителия, а также более тяжёлыми некротическими и дистрофическими изменениями печени. Однако в связи с частым осложнением она может затушевываться симптомами флексибактериоза. Поэтому окончательный дифференциальный диагноз должен подтверждаться данными вирусологических исследований.

#### Список литературы

1. Щелкунов И.С. Герпесвирусная болезнь осетровых рыб в России. / И.С. Щелкунов, Т.И. Щелкунова, Щелкунов, А.И. Колбасова, Ю.П. Диденко, А.Ф. Быковский // Российский ветеринарный журнал СХЖ. 2007. №1. С.10–12.
2. Щелкунов А.И. Герпесвирусная болезнь сибирского осетра. / А.И. Щелкунов, И.С. Щелкунов // Ветеринария. 2010. №1 С. 18-21.
3. Щелкунов И.С. Методические рекомендации по диагностике герпесвирусной болезни сибирского осетра / И.С. Щелкунов, А.И. Щелкунов, Т.И. Щелкунова, В.И. Бальшева. М., 2009. 10 с.
4. Елеев Э.Л. Клинические признаки и патолого-анатомические изменения при экспериментальной герпесвирусной инфекции гибрида русского (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt) и сибирского (*Acipenser baerii*) осетров. / Э.Л. Елеев, Л.И. Грищенко // Российский ветеринарный журнал СХЖ. 2014. №1. С. 19-21.
5. Watson L.R. Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and subadult white sturgeon *Acipenser transmontanus* / L.R. Watson, S.C. Yun, J.M. Groff, R. P. Hedrick // Dis. Aquat. Org. 1995. V. 22. P. 199-210.

#### **PATOMORPHOLOGY CHANGES IN A STURGEON FISHES IN A HERPES VIRAL INFECTION**

Eleev E.L.,<sup>1</sup> Grishenko<sup>1</sup> L.I., Zabotkina<sup>2</sup> E.A., Ponomarev<sup>3</sup> V.N.

Post-mortem and histological changes of sturgeon fishes in a herpes viral infection are represented in the article.



# НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ В ОЦЕНКЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

И.А. Ерохина

*Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН,  
Мурманск, Россия, [erohina@mmbi.info](mailto:erohina@mmbi.info)*

Физиолого-биохимические параметры крови широко используются в диагностике различных отклонений в состоянии здоровья животных. Морские млекопитающие, в связи с их образом жизни и особенностями биологии, являются труднодоступным объектом для такого рода исследований. В то же время необходимость оценки состояния их здоровья возникает как при изучении этих животных в естественной среде обитания, так и при содержании их в неволе в многочисленных коммерческих и научно-исследовательских океанариумах. Нам представляется, что для создания стройной системы оценки состояния здоровья животных следует охарактеризовать как можно больше различных физиологических показателей в их взаимосвязи, и наиболее четкие и однозначные предлагать в качестве критериев оценки.

В адаптивных реакциях организма изменения в структуре и функциях мембран рассматриваются как одно из основных универсальных звеньев. Эритроциты являются наиболее удобными в качестве естественной модели для исследования общих характеристик всех биологических мембран, поскольку доказана корреляция между изменениями свойств эритроцитов и клеточных мембран внутренних органов. В клинической практике часто используется показатель проницаемости мембран эритроцитов как частный аспект изучения проницаемости клеточных мембран. К способам исследования данного показателя относятся определение осмотической стойкости и сорбционной способности эритроцитарных мембран.

Осмотическая стойкость эритроцитов (ОСЭ) является интегральным тестом, характеризующим изменение антиоксидантного статуса организма, и претерпевает сдвиги в

сторону снижения при многих заболеваниях внутренних органов, течение которых сопровождается активацией свободнорадикального окисления липидов. Известно, что высокоорганизованные животные и человек обладают более постоянной внутренней средой и в меньшей мере нуждаются в системе стабилизации объема, и поэтому более чувствительны к осмотическому шоку (Бессонова и др., 2004). По сравнению с наземными млекопитающими у морских эта чувствительность выражена в большей степени, что объясняется особенностью липидного состава их клеточных мембран и повышенной кислородной емкостью эритроцитов.

ОСЭ оценивали методом определения степени гемолиза в среде с разным объемным содержанием изотонических растворов хлористого натрия и мочевины (Камышников, 2000). Полученные показатели ОСЭ тюленей представлены в виде кривых гемолиза, характеризующих зависимость степени гемолиза (%) от концентрации гемолизирующего агента (рис.1, 2). Наши результаты согласуются с представлениями (Гелетюк и др., 1972) о сниженной в сравнении с наземными животными и человеком устойчивости эритроцитов к гемолизу, свидетельствующей о повышенной чувствительности организма морских млекопитающих к действию продуктов свободнорадикального окисления как экзогенного (корм), так и эндогенного (стресс, заболевание) характера (Куликов, 1986). На рисунке 1 видно, что кривые гемолиза эритроцитов ластоногих, существенно отличаясь от кривой для эритроцитов человека, имеют статистически достоверные ( $p < 0,01$ ) различия в области высоких концентраций гемолизирующего агента. Предполагается, что отмеченные различия обусловлены видовыми особенностями химического состава эритроцитарных мембран. Такие особенности отмечают авторы вышеупомянутого исследования (Гелетюк и др., 1972) как объяснение пониженной резистентности эритроцитов водных млекопитающих по сравнению с наземными хищными. Более поздние работы (Куликов и др., 1988) приводят данные о том, что в процессе гемолиза определенное значение может иметь содержание гемоглобина в эритроцитах и его способность связывать кислород. Представляется, что появляющиеся в крови

супероксидные анионы взаимодействуют с оксигемоглобином, в результате чего происходит образование метгемоглобина и перекиси водорода. Образующийся комплекс обладает свойствами сильного окислителя и отвечает за гемолиз эритроцитов.

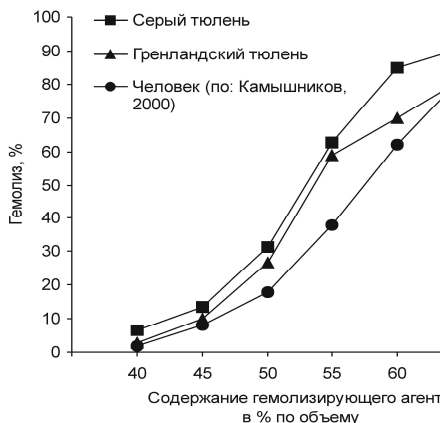


Рис. 1. Видовые особенности осмотической стойкости эритроцитов

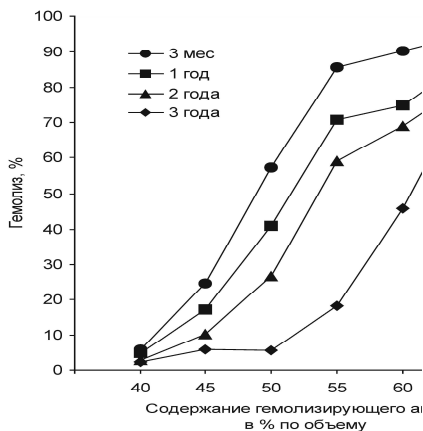


Рис. 2. Осмотическая стойкость эритроцитов гренландских тюленей разного возраста

При общей высокой чувствительности к окислительному стрессу эритроцитарные мембраны тюленей одного вида, как показали наши исследования, в разной степени реагируют на гемолитизирующие воздействия в зависимости от возраста животных. Изучение возрастных особенностей ОСЭ проводили у гренландских тюленей, длительное время содержащихся в неволе. Кривые гемолитизации, характеризующие осмотическую стойкость эритроцитов у животных в возрасте 3 мес, 1, 2 и 3 года, представлены на рисунке 2. Наибольшей чувствительностью к действию гемолитизирующего агента обладают эритроциты щенков тюленей (возраст 3 мес), затем по мере взросления животных этот показатель снижается. Причем, статистически достоверные различия между тюленями разного возраста отмечены только в срединной части диапазона концентраций гемолитизирующего агента - 50-60% по объему. При меньших и больших концентрациях гемолитика реакция эритроцитарных мембран существенно не различается.

Повышение с возрастом устойчивости эритроцитов к гемолизу вполне объяснимо известным фактом совершенствования процессов регуляции, направленных на контролирование метаболизма с целью более быстрой и лучшей приспособляемости его к условиям окружающей среды (Золотарева, 1998).

Сорбционную способность эритроцитов (ССЭ) определяли методом, основанным на представлении об эритроците как универсальном адсорбенте (Тогайбаев и др., 1988).

У изученных нами видов морских млекопитающих установлена значительная вариабельность ССЭ в пределах 4-57%. При этом наиболее широкий диапазон значений отмечен для эритроцитов гренландского тюленя (3,75%-57,50%). У серого тюленя ССЭ варьирует от 7,29% до 50,00%, у морского зайца – от 7,32% до 27,96%. Данные по ССЭ у морского зайца нуждаются в дальнейшем уточнении в связи с тем, что нами были обследованы животные в возрасте от 3-х до 10 лет, тогда как для гренландского и серого тюленей были получены значения ССЭ и для младших возрастных групп – от нескольких месяцев до 1-2 лет, в которых и отмечена вышеупомянутая широкая вариабельность изучаемого показателя.

У тюленей ССЭ относительно стабильна в течение первых трех лет жизни и находится в среднем в пределах 15-22%, достоверно увеличиваясь к 5-летнему возрасту до 36% (рис.3).

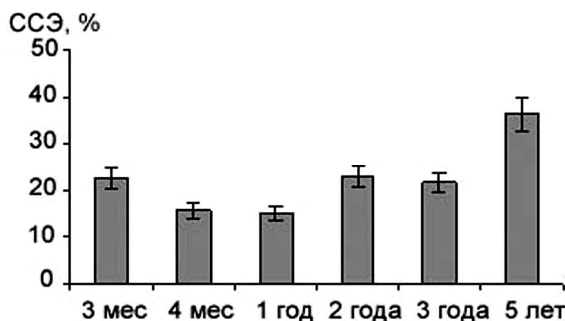


Рис. 3. Сорбционная способность эритроцитов (ССЭ) гренландских тюленей разного возраста.

У морских млекопитающих, по сравнению с наземными и человеком, следовало бы ожидать более высокие уровни ССЭ как следствие повышенной адсорбционной функции эритроцитов для поддержания низкой вязкости крови. Так, величина этого показателя у человека в норме составляет около 45% (Тогайбаев и др., 1988). В наших исследованиях нет данных о ССЭ у животных старше 5 лет (гренландский и серый тюлени) и 10 лет (морской заяц), в связи с этим можно лишь предположить, что в дальнейшем с возрастом не исключено повышение ССЭ. Основанием для этого служат данные литературы о том, что при старении животных происходят изменения морфофизиологических показателей эритроцитов, снижение стабильности эритроцитарных мембран вследствие возрастной интенсификации свободнорадикальных процессов в крови (Теплый, 2011).

Сорбционная способность эритроцитов тюленей характеризуется выраженной сезонной изменчивостью – снижение в весенне-летний период и повышение в осенне-зимний (рис.4). Наиболее вероятным представляется объяснение этого факта с позиции вышеупомянутой связи ССЭ с уровнем свободнорадикальных процессов. Имеются данные об интенсификации процессов перекисного окисления липидов у животных, обитающих в северных широтах, а также экспериментальные доказательства усиления свободнорадикального окисления при понижении температуры окружающей среды (Куликов и др., 1988).

Значительные изменения ССЭ (в 1,5-2 раза) наблюдаются в процессе адаптации животных к условиям неволи (рис.5) независимо от возраста. Динамика уровня ССЭ в период адаптации к неволе имеет волнообразный вид и характеризуется у всех обследованных животных резким снижением (в 4-6 раз) в течение первой недели содержания в неволе. К концу четвертой недели пребывания в неволе показатели ССЭ в целом приближаются к исходным. Очевидно, в данном случае наблюдается усиление адсорбционно-транспортной функции эритроцитов для стабилизации уровня метаболитов в плазме крови (Ошакбаев и др., 2007) в условиях развития стресс-реакции

в начальный период содержания животных в неволе. В дальнейшем интенсивность адсорбции снижается на фоне активизации компенсаторно-приспособительных механизмов стабилизации состава крови при стрессе, описанных у морских млекопитающих при адаптации к условиям неволи (Каганова и др., 2002).

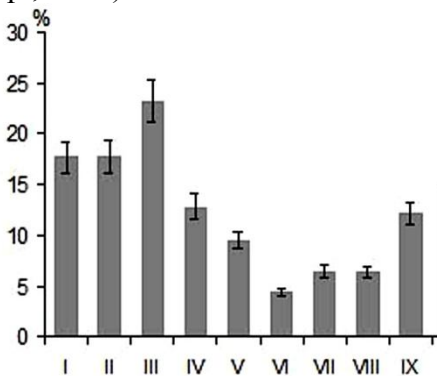


Рис. 4. Сорбционная способность эритроцитов (%) гренландских тюленей в течение года

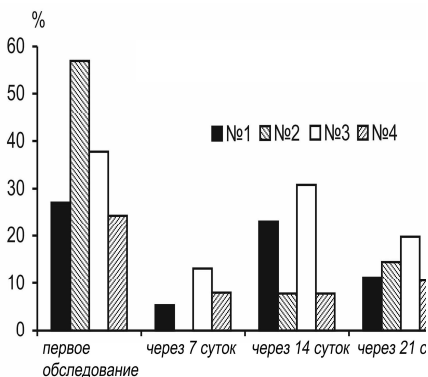


Рис. 5. Сорбционная способность эритроцитов (%) гренландских тюленей в период адаптации к неволе

Нами определялись значения ССЭ у тюленей при заболеваниях различной этиологии. Были отмечены закономерности, описанные и для наземных животных (Нежданов и др., 2010), в частности, повышение ССЭ пропорционально тяжести течения процесса. Так, например, у самца морского зайца с многочисленными кожными высыпаниями и язвами уровень ССЭ составлял 32,14%. В результате лечения через 25 суток внешние поражения исчезли, гематологические и биохимические исследования показали нормализацию показателей крови. ССЭ в этот период снизилась до 21,74%, практически до уровня, отмечаемого до заболевания. В это же время в крови установлено уменьшение содержания продуктов перекисного окисления липидов с 1,1 нмоль/мг липидов до 0,35 нмоль/мг липидов.

Таким образом, в результате исследований установлена значительная вариабельность степени устойчивости эритроцитов к гемолизу и уровня их сорбционной способности у различных

видов морских млекопитающих. Для ластоногих определены естественные факторы, влияющие на изменчивость данных показателей – возраст, сезон, стресс в период первичной адаптации к неволе. Установленные факты приводят к заключению, что в настоящее время определение изученных характеристик эритроцитов для диагностики состояния морских млекопитающих наиболее вероятно в условиях длительного содержания животных в неволе, где возможно определение индивидуальной нормы каждого показателя.

#### Список литературы

1. Бессонова С.В., Ташмухамедов Б.А., Сабиров Р.З. Чувствительность эритроцитов человека и некоторых видов животных к коллоидно-осмотическому лизису // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2004. Т. 40, № 1. С. 87-89.

2. Гелетюк В.В., Маминов М.К., Анбиндер Е.М. Некоторые показатели крови выдры, двух видов настоящих тюленей и наземных хищных // Тез. докл. V Всес. совещ. по изучению морских млекопитающих / Махачкала, сентябрь 1972 г. Махачкала, 1972. Ч.2. С. 59-62.

3. Золотарев Н.Н. Физиолого-биохимические особенности метаболизма северных морских котиков // Северный морской котик: систематика, морфология, экология, поведение. Ч. 1. М., 1998. С. 386-405.

4. Каганова Н.В., Коношенко С.В., Ларина М.В. Состояние внутриэритроцитарного метаболизма у дельфинов-афалин при адаптации к условиям океанариума // Морские биотехнические системы. Севастополь, 2002. Вып. 2. С. 173-181.

5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2т. Т.2. Минск: Беларусь, 2000. С. 209-210.

6. Куликов Н.А. Предпосылки к разработке специализированного поливитаминового препарата для дельфиновых // Тезисы докл. IX Всес. совещ. по изучению, охране и рац. использованию морских млекопитающих / Архангельск, сентябрь 1986 г. Архангельск, 1986. С. 230-231.

7. Куликов В.Ю., Семенюк А.В., Колесникова Л.И. Перекисное окисление липидов и холодовой фактор. Новосибирск: Наука, 1988. 192 с.

8. Нежданов А.Г., Рецкий М.И., Алехин Ю.Н., Сафонов В.А., Шушлебин В.И., Папин Н.Е., Брехов Т.П., Шишкина Е.В. Клинико-гематологический и биохимический статус коров при гестозе // Сельскохозяйственная биология. 2010. № 4. С. 118-123.

9. Ошакбаев К.П., Хан О.Р., Кожабекова Б.Н., Сейтбай А.Н., Дукенбаева Б.А., Ищанова Г.Р. Взаимосвязь между эндогенной интоксикацией и анемией // Профилактик. медицина. 2007. № 1. С. 21-25.

10. Теплый Д.Д. Особенности морфофизиологических показателей эритроцитов белых крыс на этапах онтогенеза в норме и при оксидативном стрессе. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Астрахань, 2011. 21 с.

11. Тогайбаев А.А., Кургузкин А.В., Рикун И.В., Карибжанова Р.М. Способ диагностики эндогенной интоксикации // Лаб. дело. 1988. № 9. С. 22-24.

### **SOME PROPERTIES OF ERYTHROCYTES IN THE EVALUATION OF PHYSIOLOGICAL STATE OF MARINE MAMMALS**

Erokhina I.A.

The results of the study of the erythrocyte osmotic resistance (EOR) and the sorption capacity of erythrocytes (SCE) in the blood of some marine mammal species (harp seal, gray seal, bearded seal) are submitted. The aim of this work was to evaluate the possibility of using these indicators to characterize the physiological state of the animals, in particular, the state of health at the level of norm-pathology.

The method of studying EOR is based on determination of hemolysis degree in the medium of different volumetric composition of isotonic sodium chloride and urea solutions. SCE determined by a method based on the concept of the erythrocyte as a universal adsorbent using the vital dye methylene blue.

It is shown that marine mammal erythrocytes are characterized by species, age and seasonal variability of sensitivity to osmotic lysis at higher level of this parameter as compared to terrestrial animals and man.

It is revealed considerable variability of SCE within 4-57% for marine mammals species studied. There are natural factors affecting the variability of this indicator for pinnipeds - the season, age, stress-response during the initial adaptation to captivity. SCE was increased for sick animals, in the course of treatment SCE was declined and during convalescence – stabilization of the level recorded before the disease.

Currently, the use of the parameters studied for the diagnosis of the status of marine mammals, most likely in long-term maintenance of animals in captivity, where it is possible to determine the individual rules of these indicators.

### **БУФЕРНЫЕ, ДЫХАТЕЛЬНЫЕ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОКУНЯ (*PERCA FLUVIATILIS*)**

Р.А. Запруднова, И.М. Камшилов

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,  
Борок, Россия, e-mail: [rimma@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:rimma@ibiw.yaroslavl.ru)*

У речного окуня *Perca fluviatilis* L. Волжского бассейна буферные, дыхательные и энергетических свойства изучали по функциональным свойствам гемоглобина (сродство к кислороду, эффект Бора), концентрации натрия и калия в плазме крови, эритроцитах и мышцах.



По содержанию натрия в плазме крови окунь превосходил все известные нам по собственным и литературным данным 24 вида пресноводных рыб. В результате концентрационный градиент по натрию между наружной и внутренней средой, а также вне- и внутриклеточной средой у окуня был выше, чем у других видов пресноводных рыб. Это указывает на большую неравновесность организма окуня как живой системы и на более высокий энергетический потенциал в сравнении с другими видами пресноводных рыб. Высокий уровень энергетики окуня рассматривается в качестве неспецифического механизма повышения общей устойчивости этого вида рыб к разного рода неблагоприятным факторам, включая антропогенные загрязнители техногенного характера.

У окуня выявлен большой диапазон реакции оксидеозигенации гемоглобина при изменении концентрации и кислотности буферного раствора. На высокую эффективность гемоглобиновой буферной системы окуня в адаптации к низким значениям pH среды указывает большая величина эффекта Бора и низкое сродство гемоглобина к кислороду вплоть до неполной оксигенации в кислом буферном растворе. Высокая концентрация натрия в эритроцитах окуня свидетельствует о большой интенсивности  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена через мембрану красных кровяных клеток и, следовательно, о сильной способности к защелачиванию внутриэритроцитарной среды. Особенности буферных свойств гемоглобина и ионного окружения рассматриваются в качестве механизмов повышения устойчивости окуня к закислению воды.

Высокое сродство гемоглобина к кислороду (вплоть до неполной дезоксигенации в щелочном буферном растворе), наблюдаемое у окуня, является важным молекулярным механизмом адаптации к гипоксии, обеспечивающим уменьшение потребления кислорода организмом. Для окуня характерна также высокая концентрация калия в эритроцитах, как и у других рыб, устойчивых к гипоксии. Особенности дыхательных свойств гемоглобина и ионного окружения рассматриваются в качестве механизмов повышения устойчивости окуня к недостатку кислорода в воде.

## **BUFFER, RESPIRATORY AND ENERGETIC PECULIARITY OF PERCH (*PERCA FLUVIATILIS* L)**

Zaprudnova R.A, Kamshilov I.M.

Buffer, respiratory and energetic properties of perch *Perca fluviatilis* L. in the Volga basin were studied on the basis of the functional properties of hemoglobin (the oxygen affinity, Bohr effect), the concentration of sodium and potassium in the blood plasma, red blood cells and muscles. The features of these properties are considered as mechanisms for the increase of the stability of perch to various adverse factors, including such as acidification of water, low oxygen content, etc.

## **НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ РЫБЫ В УЗВ**

О.В. Казимирченко, М.Ю. Котлярчук

*ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет, Калининград, Россия, e-mail:*

*[okazimirchenko@gmail.com](mailto:okazimirchenko@gmail.com), [mkotlyarchuk@mail.ru](mailto:mkotlyarchuk@mail.ru)*

Выращивание рыбы в установках с замкнутым циклом водообеспечения (УЗВ) – это переход индустриального рыбоводства на качественно новый уровень аквакультуры, позволяющий значительно повысить рыбопродуктивность, сократить сроки выращивания, обеспечить экономию кормов и тепловой энергии. Данная технология аквакультуры обеспечивает формирование разнообразных микробных сообществ рыбы и среды ее обитания, среди которых часто доминируют группы условно-патогенных бактерий, которые могут стать причиной возникновения бактериальных инфекций выращиваемой рыбы. Поэтому при проведении ихтиопатологического контроля в условиях оборотного водоснабжения наиболее информативными становятся комплексные лабораторные исследования всех составляющих звеньев системы.

Нашими исследованиями было выявлено, что формирование микрофлоры рыбы в УЗВ и ее дальнейшее функционирование происходят под влиянием различных факторов. Данный процесс не обладает стабильностью, поскольку формирование новых микробных сообществ происходит в ответ на неустойчивость любого звена системы. Нами установлен тот факт, что при

зарыблении рыбоводных емкостей микробное сообщество формируется за счет микроорганизмов, вносимых с посадочным материалом и микроорганизмов, поступающих с подаваемой в бассейны водой. При этом микробные популяции рыбопосадочного материала в условиях УЗВ оказываются состоящими из условно-патогенных бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*, и населяют рыбу при ее дальнейшем выращивании.

На всех этапах жизненного цикла продукции следует учитывать также изменение показателей общей бактериальной обсемененности воды и кормов. Колебания численности гетеротрофных бактерий обычно четко коррелирует с увеличением взвешенного органического вещества в воде бассейнов и указывает на работу биофильтров. При санитарно-микробиологическом исследовании воды в УЗВ по выращиванию карпа нами было установлено, что в течение всего периода содержания рыбы значения общей бактериальной обсемененности воды находились в пределах  $10^3 - 10^5$  КОЕ/мл.

Анализ изменения численности гетеротрофных бактерий в воде бассейнов УЗВ при выращивании стерляди показал, что уровень общей бактериальной обсемененности воды при выходе из бассейнов до поступления её на очистку в механический фильтр составлял в среднем  $7,8 \times 10^3$  КОЕ/мл. При этом минимальное количество гетеротрофных бактерий в воде было в первые месяцы исследования (в среднем  $10^2$  КОЕ/мл). Увеличение количества гетеротрофов в водной микрофлоре регистрировали на 12 месяц содержания рыбы (в среднем  $1,2 \times 10^4$  КОЕ/мл). Общая бактериальная обсемененность воды после её очистки в биофильтре на протяжении всего периода выращивания стерляди составляла в среднем  $2,0 \times 10^3$  КОЕ/мл при минимальном значении 10 КОЕ/мл в первый месяц выращивания рыбы.

Микробиологические исследования, проведенные нами в течение 7 месяцев в УЗВ при выращивании угря, также установили значение показателя общей бактериальной обсемененности воды как индикатора работы системы. Так, например, выход из строя биофильтра привел к значительному увеличению количества гетеротрофных бактерий в воде. В течение месяца общее микробное число воды из бассейнов

находилось в пределах  $6,3 \times 10^4$ – $1,5 \times 10^5$  КОЕ/мл. После запуска биофильтра и стабилизации нормативных параметров воды по аммиаку, нитритам и нитратам значения общего микробного числа воды понижались (в среднем до  $4,4 \times 10^2$  КОЕ/мл) и на протяжении всего периода наших наблюдений оставались практически на одном уровне.

Постоянными членами микробиоценоза в рециркулируемой воде рыбоводных емкостей УЗВ по выращиванию карпа были условно-патогенные бактерии рода *Aeromonas* наряду с бактериями семейства Enterobacteriaceae, которые определяли микробную обсемененность органов рыбы. При проведении микробиологических исследований стерляди из бассейнов УЗВ нами установлено, что в составе микрофлоры рыбы и воды в основном присутствуют условно-патогенные бактерии рода *Aeromonas* и санитарно-значимые бактерии рода *Citrobacter*. При этом аэромонады доминировали в микрофлоре воды, цитробактеры – в микрофлоре рыбы. Микробный фон воды бассейнов УЗВ по выращиванию угря в основном формировали аммонифицирующие бактерии рода *Bacillus*, бактерии группы кишечных палочек (при доминировании бактерий рода *Citrobacter*), условно-патогенные бактерии рода *Aeromonas*. Аэромонады наряду с бактериями рода *Pseudomonas* и кишечными цитробактерами формировали состав микрофлоры органов угря.

Для установления механизмов формирования микробиоценоза выращиваемых рыб в УЗВ необходимо учитывать микробную обсемененность кормов, особенно в отношении присутствия потенциально опасных для рыбы бактерий. Микробный пейзаж корма, применяемого в УЗВ по выращиванию карпа, был представлен как свойственными ему микроорганизмами рода *Bacillus*, так и посторонней микрофлорой – бактериями родов *Micrococcus*, *Escherichia* и *Aeromonas*, что свидетельствует о загрязнении корма в процессе хранения. Бактериофлора кормов, применяемых при выращивании стерляди, включала кишечных бактерий рода *Citrobacter*, условно-патогенных бактерий рода *Pseudomonas*, сапрофитных споровых бактерий рода *Bacillus*, кокковых бактерий родов *Micrococcus* и

*Streptococcus*. Все эти группы бактерий обнаруживали в микрофлоре рыбы. Корма, используемые при выращивании угря, были обсеменены только спорowymi бактериями рода *Bacillus*.

Таким образом, при выращивании рыбы в установках с замкнутым циклом водообеспечения систематический микробиологический контроль рыбы и среды ее обитания дает наиболее объективную картину процессов, происходящих в искусственной экосистеме и влияющих на рост и выживаемость рыбы. Ихтиопатологический мониторинг должен учитывать и своевременно выявлять особенности поведения микробных сообществ в УЗВ в ответ на изменяющиеся факторы среды для разработки и внедрения соответствующих рыбоводных мероприятий.

#### **SOME FEATURES OF MICROBIAL COMMUNITY FUNCTIONING IN WATER SUPPLY CLOSED FISH SYSTEM**

Kazimirchenko O.V., Kotlyarchuk M.Yu.

The microbiological investigations of carp, sturgeon and eel reared in water supply closed system were carried out. The important role of stocking material, water and feed quality in fish health has been revealed.

#### **МОЛЛЮСКИ КАК ИНДИКАТОРЫ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ**

А.Ю. Клишин, Н.А. Каниева, Н.Н. Федорова, О.В. Баджаева  
*Астраханский государственный технический университет,  
Астрахань, Россия, e-mail: [kanievana52@mail.ru](mailto:kanievana52@mail.ru)*

Среди многих экологических проблем в последние годы одну из ведущих позиций занял глобальный процесс загрязнения поверхностных вод нефтяными углеводородами, которые относятся к числу наиболее распространенных и опасных токсических веществ (Абуталиева и др., 2010; Гольбина и др., 2013; Локтионова и др., 2012; Муссунда и др., 1999). Концентрация нефтепродуктов в донных отложениях водного участка Волго-Ахтубинской поймы района АТК в последние годы колебалась от 80-380 мг/кг сухого вещества, при этих показаниях вода считается средне загрязнённой (Андрианов, 2002). По

мнению ученых (Рылина и др., 2013), в последние годы экологическая обстановка в западной части предустьевое пространства р. Волги и на выходных участках каналов - рыбоходов в период прохождения через них рыбы на нагульные площади (июнь) была напряженный вследствие воздействия на эти районы опасных токсикантов, в числе которых были нефтепродукты. Так, концентрация нефтепродуктов, в среднем в эти годы в волжской дельте была выше ПДК в 2,7-5,9 раза (2013г.- $133,4 \pm 74,6$  мкг/л; 2014г.- $292,7 \pm 113,9$  мкг/л) выше ПДК. Так как риск нефтяного загрязнения дельты реки Волги постоянно растет, предпринята попытка провести мониторинговые исследования состояния внутренних органов моллюсков, рассматривая моллюсков как индикаторов этого загрязнения.

Исследовано 30 экземпляров пресноводных двустворчатых моллюсков, представителей класса настоящие пластинчатожаберные (*Lamellibranchia* или *Bivalvia*), рода *Unio*. Моллюски собраны в дельтовых водотоках реки Волги в июне 2014 года. Все моллюски были отпрепарированы, их внутренние органы были зафиксированы в 12% нейтральном формалине, после чего были изготовлены гистологические препараты по общепринятым методикам (Волкова и др., 1982).

В результате исследования органов и тканей моллюсков рода *Unio* получены следующие материалы.

Мантийная полость, в ней помещается нога и жабры. Вся поверхность мантийной полости покрыта однослойным ресничным эпителием. У многих эпителиальных клеток отсутствовали реснички, из-за чего клетки уменьшались в длину; между отдельными клетками имелись довольно значительные пространства, которые могли возникнуть из-за некроза отдельных эпителиальных клеток или из-за отека всей эпителиальной пластинки.

Органы дыхания – жабры расположены по бокам ноги, представлены с каждой стороны двумя полужабрами, внутренней и наружной. Каждая полужабра состояла из ряда изогнутых жаберных нитей, соединенных между собой соединительнотканными перекладинами, образовавших две решетчатые жаберные пластинки – нисходящую и восходящую,

переходящих одна в другую. Жаберные нити оканчивались лепесточками, выстланными ресничным эпителием, который в жабрах являлся респираторным. Основой каждого лепесточка был капилляр, наполненный плазмой крови, в некоторых капиллярах имелись амебоидные клетки, по-видимому, это клетки крови моллюсков. На многих верхушках лепестков ресничный эпителий был слущен; есть лепесточки, в которых ресничный эпителий слущен и с боковых поверхностей этих образований. Капилляры лепестков соединялись в лакуны, где скапливалась плазма и амебоидные клетки. В соединительнотканых перемышках также находились значительных размеров сосудистые лакуны.

Нога представляла собой мышечный клинообразный вырост, направленный вершиной вперед. Нога имела систему мышц, выдвигающих ногу и мышцы, втягивающие ее. В верхнюю часть ноги, состоящую, в основном, из рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, входили некоторые внутренние органы.

Мышечные клетки, вытянутой формы имели косую исчерченность и овальные ядра. Эти клетки собраны в мышечные волокна, между которыми имелись заметные пространства, что указывало на отек мышечной ткани: некоторые мышечные волокна были фрагментированы.

Органы размножения – яичники. Они расположены в верхней части ноги среди рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, между петлями кишок, они имели гроздевидную форму. В яичниках располагалось много камер (цист), где находились яйцеклетки по 9-12 штук, но иногда в камерах было только по 2 или 3 яйцеклетки. Эти камеры (цисты) были выстланы фолликулярным эпителием, причем яйцеклетки, в основном, были разной формы: от округлой до многоугольной.

Органы пищеварения. Ротовое отверстие было расположено в передней части животного; рот открывался в короткий пищевод, переходивший в объемистый желудок. Весь эпителий кишечного тракта реснитчатый. Петли кишечника были выстланы очень высокими цилиндрическими клетками с ресничками на их апикальных частях. Причем, у многих клеток реснички отсутствовали. Ядра, вытянутой овальной формы, находились в

нижней (базальной) части клеток. Между некоторыми клетками имелись значительные промежутки из-за некроза 1-2 соседних клеток. Иногда некроз распространялся на 10-12 клеток. Между высокими цилиндрическими клетками встречались наполненные слизью бокаловидные клетки. Вокруг желудка была расположена пищеварительная железа - печень, состоящая из множества канальцев, стенки этой железы состояли из трех видов клеток: железистых, секреторных, специализированных, вырабатывающих кальций, многие из которых некротизированы, между клетками находились значительные пространства (отек эпителия). Все эти канальца объединяясь, открывались в кишку моллюска.

Органы выделения были представлены парой почек, лежащих с каждой стороны перикардия. Почки представляли собой видоизмененные метанефридии, в виде извитых канальцев, открывавшихся с одной стороны, в перикардий, с другой – в мантийную полость. Канальца были выстланы кубическим эпителием. Эпителиальные клетки накапливали секрет, затем апикальная часть их отрывалась (апокриновая секреция).

Следует отметить, что соединительнотканых капсул между органами не существует, они как бы «плавают» в рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани.

Резюмируя вышеизложенное, следует отметить, что все ткани и органы моллюска были отечными. Во всех эпителиальных тканях встречались некротизированные участки и отдельные погибшие клетки. Значительные повреждения имелись в жабрах: респираторный эпителий во многих лепестках жабр был слущен. Неспецифические изменения, обнаруженные у моллюсков, взятых из дельтовых районов р. Волги были сходны с изменениями внутренних органов моллюсков рода *Unio*, полученными в экспериментах с воздействием нефти в концентрации, равной 1 мг/л и продолжительностью 60 суток. Таким образом, жабры моллюска рода *Unio* могут служить тест-объектом для оценки состояния поверхностных вод, в основном, загрязненных нефтепродуктами.



### Список литературы

1. Абуталиева И.Р., Исакова В.В. Освоение газоконденсатных месторождений как фактор изменения экосистем Астраханского Прикаспия. // Вестник АГТУ. 2010. №2(50). С. 7-12.
2. Андрианов В.А. Геоэкологические аспекты деятельности Астраханского газового комплекса: монография. Астрахань: АГМА. 2002. 245 с.
3. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина. 1982. 304 с.
4. Гольбина О.В., Каниева Н.А., Федорова Н.Н. Влияние нефтяного загрязнения среды обитания на морфологические показатели моллюсков рода *Unio* // Международная НКП «Проблемы сохранения экосистем Каспия в условиях освоения нефтегазовых месторождений». Астрахань: Газпром ВНИИГАЗ. 2013. С. 62-64.
5. Локтионова Е.Г., Андрианов В.А., Яковлева Л.В. Экологическое состояние водных объектов Астраханской области // Фундаментальные исследования. 2012. №9 (3). С. 598-601.
6. Муссунда Т.М.Э., Осипов Б.Е. Оценка качества биотопов открытых водоемов в районе АГК по состоянию зообентоса // Проблемы освоения Астраханского газоконденсатного месторождения: научные труды АНИПИГаз. Астрахань: АНИПИГаз. 1999. С. 227-228.
7. Рылина О.Н., Карыгина Н.В., Попова О.В., Попова Э.С., Галлей Е.В., Львова О.А. Общие закономерности распределения загрязняющих веществ в экосистеме Северного Каспия // Сохранение и восстановление биологических ресурсов Каспийского моря: Сб. статей. Баку: БГУ. 2013. С. 421-426.

### **MOLLUSCS AS INDICATORS OF OIL POLLUTION**

Klishin A.Y., Kanieva N.A., Fedorova N.N., Badjaeva O.V.

Investigated the morphological features of organs and tissues of freshwater bivalve molluscs, members of the class present plastination (*Lamellibranchia*), of the genus *Unio* from Delta waterways of the Volga river. It is found that all tissues and organs of the clam swollen. In all epithelial tissue is found mortification sections and separate the dead cells. Considerable damage has in the gills: respiratory epithelium in many petals gills sluman.

# **ВЛИЯНИЕ НИЗКОЧАСТОТНЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ В КОМБИНАЦИИ С НЕБЛАГОПРИЯТНЫМИ ФАКТОРАМИ СРЕДЫ ВО ВРЕМЯ ЭМБРИОГЕНЕЗА НА СОСТОЯНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ РЫБ (НА ПРИМЕРЕ ПЛОТВЫ *RUTILUS RUTILUS*)**

В.В. Крылов, Ю.Г. Изюмов, Ю.В. Чеботарёва  
*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина  
РАН, Борок, Россия, e-mail: [kryloff@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:kryloff@ibiw.yaroslavl.ru)*

Магнитные поля (МП) – это фактор, постоянно воздействующий на живые организмы. Более трёх миллиардов лет эволюция жизни на Земле протекала на фоне геомагнитного поля. Однако за последнее столетие магнитный фон претерпел значительные модификации за счет деятельности человека. На естественное поле накладываются МП антропогенного происхождения. Эти поля имеют широкий разброс по частоте и амплитуде (Leitgeb et al., 2008). Среди антропогенных переменных МП особое место занимают низкочастотные МП с частотой от 0 до 3000 Гц (IEEE, 2002). Это связано, прежде всего, с тем, что такие поля способны оказывать значительное влияние на организмы, даже если их интенсивность ниже, чем у геомагнитного поля (Volpe, 2003). В естественных водоемах различные МП возникают при электролове рыбы, работе электрорыбозаградителей, в процессе морской геофизической разведки методами электроразведки, при эксплуатации подводных переходов нефтяных и газовых трубопроводов, оборудованных системами катодной защиты, а также при работе источников или преобразователей электрической энергии вблизи крупных промышленных центров.

Хорошо известно о том, что многие рыбы используют геомагнитное поле для ориентации в пространстве с помощью магнитосенсорных систем (Krylov et al., 2014). Однако воздействие антропогенных МП на рыб практически не исследовано. В единичных работах показано, что МП интенсивностью 40 мкТл, пульсирующее с частотой 1 Гц приводит к увеличению уровня мелатонина в ночное время у

годовиков американской палии *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) (Lerchl et al., 1998), а переменное МП (18.5 Гц 44.5 мкТл) на фоне постоянного МП 24.2 мкТл вызывает значительное снижение активности внутриклеточных кальций-зависимых протеиназ в мышцах и мозге сеголетков карпа (*Cyprinus carpio* L.), плотвы (*Rutilus rutilus* L.) и годовиков карася (*Carassius carassius* (L.)) (Kantserova et al., 2013a, 2013b). Сообщается также о задержке в вылуплении предличинок *Danio rerio* (Hamilton) (Cyprinidae) и медаки *Oryzias latipes* (Temminck & Schlegel), экспонировавшихся в переменном МП 50 Гц 1 мТл и 60 Гц 0.1 мТл соответственно (Cameron et al., 1985; Skauli et al., 2000).

Механизмы воздействия МП на биологические системы носят универсальный характер (Binhi, 2002), а в будущем прогнозируется увеличение электромагнитного загрязнения окружающей среды. К тому же известно, что эффекты МП могут в различной степени модулироваться в присутствии неблагоприятных факторов среды (Kostoff, Lau, 2013). Исходя из этого, важно оценить влияние МП как отдельно, так и в комбинации с различными неблагоприятными условиями среды на естественные популяции рыб. Поскольку эмбриогенез рыб и других животных является наиболее чувствительным к воздействию МП отрезком онтогенеза, нам было интересно исследовать влияние МП на рыб из естественного водоема именно на этом этапе. В данном сообщении мы обобщили многолетние данные экспериментов по исследованию влияния слабых МП и неблагоприятных условий среды на эмбриогенез плотвы *R. rutilus*.

Экспозиции в МП подвергались развивающиеся эмбрионы. Половые продукты получали от производителей, выловленных в Рыбинском водохранилище во время естественного нереста. Осеменение проводилось сухим способом. После осеменения икру помещали в кристаллизаторы с речной водой, которую меняли дважды в сутки. Эмбрионы из контрольных вариантов на протяжении всего раннего развития находились в естественном геомагнитном поле и чистой речной воде при температуре от 14 до 19°C. Эмбрионы из экспериментальных вариантов в разные годы подвергались следующим воздействиям:

2003 г. – воздействие МП 1.4-1.6 мкТл (здесь и далее указаны пределы неоднородности интенсивности МП внутри колец Гельмгольца) с частотой 500 Гц на эмбрионы от оплодотворения до вылупления предличинок.

2004 г. – воздействие МП 1.4-1.6 мкТл<sup>1</sup> с частотой 500 Гц на различные временные интервалы во время раннего развития плотвы. Вариант 1 – от оплодотворения до стадии гастрюляции или первые 27 часов развития. Вариант 2 – от гастрюляции до вылупления предличинок или промежутков с 27 до 135 часов от оплодотворения. Вариант 3 – от вылупления предличинок до рассасывания желточного мешка или промежутков с 135 до 230 часов от оплодотворения.

2005 г. – воздействие МП и химического агента хлорорганической природы – хлорофоса – на эмбрионы плотвы от оплодотворения до начала органогенеза или в течение первых 48 часов развития. Вариант 1 – МП 1.4-1.6 мкТл с частотой 500 Гц. Вариант 2 – раствор хлорофоса в речной воде в концентрации 0.01 мг/л. Вариант 3 – комбинированное действие МП 1.4-1.6 мкТл с частотой 500 Гц и раствора хлорофоса в речной воде в концентрации 0.01 мг/л.

2006 г. – воздействие МП 1.4-1.6 мкТл с частотой 500 Гц на эмбрионы плотвы от оплодотворения до начала органогенеза или в течение первых 48 часов развития.

2007 г. – воздействие МП и химического агента неорганической природы – медного купороса на эмбрионы плотвы от оплодотворения до начала органогенеза или в течение первых 48 часов развития. Вариант 1 – МП 1.4-1.61 мкТл с частотой 72.5 Гц. Вариант 2 – раствор медного купороса в речной воде в концентрации 0.01 мг/л. Вариант 3 – комбинированное действие МП 1.4-1.6 мкТл с частотой 72.5 Гц и раствора медного купороса в речной воде в концентрации 0.01 мг/л.

2008 г. – воздействие МП и повышенной температуры (термошок) на эмбрионы плотвы от оплодотворения до

---

<sup>1</sup> Некоторые данные за 2004 и 2007 гг. ранее были опубликованы в журналах “Вопросы ихтиологии” и “Журнал СФУ серия «Биология»”. При этом были допущены неточности в обозначении интенсивности МП. Здесь приведены корректные данные.

гастроуляции и начала органогенеза или в течение первых 36 часов развития. Вариант 1 –МП 1.4-1.6 мкТл с частотой 500 Гц. Вариант 2 – постоянная температура воды – 23 °С (такая температура близка к критической для эмбриогенеза плотвы в Рыбинском водохранилище). Вариант 3 – комбинированное действие МП 1.4-1.6 мкТл с частотой 500 Гц и повышенной температуры.

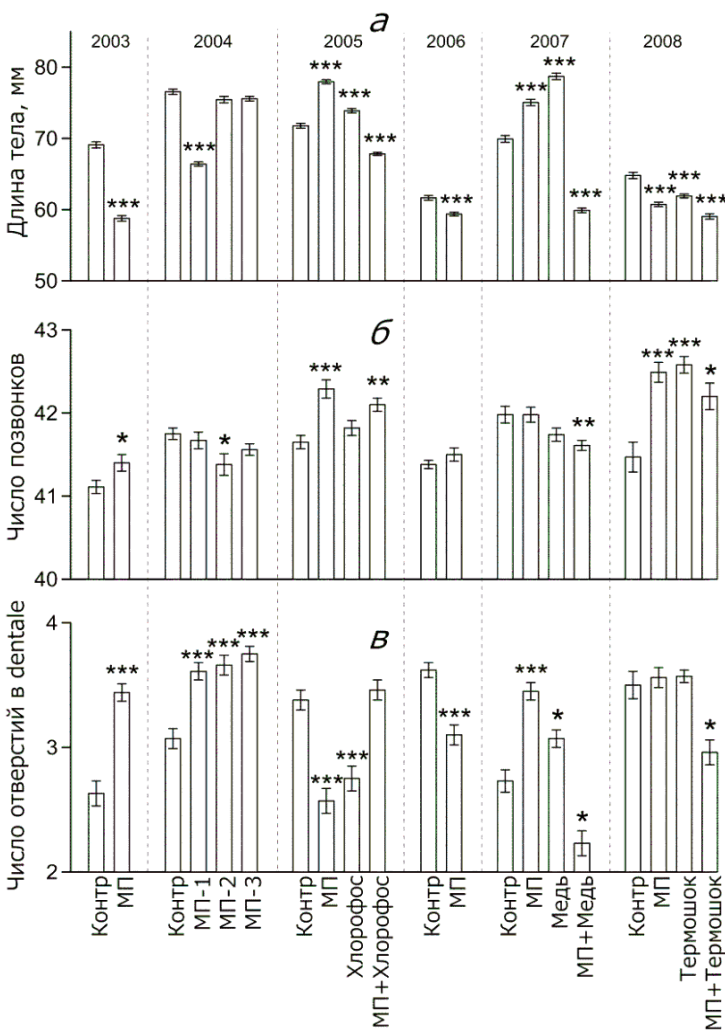
Все исследуемые МП создавались в направлении вертикальной компоненты геомагнитного поля (величина индукции 51.7 мкТл, наклонение 72.05°) при помощи колец Гельмгольца, подключенных к генератору Г6-27.

Во время раннего развития определяли динамику смертности икры и ход вылупления предличинок. После рассасывания желточного мешка и формирования выраженного плавательного пузыря личинок помещали в экспериментальные пруды с естественной кормовой базой на 4 месяца. Затем сеголетков отлавливали, определяли массу и измеряли длину тела от конца рыла до конца чешуйного покрова, длину головы, высоту тела и длину хвостового стебля. Подсчитывали общее число позвонков, число позвонков в грудном, переходном и хвостовом отделах. Подсчитывали число лучей в спинном и анальном плавниках. Определяли формулу глоточных зубов. Подсчитывали значение следующих парных признаков с левой и правой стороны тела: число прободенных чешуй в боковой линии, число лучей в грудных и брюшных плавниках, число отверстий каналов сейсмодатчика системы в парных костях черепа – *dentale, frontale, parietale* и *praeoperculum*.

В случае нормального распределения данных оценку различий между средними значениями проводили при помощи критерия Стьюдента или критерия Даннета. В случае ненормального распределения данных оценку различий между средними значениями проводили при помощи критерия Манна-Уитни или критерия Краскела-Уоллеса. Разницу между исследованными вариантами в динамике смертности икры оценивали с помощью критерия знаков. В качестве показателя стабильности развития использовали дисперсию флуктуирующей асимметрии, рассчитанную для билатеральных признаков и

индекс Шеннона, рассчитанный для позвоночных фенотипов и формулы глоточных зубов.

Разница в выживаемости икры от года к году колебалась в пределах 30-70%. Выживаемость икры в контрольных и



экспериментальных вариантов в 2003 и 2006 годах была почти одинаковой. В остальные годы выживаемость икры в контрольных вариантах была выше, чем в экспериментальных. В 2004 году экспозиция эмбрионов в МП с момента оплодотворения до гастрюляции не приводила к изменениям

Рис. 1. Влияние исследуемых факторов на размеры тела (а), число позвонков (б) и число отверстий в каналах сейсмочувствительной системы в *dentale* (в) у сеголетков плотвы.

в выживаемости. Но если воздействие

продолжалось с гастрюляции до вылупления предличинок, наблюдалось достоверное снижение выживаемости эмбрионов в среднем на 7 % по сравнению с контролем. В 2005 году наблюдалось снижение выживаемости в вариантах МП и МП+хлорофос на 11-12% по сравнению с контролем. Воздействие же хлорофоса снижало выживаемость эмбрионов в среднем на 4% по сравнению с контролем. В 2007 году воздействие МП и меди оказывало почти одинаковое влияние на выживаемость эмбрионов. Снижение доли живых эмбрионов в этих вариантах по сравнению с контролем составило 10-12%. В 2008 году воздействие МП и высокой температуры в среднем на 4% и 7 % соответственно уменьшало число выживших икринок по сравнению с контролем. Следует отметить значительное повышение смертности эмбрионов в вариантах комбинированного воздействия «МП + медь» и «МП + термошок» как по сравнению с контролем, так и по сравнению с теми вариантами, в которых эти факторы действовали на эмбрионы по отдельности. Снижение выживаемости относительно контроля в первом случае составило в среднем 18%, во втором – 32 %.

Данные о динамике вылупления предличинок представлены только 2004 и 2006-2008 годами. В 2006 и 2007 годах массовое вылупление предличинок в контрольных и экспериментальных вариантах происходило синхронно. В 2005 заметно более позднее и сжатое по времени массовое вылупление предличинок в контроле по сравнению с экспериментальными вариантами. В 2008 же году, напротив, предличинки плотвы в контрольном варианте вылуплялись раньше по сравнению с экспериментальными. При этом наиболее существенная задержка в вылуплении наблюдалась после действия на эмбрионы высокой температуры как отдельно, так и в комбинации с МП.

Действие МП и неблагоприятных факторов среды влияло на размеры рыб (Рис. 1а). Следует отметить, что в 2005 и 2007 годах действие МП на эмбрионы приводило в дальнейшем к увеличению, а в остальные годы к снижению длины тела у сеголетков. При действии магнитного поля на различные отрезки эмбриогенеза в 2004 г, только экспозиция с момента оплодотворения до гастрюляции привела к снижению размеров.

Влияние МП на более поздние отрезки эмбриогенеза не сказалось на длине тела сеголетков. Действие хлорофоса (2005) и меди (2007) во время эмбриогенеза приводило в дальнейшем к увеличению размеров сеголетков, а действие повышенной температуры на эмбрионы (2008), напротив, приводило в дальнейшем к снижению этого показателя. Однако, наиболее заслуживающим внимания нам кажется факт значительного снижения размеров сеголетков после комбинированного влияния МП и любых неблагоприятных факторов среды в 2005, 2007 и 2008 гг. Масса тела во всех вариантах соответствовала тем же тенденциям.

При оценке различных счетных морфологических признаков отмечались случайные эффекты, которые встречались только в один год наблюдений. Однако неслучайными являются два эффекта исследованных факторов, которые повторялись несколько лет подряд. Первый – это изменение общего числа позвонков за счет изменения их количества в различных отделах (Рис. 1б). В 2008, 2005 и 2003 годах наблюдалось достоверное увеличение числа позвонков в позвоночнике при действии МП а также при совместном действии МП и хлорофоса (2005) и МП и повышенной температуры (2008) во время эмбриогенеза. Уменьшение количества позвонков наблюдалось в 2004 году, а в 2007 году уменьшение числа позвонков в позвоночнике сеголетков было обнаружено только после совместного воздействия МП и меди на эмбрионы плотвы. Влияние МП на закладку числа позвонков, согласно данным 2004 года, происходит на промежутке от гастрюляции до вылупления предличинки. Второй эффект влияния МП как отдельно, так и в комбинации с неблагоприятными факторами среды проявился в изменении числа отверстий сейсмодатированной системы в нижнечелюстных костях во все годы наблюдений (Рис. 1в). Причем в разные годы наблюдалось как увеличение, так и уменьшение этого показателя по сравнению с контрольными значениями.

Оцененные параметры стабильности развития показали свою неравнозначность. Не было обнаружено влияния действия исследуемых факторов в эмбриогенезе на дисперсию



флуктуирующей асимметрии билатеральных признаков у сеголетков. В то же время разнообразие позвонковых фенотипов, оцененное при помощи индекса Шеннона, как для числа позвонков в позвоночнике, так и для сочетаний позвонков по отделам грудной-переходной-хвостовой, было достоверно выше во всех вариантах, где в качестве экспериментального воздействия использовалось МП с частотой 500 Гц. При оценке влияния МП на различные отрезки эмбриогенеза было обнаружено, что чем раньше во время раннего развития происходила экспозиция плотвы в МП, тем более разнообразными были позвонковые фенотипы.

Различия в выживаемости эмбрионов и сроках вылупления предличинок в разные годы зависели от качества половых продуктов и плотности посева икринок. Размерно-массовые показатели, также, могли отражать не только эффекты действия исследованных факторов во время эмбриогенеза. Учитывая эти допущения, необходимо с осторожностью подходить к анализу выживаемости эмбрионов, вылупления предличинок и размерно-массовых показателей сеголетков. Основным результатом, который нельзя не заметить, сравнивая контрольные и экспериментальные варианты одного года между собой, – это повышение смертности эмбрионов во всех вариантах комбинированного воздействия МП и различных неблагоприятных факторов среды, а также снижение размерно-массовых показателей у сеголетков, развившихся из этих эмбрионов.

В отличие от упомянутых выше параметров, метамеризация позвоночника и закладка основных морфологических признаков будущего скелета у плотвы происходит до вылупления предличинок. Различия в условиях развития молоди рыб в разных прудах уже не могли повлиять на эти показатели. Изменения числа позвонков в позвоночнике и числа отверстий в каналах сейсмодатированной системы в нижнечелюстных костях при действии МП и неблагоприятных факторов среды в наших экспериментах повторялись из года в год и носили разнонаправленный характер. Известно, что закладка числа позвонков у карповых рыб связана с темпами эмбриогенеза. Более медленное развитие приводит формированию много-, а быстрое

малопозвоночных фенотипов. Формирование отверстий в каналах сейсмодатчиковой системы связано с темпами развития костей черепа. По-видимому, МП может оказывать влияние на эти процессы.

Повторяющийся из года в год эффект увеличения разнообразия позвоночных морфотипов у сеголетков плотвы после их инкубации в МП 500 Гц 150 мкТл согласуется распространенной точкой зрения о реакции популяций в ответ на отклонение параметров окружающей среды от оптимума (Carpenter, Brock, 2006). Следует отметить, что ранее наблюдали повышение разнообразия морфологических признаков в ответ на действие МП среди таких животных как *Drosophila melanogaster* (Graham et al., 2000) и *Daphnia magna* (Krylov, Osipova, 2013).

Некоторые биологические эффекты влияния неблагоприятных факторов в наших экспериментах становились более выраженными, если экспозиция проводилась на фоне действия МП. Учитывая увеличение антропогенной электромагнитной нагрузки на естественные экосистемы, подобные сочетания необходимо учитывать при оценке возможного влияния на популяции рыб.

#### ЛИТЕРАТУРА

Binhi, V.N. (2002). *Magnetobiology: Underlying Physical Problems*. San Diego, CA: Academic Press.

Cameron, I.L., Hardman, W.E., Winters, W.D., Zimmerman, S. & Zimmerman, A.M. (1993). Environmental magnetic fields: influences on early embryogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* 51, 417–725.

Carpenter, S.R. & Brock, W.A. (2006). Rising variance: a leading indicator of ecological transition. *Ecology Letters* 9, 311–318.

Graham, J.H., Fletcher, D., Tigue, J. & McDonald, M. (2000). Growth and developmental stability of *Drosophila melanogaster* in low frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 21, 465–472.

IEEE (2002). *Standard for Safety Levels With Respect to Human Exposure to Electromagnetic Fields, 0-3 kHz (IEEE Standard C95.6-2002)*. New York, NY: The Institute of Electrical and Electronics Engineers.

Kantserova, N.P., Ushakova, N.V., Krylov, V.V., Lysenko, L.A. & Nemova, N.N. (2013a). Modulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent protease activity in fish and invertebrates by weak low-frequency magnetic fields. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 39, 373–377.

Kantserova, N.P., Ushakova, N.V., Krylov, V.V., Lysenko, L.A. & Nemova, N.N. (2013b). The effect of weak low-frequency magnetic fields on the intracellular calcium-dependent proteinases of fish. *Biology Bulletin* 40, 515–518.

Kostoff, R.N. & Lau, C.G.Y. (2013). Combined biological and health effects of electromagnetic fields and other agents in the published literature. *Technological Forecasting and Social Change* 80, 1331–1349.

Krylov, V.V. & Osipova, E.A. (2013). The response of *Daphnia magna* Straus to the long-term action of low-frequency magnetic fields. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 96, 213–219.

Krylov, V.V., Izyumov, Yu.G., Izvekov, E.I. & Nepomnyashchikh, V.A. (2014). Magnetic fields and fish behavior. *Biology Bulletin Reviews* 4, 222–231.

Leitgeb, N., Cech, R., Schrottner, J., Lehofer, P., Schmidpeter, U. & Rampetsreiter, M. (2008). Magnetic emissions of electric appliances. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 211, 69–73.

Lerchl, A., Zachmann, A., Ali, M.A. & Reiter, R.J. (1998). The effects of pulsing magnetic fields on pineal melatonin synthesis in a teleost fish (brook trout, *Salvelinus fontinalis*). *Neuroscience Letters* 256, 171–173.

Skauli, K.S., Reitan, J.B. & Walther, B.T. (2000). Hatching in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to a 50 Hz magnetic field. *Bioelectromagnetics* 21, 407–410.

Volpe, P. (2003). Interactions of zero-frequency and oscillating magnetic fields with biostructures and biosystems. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2, 637–648.

### **THE IMPACT OF LOW-FREQUENCY MAGNETIC FIELDS AND THE INFLUENCE OF ADVERSE ENVIRONMENTAL CONDITIONS DURING EMBRYOGENESIS ON FISH POPULATIONS (BY THE EXAMPLE OF ROACH *RUTILUS RUTILUS*)**

Krylov V.V., Izyumov Yu.G., Chebotareva Yu.V.

It is widely known that animals are most sensitive to the influence of different environmental stressors, including magnetic fields, during the embryonic period. This study presents data collected over a six-year period on the effects of extremely low frequency magnetic fields (MFs) (1.4–1.6  $\mu\text{T}$ , 500 Hz and 1.4–1.6  $\mu\text{T}$ , 72.5 Hz) and MFs in combination with other environmental stressors (elevated temperature, 0.01 mg/L water solution of trichlorfon, 0.01 mg/L water solution of copper sulphate penta-hydrate) on roach embryos. The effects of these stressors were studied during different stages of early development. The fish developed in ponds for four months after exposure to MFs. The weight, standard length and morphological characteristics of underyearlings which developed from the exposed embryos were recorded. An increase in embryo mortality and a decrease in size-weight indices in underyearlings were noted after fish had been exposed to a combination of magnetic fields and different adverse environmental factors. In addition, exposure to magnetic fields led to changes in the total number of vertebrae and in the number of seismosensory system openings in the mandibular bones of underyearlings. Magnetic fields of different frequency caused both increases (500 Hz) and decreases (72.5 Hz) in underyearlings' morphological diversity. The stressors used did not increase the fluctuating asymmetry of bilateral morphological characters.

## **ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ АВСТРАЛИЙСКОГО РАКА *CHERAX QUADRICARINATUS*, КУЛЬТИВИРУЕМОГО В АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ**

В.Н. Крючков

*Астраханский государственный технический университет,  
г. Астрахань, Россия, e-mail: kvn394@rambler.ru*

В течение многих столетий ракообразные, в том числе речные раки, пользуются неограниченным спросом как деликатесный продукт. Интерес к аквакультуре ракообразных растёт всё более и более. Это связано, во-первых, с тем, что многие природные популяции европейских раков находятся в депрессивном состоянии как в связи с прессом промысла, так и в результате ухудшения качества среды обитания.

Мировая практика развития тепловодной аквакультуры показывает, что наиболее перспективными являются объекты тропического происхождения, в первую очередь ракообразные, а также другие гидробионты деликатесной категории. Такие объекты до последнего времени практически отсутствовали в прудовых хозяйствах южных регионов России, однако имеются сведения о настойчивых попытках развития этого нового направления аквакультуры. Так, австралийский красноклешнёвый рак обладает рядом ценных качеств, помимо потребительских, которые делают его очень привлекательным для коммерческого выращивания даже в условиях России. Это, прежде всего, высокий темп роста, короткий цикл выращивания до товарного размера, неприхотливость к условиям содержания (Хорошко, Крючков, 2010).

В настоящее время разведением красноклешневых раков занимаются во многих странах мира. Кроме Австралии, красноклешнёвый рак культивируется в Мексике, США, активно работают с этим видом в Китае, Панаме и других странах.

Природные условия юга России не позволяют осуществлять круглогодичное содержание австралийского рака в прудах, в связи с чем значительную часть времени он содержится в условиях УЗВ, которые предъявляют определённые требования к

адаптационным способностям рака. И если для товарного выращивания необходимо достаточное выживание до достижения товарной массы и соответствующий рост, то к производителям предъявляются более жёсткие требования, т.к. от состояния их здоровья во многом зависит качество потомства и, как следствие, коммерческий успех товарного выращивания.

Целью настоящего исследования явилась оценка состояния основных органов австралийского рака *Cherax quadricarinatus* при содержании его в условиях установок замкнутого водообеспечения.

Работы проводились в Астраханском государственном техническом университете (кафедра гидробиологии и общей экологии), объектом исследования служили органы красноклещёвого рака, который культивировался на малом инновационном предприятии ООО «Эко-тропик».

Проводился гистологический анализ общепринятыми методами. После удаления хитинного покрова и ненужной части тела объекты фиксировались раствором Буэна. Продолжительность фиксации – от 24 часов. Подготовка проб производилась по обычной схеме – проводка через спирты возрастающей крепости, заключение в парафиновые блоки, приготовление срезов толщиной 4-5 мкм на санном микротоме, окрашивание гематоксилин-эозином по Гейденгайну и азокармином с докраской по Маллори (Ромейс, 1953).

Гепатопанкреас (печень) десятиногих раков представляет собой уникальный орган, аналогов которому у позвоночных нет. С одной стороны гепатопанкреас является пищеварительной железой, в которой осуществляются основные процессы полостного пищеварения и всасывания низкомолекулярных соединений, при этом значение кишечника у раков для полостного пищеварения гораздо меньше, чем у позвоночных животных. Проходя через кардиальный желудок, пища подвергается механическому перевариванию, далее поступает в его пилорический отдел, где сортируется. Жидкая и полужидкая пища направляются в отстойник и пресс, далее в фильтр, где отстаивается, далее поступает в печень, где расщепляется, частично всасывается и запасается, далее выбрасываясь в

среднюю кишку. Та часть пищи, которая не переваривается, выбрасывается в заднюю кишку, минуя среднюю. Ещё одна важная функция гепатопанкреаса – это отложение в запас веществ, необходимых организму в случае прекращения питания (из-за нехватки пищи, при болезни, а также в процессе линьки, когда сбрасывается не только наружный хитин, но и элементы верхних и нижних челюстей и рак на некоторое время не способен на захват и перемалывание пищи).

И, наконец, печень осуществляет общеорганизменные метаболические функции. Все эти особенности органа, свидетельствующие о его исключительной важности, заставляют обратить особое внимание именно на гепатопанкреас при оценке состояния организма раков.

Гепатопанкреас – это парное образование, каждая из двух его долей состоит из многочисленных трубочек. Печень располагается в головогруди, каудальнее печени расположен желудок, в краниальном направлении – система мышц, дорсально лежат половые железы и кровеносные сосуды, идущие от сердца.

Анализ препаратов показал, что кровоснабжение печени обследованных раков было в пределах нормы, были отмечены крупные сосуды, отходящие от нисходящей аорты, которые в самой печени делятся на более мелкие сосуды. Просветы сосудов были широкие, признаков стаза гемолимфы не обнаружено.

Протоки печени были равномерно расширены. Они обильно снабжены кровеносными сосудами и имеют три оболочки: слизистую, мышечную и серозную. Все три оболочки имели типичное строение без признаков патологии. Кровоснабжение печени (снабжение гемолимфой) осуществляется по двум крупным сосудам (диаметром порядка  $10,0 \pm 2$  мкм), которые идут в гепатопанкреас из предсердия, разветвляются затем на более мелкие сосуды, которые, в свою очередь, делятся на капилляры. Из печени выходят два печеночных протока (диаметр в самой широкой части составляет  $0,3 \pm 0,01$  мкм и  $0,9 \pm 0,2$  мкм), которые открываются в области перехода желудка в среднюю кишку. Их оболочка состоит из слоя кубического эпителия, лежащего на соединительнотканной пластинке, мышечного слоя и адвентициальной оболочки.

Клетки гепатопанкреаса представлены четырьмя видами клеток (Вельш, Шторх, 1976). Проксимальная зона представлена всасывающими клетками, которые накапливают жир и гликоген. Содержимое всасывающих клеток может изменяться, так как в процессе линьки раки не питаются, то в это время активно расходуются резервные питательные вещества. Непосредственно перед линькой, количество жира и гликогена максимально.

Второй тип клеток печеночных трубочек – фибриллярные клетки, которые синтезируют пищеварительные ферменты и накапливают их в надъядерной вакуоле.

Третий тип клеток – пузырьвидные клетки, характеризующиеся крупной вакуолью.

Дистальные концы печеночных трубочек состоят из эмбриональных клеток с округлыми ядрами. У молоди в первые дни свободной жизни эти клетки еще можно наблюдать, однако в дальнейшем, при анализе половозрелых раков, этот четвертый вид клеток нами не был отмечен.

Анализ препаратов показал, что в условиях УЗВ при применении комплексного кормления раков (раздельное питание кормами растительного и животного происхождения, а также комбикормами) вызывает в эпителии печеночных трубочек повышенную вакуолизацию. Это указывает на активный метаболизм в гепатопанкреасе.

Следует отметить, что при групповом содержании у части раков высота эпителия трубочек гепатопанкреаса несколько снижается, что, однако, по всей видимости, также соответствует норме, при этом проявляются индивидуальные особенности особей. Мы не проводили специальных исследований, однако сопоставление данных показало, что уменьшенная высота эпителия трубочек наблюдалась у более мелких особей, однако данный факт требует отдельного исследования.

Кормление раков только одним комбикормом оказывает отрицательное влияние на состояние пищеварительной железы. В некоторых зонах отмечается отсутствие секреции фермента, а стенки трубочек гепатопанкреаса спадшие. Высота выстилающего их эпителия существенно ниже, чем у раков, которых мы отнесли к здоровым.

В этой же серии препаратов можно найти такие участки гепатопанкреаса рака, где выявлялась выраженная граница между участками с деградирующими печеночными трубочками к участкам с признаками гиперсекреции. Это следует считать благоприятным признаком. Полагаем, что это компенсаторная реакция, когда «здоровые» участки гепатопанкреаса берут на себя функцию тех, где отмечается недостаточная функциональная активность. И последнее, о чём необходимо сказать, в печени раков в возрасте до года нами не было обнаружено таких серьёзных нарушений, как дистрофия клеток, некроз или некробиоз.

Необходимость изучения гаметогенеза австралийских раков в условиях искусственного культивирования диктуется рядом практических потребностей. При содержании маточного стада для производства товарной продукции многократно возрастает ценность производителей, т.к. от их здоровья и способности производить полноценное и многочисленное потомство непосредственно зависит эффективность товарного производства и, соответственно, экономический успех.

Определение пола раков по внешнему строению возможно с возраста 20 дней с использованием увеличительной техники. В этом возрасте гонопоры молодых раков выявлялись у самцов под коксальными выростами пятой пары ходильных ног, у самок – у основания третьей пары перепопов.

В данном возрасте семенники и яичники анатомически еще не вполне были развиты.

Развитие половых желез является длительным процессом. От того, насколько правильно будет протекать гаметогенез, в значительной мере зависит фертильность производителей. Кроме того, при работе с маточным стадом нередко возникает потребность оценки производителей.

Практические и научные интересы побудили нас проследить процессы оогенеза у австралийских раков, постадийно, составить шкалу зрелости гонад, пользуясь которой можно было бы по внешним признакам гонад определить степень зрелости половых продуктов, что очень важно в практических целях. Одновременно с этим нами осуществлялся контроль протекания гаметогенеза.



Было много попыток выделить стадии зрелости у десятиногих раков. При этом учёные использовали для исследований различные виды раков и креветок и предлагали выделить разное количество стадий развития – от четырех до восьми. При этом в большей части исследований наряду с исследованием гаметогенеза попутно решались и другие вопросы. Достаточно упомянуть работы, выполненные более 10 лет назад на американском раке *Procambarus clarkia* (Полосьянц, 2002; Пономарёв, 2003).

Результаты собственных исследований всего периода гаметогенеза позволили нам выделить пять стадий развития гонад (Нгуен, Крючков, 2014).

Проведённое исследование показало, что процесс гаметогенеза протекает без выраженных отклонений. Австралийские раки, содержащиеся в контролируемых условиях на предприятии Астраханской области, имели гонады типичного строения, что свидетельствует об удовлетворительном физиологическом состоянии исследованных особей и, следовательно, всего маточного стада, т.к. выбор особей для анализа осуществлялся случайным образом.

#### Список литературы

Вельш У., Шторх Ф. Введение в цитологию и гистологию животных. М.: Мир, 1976. 257 с.

Нгуен Тхи Тует, Крючков В.Н. Особенности развития гонад у австралийских раков *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868) // Вестник Астраханского государственного университета. Естественные науки. 2014. № 2 (47). С. 55 – 61.

Полосьянц Т.Ю. Стимуляция роста и овогенеза у американских раков рода *Procambarus* при культивировании // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Москва. 2002. 20 с.

Пономарев А.К. Гистологический и гистохимический анализ гаметогенеза и состояния гепатопанкреаса у *Procambarus clarkii* при различных вариантах выращивания // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Москва. 2003. 20 с.

Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Иностранная литература. 1953. 720 с.

Хорошко А.И., Крючков В.Н. Новые направления прудовой аквакультуры в южных регионах России // Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса. 2010. № 2. С. 51-55.

## THE ASSESSMENT OF AUSTRALIAN CRAWFISH *CHERAX QUADRICARINATUS* DOMESTICATE IN ASTRAKHAN REGION

Krjuchkov V.N.

In southern regions of Russia non-traditional species are introduced in aquaculture, including the Australian krasnokleshnevy crawfish. Cultivation the crawfish is realized particularly in recirculating aquaculture system which may have stressful effect on crawfish. Hepatopancreas and reproductive system of Australian crawfish were investigated by Histological methods. It is found that the hepatopancreas had a typical structure, some changes have generally been associated with features of feeding. Distortion of gametogenesis is unascertained. In general, the results of analysis testify about satisfactory physiological condition of crawfish.

## ИНДЕКСЫ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНОВ ПРИДОННО-ПЕЛАГИЧЕСКИХ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ ИЗ БУХТ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Н.С. Кузьмина<sup>1</sup>, Е.В. Кулаковская<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт морских биологических исследований  
им. А.О. Ковалевского, Севастополь, Россия

<sup>2</sup>Севастопольский центр туризма, краеведения, спорта и  
экскурсий, г. Севастополь, Россия, [kunast@rambler.ru](mailto:kunast@rambler.ru)

Представители родов *Symphodus* и *Mugil* являются распространенными обитателями Мирового океана, в частности Средиземноморского и Азово-Черноморского бассейнов. Эти придонно-пелагические обитатели выполняют большую экологическую роль в морских биоценозах, так как имеют достаточно специфический пищевой спектр объектов питания, который не характерен для большинства других видов рыб. Помимо этого, кефалевые являются важным объектом промысла, а зеленушки - объект любительского лова (Болтачев, Карпова, 2012; Световидов, 1964). Несмотря на это, работ, посвященных этим объектам в современной литературе мало.

В ихтиологических исследованиях первичными и легко выполнимыми действиями являются взвешивания паренхиматозных органов, в частности иммунокомпетентных (печени, селезенки), с последующим расчетом их индексов. Величины этих морфофизиологических индексов черноморских рыб оказались весьма информативны при оценке состояния

особей, особенно придонно-донных групп (Кузьминова, 2005, 2006, 2008, 2012; Kuzminova et al., 2011).

В связи с вышесказанным, представляется значимым продолжить анализ величин индексов печени (ИП) и селезенки (ИС) кефали-сингиля и зеленушки, как типичных представителей прибрежной черноморской ихтиофауны с целью оценить их состояние в бухтах, отличающихся уровнем загрязнения.

Материалы и методы. Объектами исследования служили зеленушка *Symphodus tinca* (Linnaeus, 1758) и кефаль-сингиль *Liza aurata* (Risso, 1810). Оценку состояния рыб проводили на особях, отловленных в бухтах г. Севастополя (б. Карантинная, б. Александровская, пос. Любимовка, б. Балаклавская) с помощью донных ставников в 2010-2014 годах.

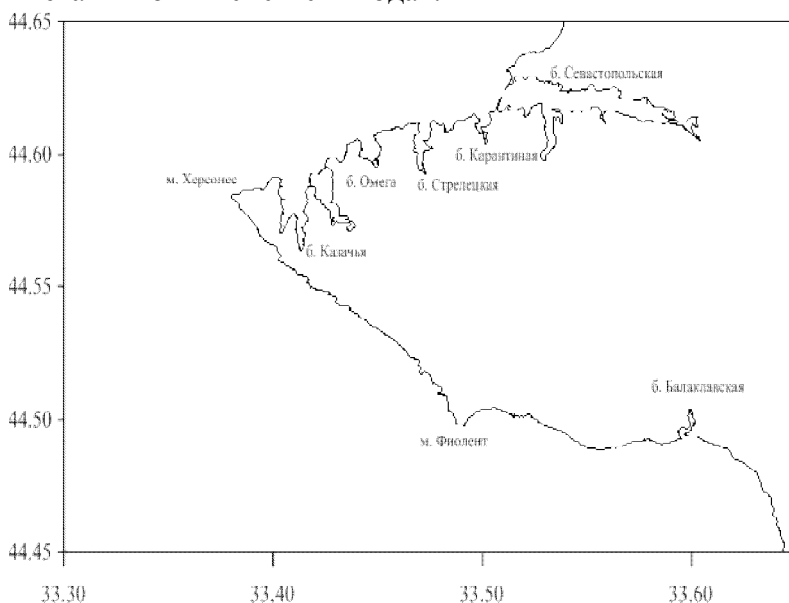


Рис. 1. Районы отлова рыб в прибрежной акватории города Севастополя

Биологический анализ рыб, включающий промеры общей и стандартной длин, определение массы рыбы, тушки и органов, определение пола, стадии зрелости, возраста рыб и, в последующем, расчет индексов печени и селезенки проводили по методам, описанным ранее (Правдин, 1966; Шварц и др., 1968). Возраст рыб определяли по чешуе и, иногда, отолитам. Результаты морфофизиологического анализа обрабатывали

статистически по Г.Ф. Лакину (1973), используя  $t$  - критерий Стьюдента. Все расчеты изучаемых параметров проводили с помощью стандартной программы «EXCEL». Результаты и обсуждение. При отборе массива данных для расчета ИП, ИС руководствовались тем, что рыбы должны быть одного возраста, пола и находиться на одной стадии зрелости. В связи с этим, сначала рассчитали ИП разновозрастных зеленушек с учетом пола (рис. 2).

Установлено, что как у самок, так и самцов *Symphodus tinca* индекс печени незначительно возрастает до 4–6 лет, после чего постепенно снижается к концу жизни (рис. 2).

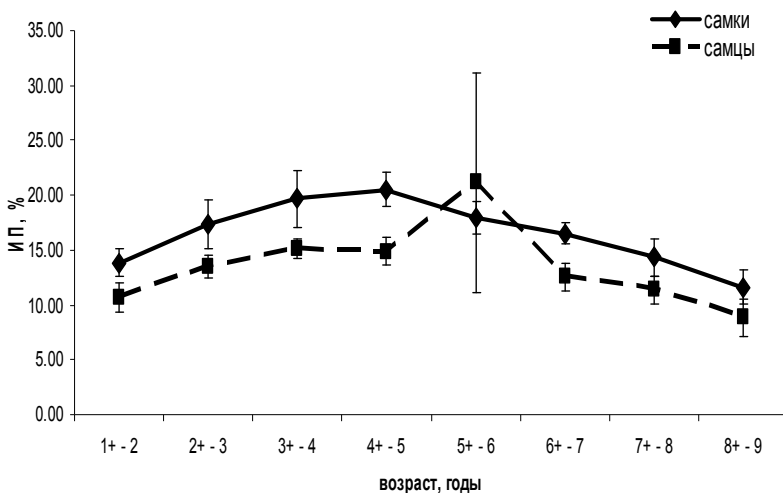


Рис. 2. Индекс печени самок и самцов зеленушки разного возраста

Интересно отметить, что у зеленушки ИП (и по нашим расчетам упитанность) снижается в старости, в то время как для других видов наблюдается противоположная закономерность. Так, например, у черноморской ставриды и спикары этот параметр повышается до конца жизни (Kuzminova, 2014; Kuzminova et al., 2014). Данные результаты свидетельствуют о том, что у *Symphodus tinca* с возрастом ухудшается именно состояние печени, что даже визуально отмечается регулярно при биологическом анализе рыб (см. рис. 3).



Рис. 3. Внешний вид печени взрослых экземпляров зеленушки в современный период

Влияние условий обитания в двух бухтах г. Севастополя, отличающихся уровнем загрязнения (Kuzminova et al., 2014) на индекс печени и селезенки зеленушки отражено в таблице 1. ИП как у самок, так и самцов зеленушки из б. Александровская был ниже, чем для рыб из б. Карантинная. Для особей большинства возрастных групп такая же картина прослеживается и по параметру ИС. Полученные данные, свидетельствуют о дистрофии органов, связанной с хроническим загрязнением большой Севастопольской бухты (Kuzminova et al., 2014), в которую входит б. Александровская.

Таблица 1. Индекс печени (числитель, ‰) и индекс селезенки (знаменатель, ‰) зеленушки из бухт г. Севастополя, отличающихся уровнем загрязнения (M±m)

Возраст, годы	б. Карантинная		б. Александровская	
	самки	самцы	самки	самцы
2+ - 3	<u>21,32±7,89</u> 0,07±0,02	<u>14,59±1,39</u> 0,046	<u>15,84±1,37</u> 0,026	<u>12,67±1,61</u> 0,058±0,021
3+ - 4	<u>22,22±2,99</u> 0,077±0,016	<u>15,80±0,95</u> 0,075±0,016	<u>12,95±2,5</u> 0,051	<u>13,37±2,24</u> 0,014
4+ - 5	<u>23,39±2,65</u> 0,031	<u>17,51±1,50</u> 0,086±0,012	<u>18,63±1,84</u> 0,046±0,009	<u>13,65±1,67</u> 0,094
5+ - 6	<u>23,86±2,41</u> <b>0,087±0,011</b>	<u>64,91±35,12</u> <b>0,099±0,033</b>	<u>15,85±1,58</u> <b>0,071±0,013</b>	<u>11,18±0,64</u> <b>0,079±0,014</b>
6+ - 7	<u>17,83±1,59</u> 0,084±0,016	<u>16,39±3,46</u> <b>0,075±0,011</b>	<u>15,08±1,04</u> 0,106	<u>10,72±0,97</u> <b>0,063±0,022</b>
7+ ÷ 9	<u>13,60±1,55</u> <b>0,085±0,04</b>	15,57±5,99	<u>13,37±3,44</u> <b>0,038±0,009</b>	13,27±2,61

Примечание: жирным шрифтом выделены достоверные отличия индексов рыб одного возраста и пола из разных бухт

Кефаль-сингиль – высокоподвижный вид и, очевидно, что отличий как в популяционных, так и в морфофизиологических показателях у особей из близких акваторий нет. Кроме того, сингиль в прибрежной зоне г. Севастополя представлен в основном ювенильными особями в возрасте от 0+ до 5 лет, с

преобладанием группы 2 - 4 года. Поэтому мы рассчитали ИП и ИС сначала для объединенного массива данных, а затем для экземпляров из бухт, значительно удаленных друг от друга, отобрав для анализа только ювенильных особей от 1+ до 3+ лет (близкого размера) (табл. 2). Согласно таблице 2 установили, что ИП и ИС у *Liza aurata* были практически одинаковы у особей из двух акваторий. Такая ситуация может свидетельствовать либо о сходных условиях обитания, связанных со снижением уровня загрязнения б. Карантинной, либо о высоких адаптивных способностях данного вида.

Таблица 2. Индекс печени и индекс селезенки кефали-сингиль в некоторых бухтах г. Севастополя (M±m)

Характеристика рыб	Показатели	б. Карантинная + б. Александровская + пос. Любимовка	б. Балаклавская
0+ - 5 лет, juven. + F + M	ИП, ‰	15,11±0,6	15,29±1,14
	ИС, ‰	0,44±0,03	0,4±0,03
1+ - 3 года, juven.	ИП, ‰	15,58±1,53	15,63±1,59
	ИС, ‰	0,43±0,04	0,43±0,04

Морфологические индексы используются в ихтиологии, в том числе для оценки состояния черноморских рыб как у особей, обитающих в разных акваториях, так и у определенного вида рыб за какой-либо промежуток времени для анализа изменения экологического состояния водоема и, в частности, кормовой базы (Овен и др., 2009; Kuzminova et al., 2011). Иногда такие биоиндикаторы здоровья рыб более информативны и чувствительны по отношению к суммарному загрязнению акваторий, чем химические параметры воды, грунтов и тканей. Так, на примере камбалы *Platichthys flesus* в Балтийском море было показано, что ИП снижается у особей в загрязненных участках, в то время как комплекс химических показателей в мышцах и печени рыб различался неоднозначно по районам (Napieriska, Podolska et al., 2008).

Известно, что ИП зависит от пола и возраста (размера), что в частности, было показано для некоторых видов черноморских рыб (ставрида, спикара, скорпена) (Кузьминова, 2005, 2006; Kuzminova et al., 2011). У спикары, отловленной в бухтах с разным уровнем загрязнения, ИП был близок как у самок, так и у самцов из нескольких районов, однако ИС был ниже у

экземпляров из более загрязненной бухты (Кузьминова и др., 2010). Руководствуясь данными о состоянии черноморского налима и мерланга, обитающих в бухтах с разными уровнями антропогенной нагрузки, ИС, также как и по нашим результатам для кефали, был достоверно неотличим (Кузьминова, Скуратовская, 2011). В то же время известно, что у бычка-мартовика ИП и ИС у особей из более загрязненной акватории были ниже (Дорохова и др., 2008).

По данным этой работы оказалось, что у зеленушки *Simphodus tinca* печень очень подвержена хроническому влиянию загрязнения, но по литературным сведениям о влиянии тяжелых металлов в воде и грунтах, поступающих от находящегося вблизи водоема заброшенного медного рудника на *Symphodus melops*, отличия на органном уровне были минимальны, хотя «отклик» со стороны антиоксидантной системы авторы наблюдали (Carney Almroth et al., 2008). Такой же слабый эффект поллютантов на индекс печени *Clarias gariepinus* отмечен и при экспериментальном воздействии ацетата железа (Alkahernal-Balawi et al., 2011).

Следовательно, полученные нами ранее данные для других черноморских рыб, а также результаты этой работы, говорят о том, что индексы печени и селезенки отражают негативное действие условий обитания прежде всего на представителей донно-придонной группы. Разные ответные реакции зеленушки и кефали-сингиля, являющихся типичными придонно-пелагическими видами, тяготеющими к пелагиали, связаны с разной степенью подвижности и/или миграционной способностью: у оседлых видов (как зеленушка) масса данных иммунокомпетентных органов снижается в условиях хронического загрязнения акватории.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и города Севастополя РФ в рамках научного проекта №14-44-01014 «р\_юг\_а».

Список литературы

Болтачев А.Р., Карпова Е.П. Морские рыбы Крымского полуострова. Симферополь: Бизнес-Информ, 2012. 224 с.

Дорохова И.И., Кузьминова Н.С., Граб Ю.А. Использование биохимических маркеров бычка-мартовика (*Mesogobius batrachocephalus* (Pallas)) для оценки комплексного загрязнения акваторий // Современные

- проблемы гидробиологии. Перспективы, пути и методы решений – 2: Материалы междунар. науч. конф. 26 – 29 авг. 2008 г. Херсон, 2008. С. 139-144.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. школа, 1973. 343 с.
- Кузьминова Н.С. Зависимость индекса печени спикары от физиологического состояния рыб, а также условий обитания // Системы контроля окружающей среды. Средства и мониторинг: сб. науч. трудов / НАН Украины, Морской гидрофизический институт. Севастополь, 2005. С. 302–304.
- Кузьминова Н.С. Индекс печени черноморской ставриды как индикатор ее физиологического состояния // Рибне господарство України. 2006. № 2 (43). С. 36–38.
- Кузьминова Н.С. Видовые, сезонные, половые отличия индекса селезенки некоторых видов черноморских рыб и его подверженность антропогенному фактору // Вестник зоологии. 2008. Т. 42. № 2. С. 135–142.
- Кузьминова Н.С., Лебедь Д.А., Завьялов А.В. Популяционные морфофизиологические и биохимические показатели спикары *Spicara flexuosa* (Rafinesque) в современный период // Человек и животные: Мат. V Междунар. науч.-практ. конф. (14-16 мая 2010 г., г. Астрахань). 2010. С. 71–77.
- Кузьминова Н.С., Скуратовская Е.Н. Состояние трехусого морского налима *Gaidropsarus mediterraneus* (L.) (Gadiidae), обитающего в севавтопольских бухтах с разным уровнем загрязнения // Рибне господарство України. 2011. № 1 (72). С. 3-9.
- Кузьминова Н.С. Индекс селезенки массовых видов черноморских рыб из бухт с разным уровнем загрязнения // Материалы Всерос. конф. молодых ученых и специалистов с междунар. участием, посвящ. 90-летию со дня постройки первого научн.-исслед. судна ПИНРО «Персей» (25-26 окт. 2012 г., Мурманск). Мурманск, 2012. С. 155-160.
- Овен Л.С., Салехова Л.П., Кузьминова Н.С. Современное состояние популяции черноморской султанки *Mullus barbatus ponticus*, обитающей в прибрежной зоне у Севастополя // Вопросы ихтиологии. 2009. Том 49. № 2. С. 214–224.
- Световидов А.Н. Рыбы Черного моря. М.: Наука, 1964. 550 с.
- Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб / И.Ф. Правдин. М.: Пищ. пром., 1966. 376 с.
- Шварц С.С. Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных / С.С. Шварц, В.С. Смирнов, Л.Н. Добринский // Тр. Ин-та экологии растений и животных. 1968. Вып. 58. 386 с.
- Alkahernal-Balawi H.F., Ahmad Z., Al-Akei A.S., Al-Misned F., E.-A.M. Suliman, Al-Ghanim K.A. Toxicity bioassay of lead acetate and effects of its sublethal exposure on growth, haematological parameters and reproduction in *Clarias gariepinus* // African J. of Biotechnology. 2011. V. 10 (53). P. 11039–11047.
- Carney Almroth B., Sturve J., Stephensen E., Holth T.F., Förlin L. Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site // Marine Environ. Research. 2008. 271. 66. P. 271–277. DOI: 10.1016/j.marenvres.2008.04.002.



Kuzminova N.S. The comprehensive characteristic of population parameters of high body pickarel *Spicara flexuosa* from different bays in coastal area of Sevastopol (Black Sea) // HydroMedit 2014: Internat. congress of applied Ichthyology Aquatic Environment (November 13th – 15th), Volos, Greece. 2014. P. 132–137.

Kuzminova N., Rudneva I., Salekhova L., Shevchenko N., Oven L. State of black scorpion fish (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758) inhabited coastal area of Sevastopol region (Black Sea) in 1998–2008 // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2011. 11. P. 101-111.

Kuzminova N., Dorokhova I., Rudneva I. Age- dependent changes of Mediterranean *Trachurus mediterraneus* male and female from coastal waters of Sevastopol (Black Sea, Ukraine) // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2014. 14. P. 183-192.

Napierska D., Podolska M. Relationship between biomarker responses and contaminant concentration in selected tissues of flounder (*Platichthys flesus*) from the polish coastal area of the Baltic Sea // OCEANOLOGIA. 2008. 50 (3). P. 421-442.

#### **INDICES OF IMMUNOCOMPETENT ORGANS OF DEMERSAL- PELAGIC BLACK SEA FISH FROM BAYS WITH DIFFERENT LEVEL OF POLLUTION**

Kuzminova N.S., Kulakovskaya E.V.

The hepatosomatic index of wrasse is low for fish from more polluted bay. There is no difference of morphological parameters of golden mullet *Liza aurata* from some bays, that is associated with high adaptive ability of this specie and its migration. Interestingly, that the state of liver of *Symphodus tinca* is getting worse and index of the liver is reducing with age increasing.

#### **СОДЕРЖАНИЕ КАТИОНОВ В ПОЗВОНКАХ И МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В ПЕЧЕНИ ПЛОТВЫ *RUTILUS RUTILUS* L. В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ЗРЕЛОСТИ ГОНАД**

А.С. Маврин, В.И. Мартемьянов, Н.И. Силкина, Д.В. Микряков  
*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина  
Российской академии наук, пос. Борок, Россия, e-mail:  
[mavr\\_as@mail.ru](mailto:mavr_as@mail.ru)*

В процессе развития и роста рыб происходит становление репродуктивной и защитной систем организма. Развитие репродуктивной системы связано со скоростью роста организма

инакоплением органических и минеральных ресурсов. Установлено, что рост рыб тесным образом связан со способностью организма накапливать жизненно важные катионы, извлекая их из воды (Виноградов, 2000). Показано, что концентрация катионов в организме положительно коррелирует с размерно-массовыми показателями молоди рыб (Маврин, Мартемьянов, 2013а). Увеличение поступления ионов в организм ускоряет развитие и рост рыб (Маврин и др., 1992). Установлена связь между степенью зрелости гонад и накоплением катионов в костной ткани впервые созревающих рыб (Маврин, Мартемьянов, 2013b).

Важным органом, участвующим в метаболизме веществ, в том числе связанных с процессом созревания гонад и обезвреживанием различных чужеродных веществ, является печень. Для оценки биологических эффектов, возникающих в результате воздействия природных и антропогенных факторов на половозрелых рыб, используются методы определения продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в их тканях. По содержанию конечных продуктов ПОЛ можно оценить физиологическое состояние организма (Силкина и др., 2013). Одним из таких продуктов ПОЛ является малоновый диальдегид (МДА). Связь между накоплением минеральных ресурсов в костной ткани и содержанием продуктов ПОЛ в печени в различные периоды становления репродуктивной системы не изучалась.

Цель работы – определить содержание натрия, калия, кальция, магния в позвонках и малонового диальдегида (МДА) в печени плотвы с разной степенью зрелости гонад.

Материалом для исследования послужили 30 особей плотвы, отловленной 14 апреля 2011 г в зоне подпора реки Ильдь Рыбинского водохранилища. Выборку плотвы разделили по степени зрелости гонад на 5 групп (Мейен, 1939; Кулаев, 1939). Первая группа (10 экз) – рыбы с гонадами I стадии зрелости (ст. зр.) без анатомической дифференцировки по полу (juv). Вторая группа (5 экз) – самцы с гонадами II ст. зр. (♂juv). Третья группа (5 экз) – самки с гонадами II ст. зр. (♀juv). Четвертая группа (5 экз) – самцы с семенниками IV ст. зр. (♂IV). Пятая группа (5 экз)

– самки с яичниками IV ст. зр. (♀IV). У рыб определяли длину тела от начала головы до конца чешуйного покрова (точность 1 мм) и массу с помощью весов ВЛКТ-500 (точность 0.01 г). Из туловищного отдела позвоночника препарировали 2-4 позвонка средней массой 60-100 мг. Озоление позвонков, определение содержания ионов в пробах проводили по ранее описанной методике (Мартемьянов, 1992). Определение катионов в телах позвонков проводили методом плазменной спектрофотометрии. Концентрацию катионов в позвонках выражали в ммоль/кг сырой массы ткани. У рыб брали печень для определения содержания малонового диальдегида (Андреева и др., 1988) и выражали в нмоль/г сырой массы ткани. Статистическая и графическая обработка данных проведена с помощью прикладных программ Microsoft Office Excel 2003, Statistica 6.0. Связь между содержанием катионов в позвонках и МДА в печени определяли с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $R_s$ ). Результаты представлены в виде средних и их ошибок. Достоверность различий оценивали для уровня вероятности  $P=0.05$  по U-критерию Манна-Уитни.

Длина и масса самок впервые проходящих ст. зр. гонад II и IV была достоверно выше на 84%, 80% и 644%, 614%, соответственно, по сравнению с рыбами I ст. зр. (табл.).

Таблица. Содержание катионов в позвонках плотвы в зависимости от стадий зрелости гонад.

Длина, мм	Масса, г	Пол, стадия зрелости	n	Содержание катионов, ммоль/кг сырой массы			
				Натрий	Калий	Кальций	Магний
58.5±1.1	2.9±0.2	I	10	36.8±1.4	14.0±0.8	1530±44	97.1±2.2
81.8±1.7	8.2±0.5	♂II	5	45.1±3.0	18.7±0.7	1628±23	94.0±1.6
88.8±1.8	11.7±0.8	♂IV	5	52.9±3.1	19.6±0.6	1520±78	76.6±3.6
108.2±2.8	21.5±1.6	♀II	5	39.3±1.6	20.8±0.6	1252±17	61.6±0.6
105.4±1.8	20.6±1.1	♀IV	5	43.5±1.8	24.9±1.0	1316±15	65.5±0.5

Размерно-массовые показатели ювенильных (II) и созревших (IV) самок достоверно не различались. По отношению к рыбам с гонадами I ст. зр., длина и масса ♂II, ♂IV была достоверно выше на 40%, 52%, и 186%, 307%, соответственно (табл.). Длина и масса ювенильных самцов II ст. зр. была достоверно ниже на 8.6% и 42.7%, чем у созревших IV ст. зрелости. Самцы II ст. зр. по длине и массе были меньше самок II ст. зр. на 32.3% и 162.2%,

соответственно. Самцы IV ст. зр. по длине и массе были меньше самок той же ст. зр. на 18.7% и 76.1%, соответственно.

Концентрация Na в позвонках самок IV ст. зр. была выше на 6.8% и 18.2% по сравнению с ♀II и рыбами I ст. зр. (табл.). В позвонках самцов IV ст. зр. содержание Na было больше на 22.6% и 43.8%, чем у ♂II и рыб I ст. зрелости. Уровень натрия в позвонках самцов IV и II ст. зр. был выше на 21.6% и 14.8%, в сравнении с самками тех же стадий зрелости. Эти результаты показывают, что достижение IV ст. зр. наблюдается у тех самцов и самок, которые обладают более высокой способностью накапливать натрий в позвонках. Самцы обладают большей способностью накапливать натрий в позвонках по сравнению с самками.

Концентрация K в позвонках самок IV ст. зр. была выше на 77.9% по сравнению с ♀II и на 48.6%, чем у рыб I ст. зр. (табл.). Содержание калия в позвонках самцов II и IV ст. зр. не различалось между собой, но было выше в среднем на 36.8% по отношению к рыбам I ст. зр. Уровень калия в позвонках самцов IV ст. зр. был ниже на 21.3%, чем у самок той же стадии зрелости. Достижение IV ст. зр. гонад наблюдается у тех самок, которые обладают более высокой способностью накапливать калий в позвонках. Первое созревание семенников в период их анатомической дифференцировки сопровождается накоплением калия в позвонках. Самцы обладают меньшей способностью накапливать калий в позвонках по сравнению с самками.

Содержание Ca в позвонках рыб I ст. зр. выше на 14% и 18.2%, чем у самок IV и II ст. зрелости. Переход рыб от I до II ст. зр. яичников сопровождается снижением способности накапливать кальций в позвонках. Уровень Ca в позвонках самок IV ст. зр. достоверно выше на 5.1% по отношению к рыбам II ст. зрелости. Созревание гонад (IV ст. зр.) происходит у тех рыб, которые имеют большую способность накапливать кальций в позвонках. Концентрация кальция в позвонках самцов IV ст. зр. и рыб I ст. зр. не различалась между собой, но была ниже на 6.6%, по сравнению с самцами II ст. зрелости.

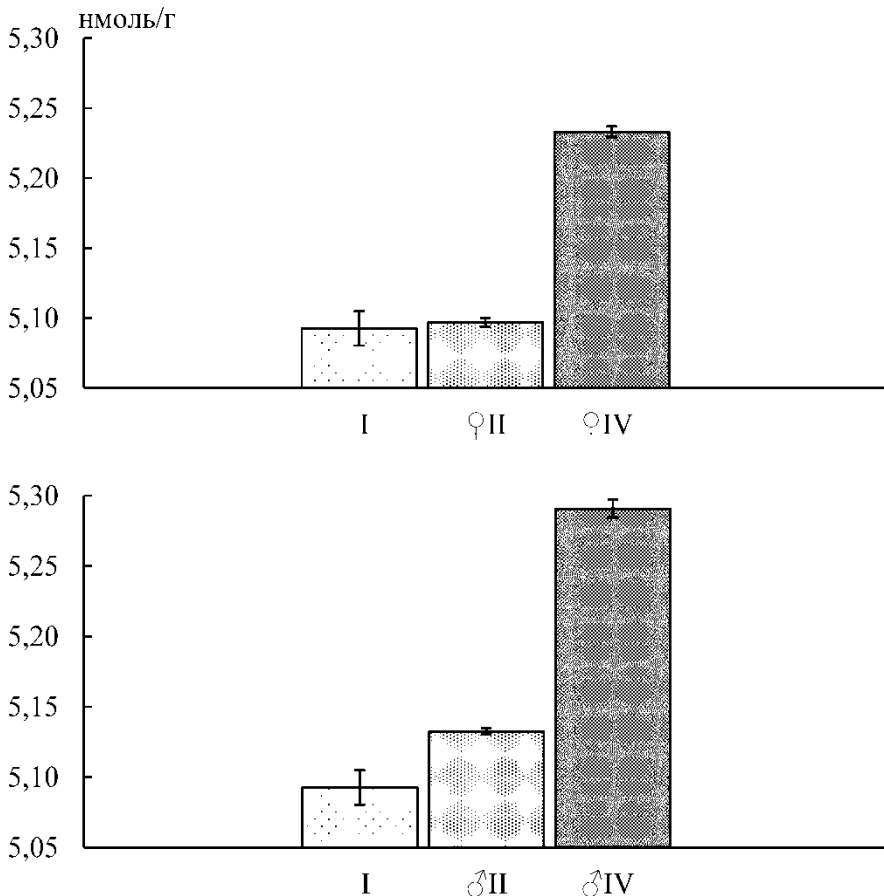


Рис. Содержание МДА в печени плотвы в зависимости от стадий зрелости гонад.

Переход рыб от I до II ст. зр. семенников сопровождается повышением, а достижение IV ст. зр. понижением способности накапливать кальций в позвонках. Уровень Ca в позвонках самцов II и IV ст. зр. был выше на 30% и на 15.5%, чем у самок таких же стадий зрелости, соответственно. Самцы обладают большей способностью накапливать кальций в позвонках по сравнению с самками.

По отношению к рыбам I ст. зр. содержание Mg в позвонках ♀II и ♀IV было ниже на 36.6% и на 32.5%, указывая на снижение способности накапливать этот ион в костной ткани при созревании гонад. Концентрация Mg в позвонках рыб I ст. зр. и

самцов II ст. зр. не различалась между собой, но была выше на 21.1% по отношению к самцам IV ст. зрелости, указывая на снижение способности накапливать этот ион в костной ткани при созревании гонад. Уровень Mg в позвонках самцов II и IV ст. зр. был выше на 52.6% и на 16.9%, чем у самок таких же стадий зрелости. Самцы обладают большей способностью накапливать магний в позвонках по сравнению с самками.

Содержание МДА в печени рыб I ст. зр. и самок на II ст. зр. не различалось между собой и было ниже на 2.7%, чем у зрелых самок (рис.). Концентрация МДА в печени рыб I ст. зр. была ниже, чем у самцов II и IV ст. зр. на 1.7% и 1.5%.

Наибольшее содержание МДА в печени установлено у зрелых самок и самцов, что свидетельствует об усилении процессов перекисного окисления липидов при созревании. Между концентрацией Na в позвонках и содержанием МДА в печени всех изученных групп установлена положительная коррелятивная связь ( $R_s = 0.77$ ).

#### Список литературы

Андреева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. 1988. № 11. С. 41–43.

Виноградов Г.А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. М.: Наука, 2000. 216 с.

Кулаев С.И. Годовой цикл и шкала зрелости семенников половозрелой плотвы (*Rutilus rutilus* L.) // Записки Большевской биологической станции. 1939. Вып. 11. С. 3–38.

Маврин А.С., Виноградов Г.А., Лапирова Т.Б., Ершов И.Ю. и Микрякова Т.Ф. Влияние кальция, магния и тяжелых металлов на молодь леща *Abramis brama* L. Результаты исследований // Биология внутренних вод: информационный бюллетень Санкт-Петербурга: Наука. 1992. № 91. С. 45–50.

Маврин А.С., Мартемьянов В.И. Связь размерно-массовых показателей сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* (L.) с содержанием катионов в теле рыб. // Труды Зоологического института РАН Приложение № 3. 2013а. С. 155–160.

Маврин А.С., Мартемьянов В.И. Содержание катионов в позвонках зрелых и незрелых самок плотвы *Rutilus rutilus* (L.) перед нерестом. // Труды Зоологического института РАН Приложение № 3. 2013б. С. 151–154.

Мартемьянов В.И. Содержание катионов в плазме, эритроцитах и мышечной ткани рыб Волжского плеса Рыбинского водохранилища. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1992. №28(5). С. 576–581.

Мейен В.А. К вопросу о годовом цикле изменений яичников костистых рыб // Изв. АН СССР. Отдел. биол. наук. 1939. №3. С. 389–420.

Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние антропогенного загрязнения на окислительные процессы в печени рыб Рыбинского водохранилища // Экология. 2013. № 5. С. 361–365.

**THE CONTENT OF CATIONS IN VERTEBRAE AND MALONIC DIALDEHYDE IN THE LIVER OF ROACH *RUTILUS RUTILUS* L. DEPENDING ON GONADAL MATURITY**

Mavrin A.S., Martemyanov V.I., Silkina N.I., Mikryakov D.V.

Sodium, potassium, calcium, and magnesium concentrations in vertebrae as well as content of malonicdialdehyde in liver of spring roach in different gonad maturity stages are determined.

Differences in the parameters under study are shown and their comparative analysis is carried out for male and female roach at different stages of gonadal maturity.

**МЕЖВИДОВЫЕ И ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СУСПЕНЗИЙ ТКАНЕЙ АМФИПОД ИЗ РАЗНОТИПНЫХ ВОДОТОКОВ**

Г.В. Макарская<sup>1,2</sup>, А.В. Андрианова<sup>1,3</sup>, С.В. Тарских<sup>2</sup>  
*Институт вычислительного моделирования СО РАН,*  
*Красноярск, Россия, e-mail: [mgv@icm.krasn.ru](mailto:mgv@icm.krasn.ru),  
[andav@icm.krasn.ru](mailto:andav@icm.krasn.ru)*

<sup>2</sup>*Международный научный центр исследований экстремальных состояний организма при Президиуме Красноярского научного центра СО РАН, Красноярск, Россия, [tsv@akadem.ru](mailto:tsv@akadem.ru)*

<sup>3</sup>*Научно-исследовательский институт экологии рыбохозяйственных водоемов, Красноярск, Россия*

Адаптации к условиям окружающей среды, как универсальное биологическое явление, формируются и проявляются на самых различных уровнях биологической организации – от молекулярного до биоценотического (Немова, Высоцкая, 2004). Ведущую роль в этом ряду играют механизмы биохимических адаптаций, связанных с изменением количества уже имеющихся макромолекул в клетках или с образованием их новых типов, реализуется на уровне изменений ферментативных систем, тонкой регуляции каталитической способности ферментов. Особое значение в поддержании гомеостаза живых организмов, в том числе и гидробионтов, и проявлении у них

адаптационных потенциалов играют механизмы регуляции кислородного метаболизма, включающие в себя систему кооперативно действующих про- и антиоксидантных ферментов, витаминов, каротиноидов, металлов с переменной валентностью, и устанавливающие строго определенный баланс между интенсивностью свободнорадикальных процессов, включая перекисное окисление липидов (ПОЛ), и антиоксидантной активностью (АОА). Антиоксидантный статус организма зависит как минимум от четырех факторов: строго определенной структурной организации липидов, активности антиоксидантных ферментов и ферментов, регулирующих обмен фосфолипидов клеточных мембран, а также от содержания низкомолекулярных антиоксидантов (Руднева, Шайда, 2012). Сбои или отсутствие антиоксидантного статуса приводят к развитию окислительного стресса, возникновению и накоплению окислительных повреждений и в конечном итоге – возникновению патологических изменений (Меньщикова, Зенков, 1983). Изменение количественного содержания и активности антиоксидантных ферментов, накопление продуктов перекисного окисления липидов в стрессовых условиях у разнообразных морских и пресноводных гидробионтов активно исследуются и используются в мониторинге состояния не только самих гидробионтов, но и водных экосистем (Гордеева, Лабас, 2003; Тимофеев, 2010; Руднева, Шайда, 2012; Livingstone, 2003; 2009; Lushchak, 2011; Gorokhova et. al., 2013).

Среди множества методов определения антиоксидантной активности веществ наиболее чувствительным считается метод, основанный на хемилюминесценции (Владимиров, Проскурина, 2009), позволяющий получить интегральную характеристику активности всего комплекса факторов системы контроля радикалообразования исследуемого объекта.

Цель работы – сравнительная оценка кинетики свободно-радикальных процессов в тканях амфипод, обитающих в экологически отличающихся водоемах, методом люминолзависимой хемилюминесценции при инициации оксидативного стресса *in vitro* перекисью водорода.



Амфиподы отлавливали в среднем течении р. Енисей (выше и ниже г. Красноярска), р. Ус (природный парк Ергаки), в прибрежной зоне Хакасских озер Иткуль (охраняемая зона Хакасского заповедника, пресное), Власьево (умеренно соленое), Шунет, Белё и Ши́ра (слабо соленые, активно используемые зоны отдыха) в весенне-летний период 2014 г. На верхнем участке р. Енисей отсутствуют крупные промышленные и хозяйственные объекты, поэтому он выбран в качестве фонового к нижнему, который испытывает на себе воздействие промышленных и хозяйственно-бытовых стоков города и характеризуется повышенным содержанием в воде тяжёлых металлов (Fe, Cu, Mn, Ni, Cr), нитратов, нитритов и фосфора по сравнению с фоновым участком, кроме того здесь отмечено превышение установленных российских нормативов для Cu, фенолов и нефтепродуктов (Гладышев и др., 2012).

Сбор донных беспозвоночных осуществляли гидробиологическим скребком или пробоотборником, доставляли в лабораторию в речной или озерной воде и сразу же подвергали анализу живых особей. Амфиподы озер Белё, Власьево, Ши́ра и Шунет представлены единственным видом *Gammarus lacustris*, о. Иткуль - еще и байкальским эндемиком *Gmelinoides fasciatus*. р. Енисей - *Eulimnogammarus viridis* Dybowsky и *Gmelinoides fasciatus* Stebb, р. Ус - палеарктический вид *Gammarus pulex* – group. Образцы для определения антиоксидантной активности готовили путем гомогенизирования отловленных особей гидробионтов с добавлением раствора Хенкса (pH=7,4), центрифугирования при 3000 об./мин. в течение 10 минут и отбора супернатанта; затем выравнивали разведением раствором Хенкса до 3,3 мг/мл по сырой биомассе.

Хемилюминесцентный анализ генерации свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК) в гомогенатах недифференцированных тканей гидробионтов при инициации оксидативного стресса перекисью водорода проводили на аппаратурно-программном комплексе 36-канального, термостатируемого “Хемилюминометра CL-3604” – ПЭВМ (СКТБ «Наука» СО РАН, г. Красноярск (Макарская и др., 2006; Измайлов и др., 2011). В состав опытных образцов входили: 200 мкл

супернатанта биологической ткани, 200 мкл  $2,2 \times 10^{-4}$  М люминола в растворе Хенкса (рН 7,2) и 200 мкл 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В контрольные регистрационные кюветы вместо биологического супернатанта добавляли 200 мкл раствора Хенкса. Время записи хемилюминесцентной кривой составляло 1 час при температуре в регистрационной камере  $+20^\circ\text{C}$ .

О кинетике генерации свободных радикалов судили по характеру и параметрам хемилюминесцентной кривой: максимальной интенсивности хемилюминесцентной реакции ( $I_{max}$  - имп./с), времени ее достижения ( $T_{max}$ , мин) и площади под кривой хемилюминесценции ( $S$ , имп./час), определяющей общее количество квантов, регистрируемых за время записи хемилюминесцентной кривой (Владимиров, Проскурнина, 2009).

На каждый тест отбирали не менее 3 особей, всего проведено 213 тестов. Все полученные результаты обработаны статистически с использованием пакета программ Excel и STATISTICA 9. На графиках представлены средние значения и доверительные интервалы. Для сопоставления данных использовали t-критерий Стьюдента при вероятности 95 % ( $p=0,05$ ).

Люминолзависимая хемилюминесцентная кинетика, являясь результатом интеграции про- и антиоксидантных растворимых компонентов тканей амфипод, демонстрирует, как на протяжении периода развития оксидативного стресса изменяется скорость образования и дисмутации свободных радикалов, взаимодействующих с люминолом. На начальном этапе введение в кювету с биологическим образцом перекиси водорода сопровождалось всплеском хемилюминесцентной активности в течение 1 минуты (рис. 1), указывающим на интенсивность радикалообразования в реакциях, подобных реакции Фентона.

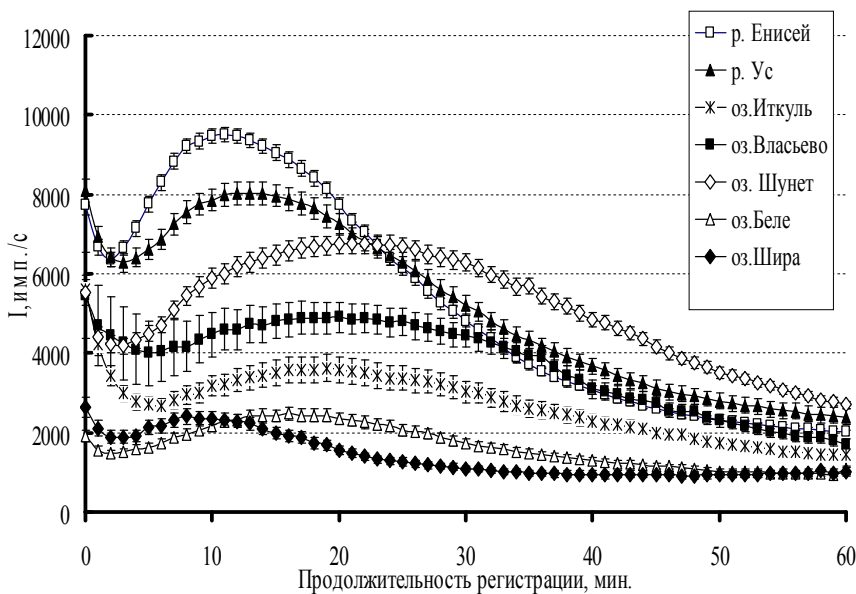


Рис.1 Хемилюминесцентная кинетика радикалообразования в тканях представителей зообентоса при инициации оксидативного стресса

Величина первого пика характеризует интенсивность окисления люминола образующимися активными формами кислорода (Владимиров, Проскурнина, 2009). Этот всплеск в 4 раза для амфипод из рек Ус и Енисей, в 2.9 раз из озер Иткуль, Власьево и Шунет и в 1.4 раза из о.Ши́ра соответственно превосходил уровень свечения в контрольной кювете. Очевидно, запуск реакций Фентона связан с присутствием в биологических образцах металлов с переменной валентностью (Fe, Cu, Mn, Cr), что более выражено для амфипод из Енисея и Уса, обитающих в среде с повышенным содержанием меди и накапливающим ее в тканях своего организма (Гладышев и др., 2012; Андрианова и др., 2013). Имеются сведения, что катионы  $Cu^{2+}$  могут способствовать, подобно ионам  $Fe^{2+}$ , и даже более эффективно, образованию ОН-радикалов и инициированию ПОЛ (Перевозкина, 2014). После первичного всплеска в течение 3-6 минут регистрировался спад хемилюминесцентной активности до уровня в 3-4 раза у речных и 1.5-2 раза у озерных амфипод выше контрольного с последующим этапом медленной вспышки, завершающимся к 60 минуте. При

ЭТОМ величина максимума медленной вспышки хемилюминесценции для амфипод из рек Енисей и Ус и о. Шунет превышала величину первой (рис.1, 2). Появление второго максимума обусловлено образованием в пробе вторичных радикалов в результате развития цепной реакции (Владимиров, Проскурина, 2007). Высота максимума и время его достижения зависят от константы скорости реакции антиоксидантов со свободными радикалами (Измайлов и др., 2011).

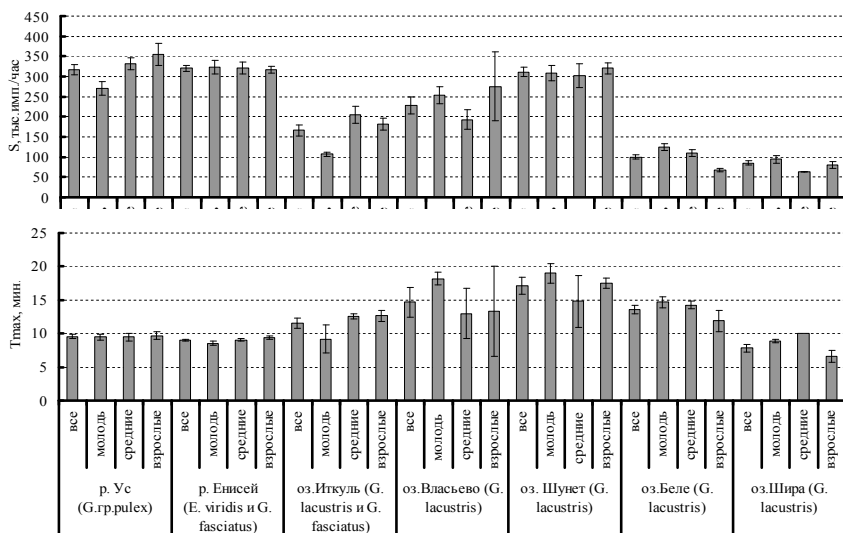


Рис. 2 Параметры кинетики радикалообразования в тканях амфипод из различных водных экосистем при инициации оксидативного стресса

Видовая специфика кинетики радикалообразования при оксидативном стрессе у амфипод может определяться степенью адаптированности вида к функционированию в определенных экологических условиях. Судя по объему и максимальной интенсивности образующихся радикалов, у *G. lacustris* система антиоксидантной защиты надежнее контролирует всплеск образования свободных радикалов в тканях особей, обитающих в озерах Белё и Ширы, чем у особей из озер Власьево и Шунет (рис. 2). По величине времени достижения максимума антиоксидантная система одновидовых особей из о. Белё более реактивна

(Измайлов и др., 2011), чем у особей из о. Шира, превосходящего по содержанию солей о. Белё. Достоверные отличия параметров кинетики генерации свободных радикалов при оксидативном стрессе в тканях амфипод из речных систем и пресного о. Иткуль вероятно связаны не только с разным видовым составом анализируемых особей, но и с различиями по температурным, гидрохимическим и гидродинамическим характеристикам мест обитания.

Возрастная динамика процессов генерации свободных радикалов более выражена у *G. гр. pulex* из р. Ус, у амфипод из о. Иткуль, *G. lacustris* из о. Белё. При этом с возрастом наблюдалось увеличение максимальной интенсивности и объема генерации свободных радикалов при оксидативном стрессе (рис. 2) у амфипод из пресноводных экосистем и снижение значения этих же характеристик для амфипод из о. Белё при сокращении времени достижения максимума, что очевидно, связано с возрастным изменением количественного содержания и функциональной активности компонентов антиоксидатной системы.

Таким образом, хемилюминесцентный анализ кинетики антиоксидантной активности гомогенатов тканей амфипод при активации оксидативного стресса перекисью водорода *in vitro* выявил как общие, так и специфические особенности кинетики радикалообразования и их элиминации в зависимости от видовой принадлежности, места и условий обитания, возраста.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрианова А.В., Апонасенко А.Д., Макарская Г.В., Пономарева Ю.А. Комплексная оценка состояния экосистемы малой горной реки в районе строительства железнодорожной магистрали // Вестник КрасГАУ. 2013. Вып. 8. С. 97-103.
2. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. 2009. Т. 49. С. 341-388.
3. Гладышев М.И., Анищенко О.В., Сущик Н.Н., Калачёва Г.С., Грибовская И.В., Агеев А.В. Влияние антропогенного загрязнения на содержание незаменимых полиненасыщенных жирных кислот в звеньях трофической цепи речной экосистемы // Сибирский экологический журнал. 2012. № 4. С. 511-521.
4. Гордеева А.В., Лабас Ю.А. Генерация активных форм кислорода наружными поверхностями водных организмов // Цитология. 2003. 45 (3). С. 284-289.

5. Измайлов Д.Ю., Демин Е.М., Владимиров Ю.А. Определение активности антиоксидантов методом измерения кинетики хемилюминесценции // Фотобиология и фотомедицина. 2011. Т. VII, № 2. С. 70-76.

6. Макарская Г.В., Лопатин И.Н., Тарских С.В. Хемилюминесцентный анализ функциональной активности фагоцитирующих клеток крови рыб // Доклады Академии наук. 2003. Т. 390, № 3. С. 420-422.

7. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи современной биологии. 1983. Т. 113, Вып. 4. С. 442-445.

8. Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 215 с.

9. Перевозкина М.Г. Тестирование антиоксидантной активности полифункциональных соединений кинетическими методами. Новосибирск: СибАК, 2014. 240 с.

10. Руднева И.И., Шайда В.Г. Механизмы адаптации ранних онтогенетических стадий рыб к окислительному стрессу / /Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов» (Борок, 22-27 сентября 2012 г). изд-во Борок, С. 312-315.

11. Тимофеев М.А. Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод: автореферат дисс... доктора биол. наук. Томск, 2010. 44 с.

12. Gorokhova E., Lof M., Reutgarda M., Lindstrom M., Sundelin B. Exposure to contaminants exacerbates oxidative stress in amphipod *Monoporeia affinis* subjected to fluctuating hypoxia // Aquatic Toxicology. 2013. № 127. P. 46-53.

13. Livingstone D.R. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture // Revue Med. Vet. 2003. № 154. P. 427-430.

14. Lushchak V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals // Aquatic Toxicology. 2011. Vol. 101. P. 13-30.

#### **THE INTERSPECIFIC AND AGE FEATURES OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SUSPENDED TISSUE OF AMPHIPODS FROM DIFFERENT WATER-CURRENTS**

Makarskaya G.V., Andrianova A.V., Tarskikh S.V.

The general and specific features of kinetics of free radicals formations and them elimination in tissue homogenates of amphipods depending on their species belonging, a place and conditions of inhabitation, age are revealed by chemiluminescent analysis of kinetics of oxidative activity in conditions of activation oxidative stress by peroxide of hydrogen *in vitro*.

## ЛИПИДНЫЙ СТАТУС ЛЕЩА *ABRAMIS BRAMA* РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА И ОЗЕРА НЕРО

Н.И. Силкина, В.Р. Микряков

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,  
Борок, Россия, e-mail: [sni@ibiw.yaroslavl.ru](mailto:sni@ibiw.yaroslavl.ru)*

Рыбинское водохранилище и озеро Неро, расположенные в одной климатической зоне Ярославской области, различаются площадью водного зеркала, гидрохимическим режимом, биоразнообразием, составом ихтиофауны, спектром кормовой базы для рыб, степенью загрязнения вод и др.

Рыбинское водохранилище – одно из крупнейших водоемов озерного типа с площадью зеркала 4550 км<sup>2</sup>, (полный объем - 25,4 км<sup>3</sup>, полезный объем - 16,7 куб.км). Водная акватория наиболее сильно загрязнена в районе г. Череповец, где основными источниками загрязнения являются ОАО “Северсталь”, предприятия по производству минеральных удобрений – ОАО “Череповецкий Азот” и ОАО “Аммофос”, а также МУП “Водоканал”. Установлен устойчивый уровень загрязнения трудноокисляемыми органическими веществами (по ХПК), соединениями меди, железа и цинка, среднегодовые концентрации которых соответственно составляли 1,5–2 ПДК, 2–4 ПДК, 1–2 ПДК и 1 ПДК (Влияние стоков..., 1990; [old.ryb.ru](http://old ryb.ru) > site/sea/).

Оз. Неро – самое крупное в Ярославской области. Средняя глубина озера составляет 1.6 м, площадь зеркала – 57.8 км<sup>2</sup>, объем водной массы – 90 10<sup>6</sup> м<sup>3</sup>. Озеро, особенно его северная часть, подвергается сильному антропогенному загрязнению бытовыми и промышленными стоками г. Ростова, п. Поречье-Рыбного и за счет промышленной добыче сапропеля (Состояние экосистемы..., 2008).

Антропогенные факторы оказывают большое влияние на живые организмы, в том числе рыб, что отражается на их физиолого-биохимическом состоянии, вызывая отклонения липидного обмена, ослабление защитных реакций рыб, повышение уровня зараженности паразитами и естественной смертности (Микряков и др., 1990; 2001). Это свидетельствует о

прессинге ксенобиотиков, приводящем к глубоким нарушениям метаболических процессов, обеспечивающих оптимальный рост, развитие, функционирование всех систем жизнедеятельности, индивидуальную целостность организма рыб в онтогенезе.

При адаптации гидробионтов к неблагоприятным факторам среды важную роль играет комплекс биохимических механизмов, обеспечивающих компенсаторные реакции в процессах приспособления рыб к стрессирующим факторам среды.

Липиды в организме рыб, как известно, выполняют многогранные физиологические, биохимические, иммунологические функции, участвуют в формировании молекулярных, клеточных, тканевых структур, являются не только структурной основой клеточных мембран, но и составной частью интермедиаторов, гормонов, биологически активных веществ и др. (Лапин, Шатуновский, 1981; Гершанович и др., 1991). Липидам принадлежит значительная роль в обеспечении процессов жизнедеятельности. Изучение состояния липидного обмена при антропогенных загрязнениях представляется весьма важным для выявления механизмов повреждающего действия ксенобиотиков на биохимические адаптации и разработки биоиндикаторов для оценки здоровья рыбного населения при мониторинговых исследованиях качества водных экосистем.

Цель работы – сравнительная характеристика показателей липидного обмена сыворотки крови леща Рыбинского водохранилища и оз. Неро.

Объектом исследования послужила сыворотка крови леща *Abramis brama* в возрасте 7+ – 8+. Рыбы отбирались из сетевых уловов осенью на двух участках Рыбинского водохранилища (Волжский плес – условно чистый участок и на станции близи д. Торова – загрязненная зона) и на оз. Неро. Сыворотку крови получали из хвостовой артерии после каудозектомии.

Содержание общих липидов (ОЛ) устанавливали стандартным гравиметрическим способом по Фолчу (Folch et al., 1957); качественный состав общих липидов выявляли общепринятыми методами тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» (Кейтс, 1972). Одновременно анализировали содержание малонового диальдегида (МДА) (Андреева и др.,



1988) и антиоксидантов по уровню общей антиокислительной активности (АЗ) по кинетике окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха в присутствии тканевых экстрактов (КОС) по общепринятой методике, описанной Семеновым и Ярошем (1985). Результаты исследований подвергали статистической обработке при помощи стандартного пакета программ (приложение Statistica 6.0) с использованием t-теста,  $p < 0.05$ .

Проведенные исследования показали существенные различия между лещами оз. Неро, загрязненного участка Рыбинского водохранилища (ст. Торово) и Волжского плеса.

В группах исследованных рыб выявлены отличия как по содержанию ОЛ, так и по количественному содержанию отдельных липидных компонентов (табл.). Уровень ОЛ у рыб из оз. Неро и ст. Торово по сравнению с особями, отловленными на Волжском плесе из Рыбинского водохранилища, был достоверно более высоким, причем, максимальный уровень ОЛ зафиксирована на ст. Торово. Повышенная концентрация общих липидов сыворотки крови из оз. Неро и ст. Торово свидетельствует о токсикант индуцируемой интенсификации процессов липолиза в организме рыб. Повышение содержания общих липидов в тканях рыб ранее устанавливали у особей, обитающих в водоемах с повышенной антропогенной нагрузкой и в опытных условиях (Лапин, Шатуновский, 1981; Гершанович и др., 1991; Микряков и др., 1990; Силкина и др., 2008, 2012; Wille et al., 2002; Dwyer et al., 2003).

Повышение уровня общих липидов в сыворотке крови рыб, отловленных в загрязненных водах, сопровождалось перераспределением отдельных фракций липидов. Качественный состав липидов у рыб из разных станций был идентичен, но количественное содержание отдельных липидных компонентов отличалось. Изменение уровня метаболизма липидов сыворотки у рыб, обитающих в загрязненных водах оз. Неро и ст. Торово по сравнению с чистой акваторией Волжского плеса, связано со снижением наиболее весомых фракций: структурных фосфолипидов и запасных триацилглицеринов и возрастанием доли НЭЖК и холестерина.

Таблица. Физиолого-биохимические показатели леща

Показатели	оз. Неро	Рыбинское водохранилище	
		ст. Торово	Волжский плес
Число рыб	25	16	22
ОЛ, мг%	1355±30*	1420±55*	1150±70
Фракции липидов, %			
Фосфолипиды	23.17±0.4*	22.63±0.5*	25.27±0.4
Холестерин	18.62±0.4*	19.21±0.3*	15.28±0.3
НЭЖК	13.12±0.2*	13.33±0.2*	10.24±0.2
Триацилглицерины	23.81±0.4*	22.18±0.4*	25.94±0.4
Эфиры стерина	16.43±0.4	17.39±0.4	17.24±0.3
Углеводороды	4.85±0.1	5.26±0.2	6.03±0.2
МДА	4.34±0.27*	3.98±0.33*	3.22±0.41
КОС	1.65±0.31*	1.67±0.22*	1.02±0.14

Примечание: \* - достоверно относительно ст. Волжский плес при  $P \leq 0,05$ .

Присутствие в сыворотке рыб избытка НЭЖК и холестерина, принимающих участие в возникновении целого ряда патологических состояний, характеризует серьезные нарушения липидного обмена (Лапин, Шатуновский, 1981; Сидоров, 1983; Гершанович и др., 1991). Сдвиг липидных фракций, сопровождающийся, в частности уменьшением доли фосфолипидов, может быть связан с нарушением синтеза фосфолипидов из-за недостаточного образования или поступления в организм рыб липотропных веществ (холин, метионин и др.). Известно, что при их дефиците значительно снижается синтез фосфолипидов из нейтрального жира (глицерина, жирных кислот). Одновременно со снижением структурных фосфолипидов отмечено снижение запасных энергетических липидов – триацилглицеринов, недостаток которых в сыворотке леща рыб свидетельствует об общем истощении организма. Пониженный уровень триацилглицеринов может быть связан с более интенсивным использованием липидов этого класса как на энергетические нужды, так и для поддержания основного обмена веществ. Важно также отметить, что фосфолипиды и холестерин являются основными компонентами биологической мембраны, и их количественное изменение приводит к изменению свойств биомембран (проницаемости, степени устойчивости, микровязкости и др.) при воздействии на рыб патогенных факторов. Кроме того, повышение уровня

холестерина является одним из признаков, отражающих степень стрессированности организма. Полученные нами результаты согласуются с данными, полученными нами ранее, а также другими авторами, показавшими, что в системе липидного метаболизма наблюдаются отклонения от нормы при ряде стрессирующих факторов биотической и абиотической природы (Лапин, Шатуновский, 1981; Сидоров, 1983; Гершанович и др., 1991; Wille et al., 2002; Dwyer et al., 2003).

Таким образом, пребывание в загрязненной воде вызывает у рыб значительное изменение липидного состава сыворотки вследствие их отравления. Изменение соотношения липидных фракций и сдвиг обменных процессов приводят, видимо, к нарушениям внутри- и внеклеточных контролирующих регуляторных механизмов. Такие отличия липидных показателей у рыб в природных условиях носят адаптивный характер и зависят в первую очередь от уровня загрязнения.

Результаты изучения процессов ПОЛ и АЗ у леща из разных районов свидетельствуют о том, что хроническое отравление рыб в загрязненных районах отражает четко выраженные изменения их прооксидантного статуса, характеризующегося поллютант индуцируемой активацией процесса липопероксидации, на что указывает повышенное содержание МДА, превышающее таковой уровень из чистой зоны. При техногенном загрязнении у леща накапливалось больше продуктов перекисления липидов (МДА) по сравнению с чистым районом и повышался показатель КОС.

Повышенное содержание МДА и уровня КОС у рыб из загрязненных акваторий характеризует повышенный уровень липидоперекислительных процессов и снижение уровня антиоксидантных структур в тканях. Неконтролируемому нарастанию продуктов перексидации липидов, как известно, препятствует многоуровневая система антиоксидантной защиты, которой принадлежит важная роль в нейтрализации молекулярных механизмов, инициирующих активацию перекисеобразовательных процессов и реализации адаптивных компенсаторных реакций в организме (Зенков и др., 1999; Меньшикова и др., 2008; Moseley et al., 2004; Winston, 1991). Интенсификация процессов перекисления липидов и

пониженное содержание уровня антиоксидантов характерно для рыб, испытывающих состояние окислительного стресса. Ранее нами показано, что аналогичные нарушения баланса в прооксидантно-антиоксидантной системе, выражающиеся в смещении равновесия ПОЛ ↔ АЗ в сторону интенсификации неконтролируемых процессов ПОЛ встречаются у рыб из загрязненных районов (Микряков и др., 2001; Силкина и др., 2008, 2012; Экологические проблемы..., 2001; Winston, 1991; Möller et al., 1996; Moseley et al., 2004).

Наблюдаемые изменения уровня общих липидов и соотношений отдельных липидных фракций, а также баланса прооксидантно-оксидантной системы у рыб, обитающих в загрязненных водоемах оз. Неро и Рыбинского водохранилища по сравнению с особями из относительно более чистого региона обусловлены негативным влиянием поллютантов. Установленные различия позволяют думать, что рыбы на антропогенное загрязнение водной среды реагируют дизрегуляцией липидного обмена.

#### Список литературы

1. Андреева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. 1988. № 11. С. 41-43.
2. Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск. 1990. С. 3-11.
3. Гершанович А.Д., Лапин В.И., Шатуновский М.И. Особенности обмена липидов у рыб // Успехи соврем.биологии. 1991. Т.3. Вып.2. С. 207-219.
4. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Вольский Н.Н., Козлов В.А. Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз // Усп. соврем. биол. 1999. Т. 119. № 5. С. 440-450.
5. Кейтс М. Техника липидологии. М. 1972. 300 с.
6. Лапин В.И., Шатуновский М.И. Особенности состава, физиологическое и экологическое значение липидов рыб // Усп. совр. биол. 1981. Т. 1. С. 380-394.
7. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
8. Микряков В.Р., Андреева А.М., Лапирова Т.Б., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб Шекснинского плеса после аварии на промышленных предприятиях г. Череповца // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск. 1990. С. 144-155.

9. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапинова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука. 2001. 126 с.
10. Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Укр. биохим. журн. 1985. Т. 57. № 3. С. 50–52
11. Сидоров В.С. Экологическая биохимия. Липиды. Л.: Наука, 1983. 240с.
12. Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Многолетние показатели липидного обмена у леща Рыбинского водохранилища // Проблемы экологии в современном мире: Матер. Пятой всероссийской INTERNET-конференции (с международным участием). Тамбов, 2008. С. 94-100.
13. Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние антропогенного загрязнения на окислительные процессы в печени рыб Рыбинского водохранилища // Экология. 2012. № 4. С. 1–5.
14. Состояние экосистемы озера Неро в начале XXI века. М.: Наука, 2008. 406 с.
15. Экологические проблемы Верхней Волги: Коллективная монография. Ярославль, Изд-во ЯГТУ, 2001. 427 с.
16. Dwyer K.S., Parrish C.C., Brown J.A. Lipid composition of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*) in relation to dietary lipid intake // Marine Biology. 2003. № 143. P. 659-667.
17. 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. P. 497-509.
18. Möller P., Wallin H., Knudsen L.E. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors // Chemo-Biological Interactions. 1996. V. 102. P. 17-36.
19. Moseley R., Hilton J.R., Waddington R.J. et al. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments // Wound Repair Regen. 2004. V. 12. № 4. P. 419-429.
20. Wille K., McLeam E., Goddard J.S., Byatt J.C. Dietari lipid level and growth hormone alter growth and body conformation of blue tilapia, *Oreochromis aureus* // Aquaculture. 2002. № 209. P. 219-232.
21. Winston G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Compar.biochem. and Physiol. 1991. V.100. № 1-2. P. 173-176.

### **LIPID STATUS IN BREAM *ABRAMIS BRAMA* OF THE RYBINSK RESERVOIR AND LAKE NERO**

Silkina N.I., Mikryakov V.R.

The comparative characteristic of indicators lipid an exchange of blood serum bream the Rybinsk reservoir and lake Hero is given. Essential distinctions of level of the total lipids, their fractional structure, lipid peroxidation and the maintenance of antioxidants between bream, living in the polluted water areas (lake Hero and Torovo

of the Rybinsk reservoir) and rather purer (Volga pool) are established. Observable changes are caused by negative influence anthropogenic pollution.

## **НЕКОТОРЫЕ ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИДИЙ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* (Lamarck, 1819) ЧЕРНОГО МОРЯ**

А.С. Соколова, В.Р. Микряков, Н.В. Елизарова  
*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,  
Борок, Россия, e-mail: Blueseasasha@mail.ru.*

Мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) – двустворчатые моллюски, относящиеся к эврибионтным организмам. Они обитают в широком диапазоне температур, солености, содержания кислорода в воде, а также способны существовать в среде с высокой концентрацией различных взвешенных частиц и токсических веществ (Супрунович и др., 1990). Это свидетельствует о том, что в процессе эволюции и адаптации к разным экологическим факторам, в том числе экстремальным, у них сформировалась высокоэффективная и пластичная многокомпонентная защитная система (Довженко, 2003; Cooper, 1990).

Иммунная система моллюсков состоит из гуморальных и клеточных факторов: гемолимфы и разных по структуре клеток (малые и большие гиалиноциты и гранулоциты) (Анисимова, 2013). Основными функциями иммунологических механизмов являются поддержание биологического постоянства внутренней среды и обеспечение индивидуальной целостности организма, сохранение жизнеспособности и адаптации моллюсков к благоприятным и неблагоприятным факторам среды. Исследованиями показано, что на изменяющиеся условия среды защитная система моллюсков, как и у позвоночных животных, реагирует изменением структурного и функционального состояния клеточных и гуморальных факторов (Микряков и др., 2001).

Целью настоящего исследования явилось сравнение некоторых иммунофизиологических показателей черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819.

Моллюсков отбирали осенью 2014 г. в Черном море в бухте Казачья, расположенной в районе г. Севастополя. В данной акватории нет источников загрязнения, она считается условно чистым районом. Мидий замораживали в морозильной камере при температуре минус 15-20°C и транспортировали в специальных термоконтейнерах со льдом в лабораторию для исследования. Мягкие ткани моллюсков препарировали, разделяли на органы (жабры, нога и пищеварительная железа (печень и выводные протоки)), которые подвергали гомогенизации. Оценку иммунофизиологического состояния мидий проводили на основании анализа уровня неспецифических иммунных комплексов (ИК), перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиокислительной активности.

Неспецифические иммунные комплексы (ИК) определяли в гомогенатах тканей методом селективной преципитации полиэтиленгликолем с молекулярной массой 6000 (Гриневич и др., 1981). Интенсивность ПОЛ в тканях оценивали по накоплению ТБК-реактивных компонентов – конечных продуктов перекисного окисления липидов, концентрацию которых определяли на основе учета количества продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой и дающих с ней окрашенный комплекс (Андреева и др., 1988). Антиокислительную активность ткани оценивали по кинетике окисления субстрата восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха по общепринятой методике, адаптированной нами для моллюсков (Семенов, Ярош, 1985). Статистическую обработку результатов исследования проводили по стандартным алгоритмам, реализованным в пакете программ (Statistica) с использованием t-теста ( $p < 0.05$ ).

Полученные результаты исследования позволили выявить зависимость величин исследованных признаков от особенностей структурно-функциональной организации тканей и органов и от пола моллюсков.

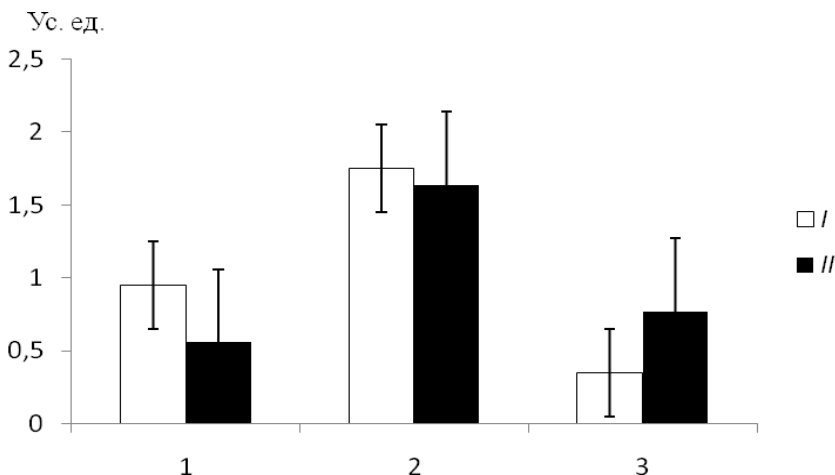


Рис.1. Уровень содержания ИК в органах мидий: 1 – пищеварительная железа, 2 – жабры, 3 – нога. I – Самки; II – Самцы.

Содержание неспецифических ИК в жабрах значительно превышал таковые в других исследуемых органах мидий обоих полов. Самые низкие показатели обнаружены в пищеварительной железе у самцов и в мышечных тканях ноги самок (рис.1).

У самцов концентрация ТБК-реактивных продуктов больше в пищеварительной железе и ноге, а у самок – в жабрах. Высокий уровень ПОЛ отмечен в пищеварительной железе, а низкий – в ноге у самок и в жабрах у самцов (рис. 2).



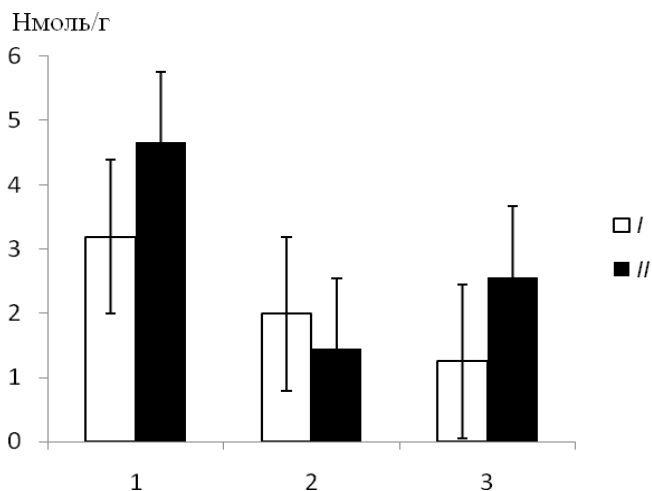


Рис.2. Содержание ТБК-реактивных продуктов в тканях мидий. Обозначения те же, что на рис. 1.

В пищеварительной железе и жабрах показатели КОС у самцов имели близкие значения, а в ноге – минимальные, тогда как у самок они превышали таковые в других тканях (рис. 3).

На основании проведенных исследований были установлены половые и тканеспецифические различия тестируемых показателей мидий. Выявленные у самок высокие уровни ИК и КОС на фоне низкого содержания ТБК-реактивных компонентов, по сравнению с таковыми у самцов, вероятно, обусловлено интенсивностью происходящих метаболических процессов, связанных с активацией генеративного обмена и подготовкой их к периоду размножения и перераспределением энергии для созревания половых продуктов (Супрунович, 1990).

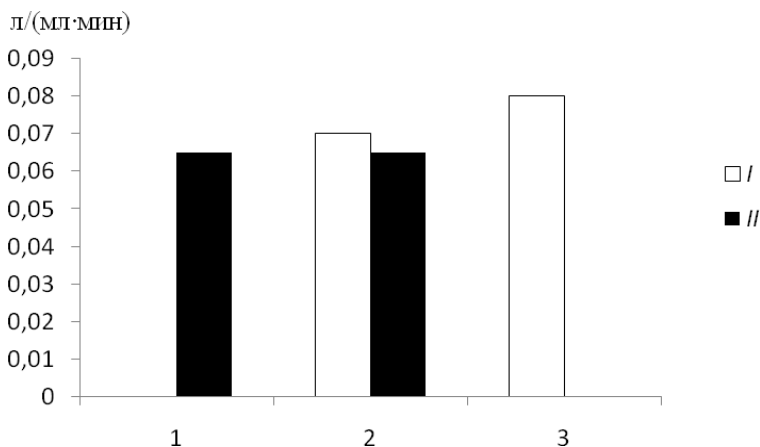


Рис.3. Показатель КОС в тканях мидий. Обозначения те же, что на рис. 1.

В тканях моллюсков установлены существенные различия концентрации иммунных комплексов, являющихся одним из продуктов формирования антитела и чужеродного антигена и отражающих клиринговую функцию макрофагально-лимфоидной системы. Повышение концентрации ИК, как правило, происходит при снижении функции структур, осуществляющих нейтрализацию и очищение организма животных (Ройт и др., 2000). Так как мидии относятся к группе фильтраторов, участвующих в процессах очищения водоема, то жабры в первую очередь подвергаются интенсивному воздействию чужеродных антигенных раздражителей (Довженко, 2006). Высокое содержание неспецифических ИК в жабрах, возможно, обусловлено морфофункциональными особенностями ткани и характером выполняемых функций. У моллюсков данный орган является одним из первых барьеров, выполняющих не только респираторную функцию, но и фильтрационную путем образования комплекса антиген-антитело на поверхности жаберных клеток для нейтрализации чужеродных агентов.

ПОЛ является нормальным физиологическим процессом, но в случае ослабления клеточных защитных систем стрессорирующие факторы стимулируют генерацию свободных радикалов, в том числе ПОЛ, что оказывает отрицательное воздействие на

жизнедеятельность организма (Болдырев, 2000). В пищеварительной железе мидий содержание ТБК-реактивных продуктов выше, чем в других органах, что, вероятно, обусловлено особенностями функционального состояния и интенсивностью происходящих окислительно-восстановительных процессов: биоаккумуляцией и детоксикацией различных соединений и активным фагоцитозом (Moore et al., 1985; Livingstone et al., 1992; Mitchelmore et al., 1998). Наши данные согласуются с результатами других исследователей, показавших увеличение содержания первичных и промежуточных продуктов ПОЛ в гепатопанкреасе мидий (Руднева-Титова, 1996). Помимо этого, Высокие величины КОС свидетельствуют о низком уровне или дефиците содержания в тканях ферментных или неферментных антиоксидантов. В состоянии окислительного стресса ПОЛ ускоряется и приводит к снижению антиоксидантов, нейтрализующих токсические эффекты свободных радикалов, пероксидов и гидроперекисей и смещению равновесия в прооксидантно-антиоксидантной системе (Болдырев, 2001).

Таким образом, проведенные исследования показали, что для мидий характерны существенные различия величин исследуемых показателей в тканях и органах, а также показана их зависимость от пола моллюска.

Авторы выражают благодарность сотруднику отдела ихтиологии Института морских биологических исследований РАН (г. Севастополь) А.В. Завьялову за предоставление материала для исследования и д.б.н. проф. Рудневой И.И. за высказанные замечания по работе.

#### Список литературы

1. Андреева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. 1988. № 11. С. 41–43.
2. Анисимова А.А. Морфофункциональные параметры гемоцитов в оценке физиологического состояния двустворчатых моллюсков // Биология моря. 2013. Т. 39. № 6. С. 389–399.
3. Болдырев А.А. Окислительный стресс и мозг // Соросовский Образ. Журн. 2001. Т. 7. № 4. С. 21–28.
4. Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело. 1981. № 8. С. 493–496.
5. Довженко Н.В., Бельчева Н.Н., Челомин В.П. Использование интегрального показателя антирадикальной активности защитной системы гидробионтов в биомониторинге водной среды (на примере двустворчатого

моллюска *Crenomytilus grayanus*) // Мат. регион. школы-семинара молодых ученых, аспирантов и студентов «Анализ современного состояния и перспективы развития регионов Дальнего Востока», Биробиджан. 2003. С. 20-22.

6. Довженко Н.В. Реакция антиоксидантной системы двустворчатых моллюсков на воздействие повреждающих факторов среды: Автореф. дис. канд. биол. наук. Владивосток. 2006. С. 14-16.

7. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука. 2001. С. 6-12.

8. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М.: Мир. 2000. 592 с.

9. Руднева-Титова И.И. Соотношение процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности в тканях черноморской мидии // Гидробиологический журн. 1996. Т. 32. № 5. С. 50-57.

10. Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Журн Укр. биохим. 1985. Т. 57. № 3. С. 50-51.

11. Супрунович А.В., Макаров Ю.Н. Культивируемые беспозвоночные: мидии, устрица, гребешки, раки, креветки. Киев: Изд-во Наукова Думка. 1990. 196 с.

12. Cooper E.L. Immunity and neoplasia in Mollusks // Isr. J. Med. Sci. 1976. Vol. 12. № 4-5. P. 479-494.

13. Livingston D.R., Pipe R.K. Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects // The Mussel *Mytilus*. Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Ed. by E. Gasling. Vol. 25. Acad. Press, 1992. P. 425-464.

14. Mitchelmore C.L., Birmelin C., Livingstone D.R., Chipman J.K. Detection of DNA strand breaks in isolated mussels (*Mytilus edulis*) digestive gland cells using the "Comet" assay // Ecotoxicology and Environmental Safety. 1998. Vol. 41. P. 51-58.

15. Moore M.N. Cellular responses to pollutants // Mar. Pollut. Bull. 1985. V. 16. P. 134-139.

### **IMMUNO-PHYSIOLOGIC INDICATORS OF MUSSEL *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* (LAMARCK, 1819) IN BLACK SEA**

*Sokolova A.S., Mikryakov V.R., Elizarova N.V.*

The results of the comparative study of the level of non-specific IC, LPO and oxidation intensity in tissues (gills, digestive gland and foot) in Black Sea mussels *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) were shown the differences in tested tissues and sex. It was found high level of IC and CSO in both sexes in the gills, and the content of TBA-reactive products in the digestive gland. Level IC and CSO were higher female than in male, and TBA-reactive products showed the opposite trend.

# СОДЕРЖАНИЕ

## СЕКЦИЯ ПЛЕНАРНАЯ

Воронин В.Н., Дудин А.С., Батуева М.Д.-Д., Zhang J.Y. Специфичность микоспоридий пресноводных рыб Евразии	6
Голованов В.К. Температура и здоровье рыб. Экологические, физиолого-биохимические и иммунологические аспекты	11
Грищенко Л.И. Сравнительная патология, патоморфология и патогенез при инфекционных болезнях и токсикозах рыб	19
Ирназаров И., Rakus K., Jurecka P., Kaminska T. Особенности иммунного ответа карпов с различной степенью резистентности к инфекционным заболеваниям	25
Королева И.М. Гематологические показатели сиговых рыб в водоемах Кольского севера в условиях антропогенной нагрузки	32
Кузьмина В.В. Влияние серотонина и холецистокинина на пищевое поведение и процессы пищеварения у рыб	39
Микодина Е.В. Фенодевианты семенников тихоокеанских лососей: норма или патология?	48
Микряков В.Р., Мартемьянов В.И. Иммуно-физиологические модификации в организме рыб в период размножения	56
Микряков Д.В., Микряков В.Р., Герасимов Ю.В., Силкина Н.И., Суворова Т.А. Функционирование иммунной системы у различных по экологии видов рыб	64
Минзюк Т.В., Кавцевич Н.Н. К оценке функционального состояния лейкоцитов крови дельфинов афалин	73
Наумова А.М., Наумова А.Ю., Логинов Л.С. Оценка состояния здоровья рыб по клиническим признакам	80
Пронина Г.И., Микряков Д.В., Силкина Н.И., Петрушин А.Б. Использование некоторых иммуно-биохимических показателей для сравнительной оценки различных пород и кроссов рыб, выращиваемых в рыбоводных хозяйствах	83
Решетников Ю.С., Попова О.А. Современное состояние лососевых рыб в водоемах Европейского Северо-Востока	94
Рудакова С.Л. К проблеме разработки системных научно-обоснованных мер по обеспечению иктиопатологического благополучия объектов и хозяйств аквакультуры России	101
Рудакова С.Л., Кюраф Г., Бочкова Е.В. Филогенетическая изменчивость изолятов вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) в бассейне реки Большая (Камчатка)	108
Руднева И.И. Окислительный стресс и патологии рыб	112

## СЕКЦИЯ I. ПРОБЛЕМЫ ОБЩЕЙ И ЧАСТНОЙ ИММУНОЛОГИИ

Tkachenko Nalyna, Grudniewska Joanna Effect of vaccination against furunculosis on level of oxidative stress biomarkers in muscle tissue of rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	121
Tkachenko Nalyna, Grudniewska Joanna Oxidative stress biomarkers in the liver of rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i> after vaccination against yersinia rucker	130
Балабанова Л.В. Ультраструктура иммунокомпетентных клеток кефали <i>Mugil Auratus</i>	140
Богданова П.Д., Дрошнев А.Е., Карпова М.А., Завьялова Е.А. Новый метод диагностики йерсиниоза лососевых рыб на основе иммуноферментного анализа (ИФА)	144
Бочкова Е.В., Устименко Е.А., Сергеев Н.В. Ассоциативное влияние опасных патогенов рыб – вируса ihn и бактерий <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	150
Гаврилин К.В., Суворова Т.А., Пономарев А.К. Воздействие пиримидинов на гуморальный и клеточный иммунитет рыб	156
Гордеев И.И., Балабанова Л.В., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Состав лейкоцитов периферической крови и органов кроветворения антарктического клякача <i>Dissostichus mawsoni</i>	162
Гордеев И.И., Микряков Д.В., Силкина Н.И., Микряков В.Р. Некоторые морфометрические и иммунобиохимические показатели трех видов голецов озера кроноцкое (Камчатка)	169
Долматова Л.С., Долматов И.Ю. Различная динамика экспрессии рецепторов лектинов на поверхности фагоцитов двух субпопуляций при заживлении раны у голотурии <i>Eupentacta fraudatrix</i>	177
Заботкина Е.А., Голованов В.К., Голованова И.Л. Влияние пестицида раундап на ультраструктуру клеток иммунокомпетентных органов головешки-ротана <i>Percottus glenii</i>	182
Макарская Г.В., Тарских С.В. Динамика функциональной активности клеток неспецифической резистентности в процессе онтогенеза у рыб Красноярского водохранилища	190
Микряков В.Р., Силкина Н.И., Микряков Д.В., Елизарова Н.В. Динамика баск в различные периоды годового цикла рыб	199
Микряков Д.В., Микряков В.Р., Степанова В.М. Влияние некоторых экологических факторов на содержание антигенреагирующих лимфоцитов в организме карпа <i>Cyprinus carpio</i>	202

<b>Микряков В.Р., Половкова С.Н., Половков Д.В.</b> Аллергические реакции рыб на загрязнение воды токсикантами	210
<b>Пыльнов В.А., Никитин М.М., Доронин М.И., Котова Е.В.</b> Разработка метода пцр-рв для диагностики вирусных болезней рыб	214
<b>Светашева Д.Р., Грушко М.П.</b> Оценка особенностей формирующихся органов кроветворения личинок Жабы обыкновенной ( <i>Bufo viridis</i> )	216
<b>Силкина Н.И., Силкин Н.Ф., Микряков В.Р.</b> Зависимость антимикробной функции сыворотки крови рыб от фракционного состава белков и липидов	219
<b>Суворова Т.А.</b> Влияние иммунобиологических препаратов на клеточное звено иммунной системы рыб	233
<b>Терещенко В.Г., Микряков В.Р., Микряков Д.В.</b> Применение интегральных индексов структуры лейкоцитов для описания процессов, происходящих в иммунной системе рыб	245
<b>Шаяхметов Р.А., Микряков Д.В., Суворова Т.А., Соколова А.С.</b> Сравнительное изучение особенностей структурной организации иммунокомпетентных клеток и окислительных процессов в тканях и органах иммунной системы пресноводных и морских рыб сем. Тресковые	258
<b>Юхименко Л.Н.</b> Изучение вирулентности аэромонад по степени днк-азной активности	267
<b>СЕКЦИЯ II. ПРОБЛЕМЫ ОБЩЕЙ И ЧАСТНОЙ ПАТОЛОГИИ</b>	<b>276</b>
<b>Барбухо Е.В., Килочницкая Н.П.</b> Исследование патологически измененных клеток крови рыб в оценке экологического состояния озера "Тихое"	276
<b>Гордеев И.И., Микряков Д.В., Силкина Н.И., Соколова А.С.</b> Некоторые особенности липидного обмена антарктического клыкача <i>Disostichus mawsoni</i> (Nototheniidae)	280
<b>Грушко М.П., Айтимова А.А.</b> Оценка состояния внутренних органов волжской сельди	286
<b>Гудков Д.И., Микряков В.Р., Микряков Д.В., Поморцева Н.Л., Каглан А.Е., Назаров А.Б.</b> Нарушение гематологических показателей окуня <i>Perca fluviatilis</i> в водоемах чернобыльской зоны отчуждения	289
<b>Есипова Н.Б., Сидоренко В.С.</b> Патологические изменения в тканях и органах рыб под действием паразитических червей <i>P. eustrongylides</i>	297
<b>Заботкина Е.А., Голованов В.К., Голованова И.Л.</b> Влияние кратковременного нагрева и пестицида раундап на гематологические показатели головешки-ротана	304
<b>Кириш А.С.</b> Результаты эколого-паразитологического исследования хариуса европейского ( <i>Thymallus thymallus</i> ) бассейна реки Суда в 2014 году	312
<b>Куливацкая Е.А., Грачева Е.Л., Чиркова В.В., Кузьмина В.В.</b> Влияние фенола и его производных на активность гликозидаз кишечника рыб	317
<b>Ларцева Л.В., Обухова О.В.</b> Видовое разнообразие псевдомонад, выделенных из воды и судака ( <i>Sander lucioperca</i> ) и их патогенный потенциал в дельте р. Волги	324
<b>Мельникова М.С.</b> Гистопатологические методы в оценке состояния здоровья рыб при искусственном выращивании	331
<b>Музыка Л.В., Киричук Г.Е.</b> Особенности содержания β-каротина в организме <i>Lymnaea stagnalis</i> при воздействии разных концентраций фенола	337
<b>Паршуков А.Н., Завьялова Е.А., Хлунов О.В.</b> Ихтиофоз у лососевых рыб на одном из садковых хозяйств Ладожского озера	343
<b>Силкина Н.И.</b> Влияние сублетальных концентраций ионов меди и цинка на некоторые иммунобиохимические показатели рыб	346
<b>Тарлева А.Ф., Грачева Е.Л., Куливацкая Е.А., Кузьмина В.В.</b> Видовые особенности чувствительности протеиназ рыб к фенолу и его производным	355
<b>Файзуллина Д.Р., Базельюк Н.Н.</b> Патологические изменения некоторых физиолого-биохимических показателей крови каспийской воблы ( <i>Rutilus rutilus caspicus</i> Jak.)	364
<b>Шайда В.Г., Скуратовская Е.Н., Руднева И.И.</b> Влияние загрязнения на параметры окислительного стресса в тканях рыб	369
<b>СЕКЦИЯ III. БОЛЕЗНИ РЫБ И ОХРАНА ЗДОРОВЬЯ ГИДРОБИОНТОВ</b>	<b>375</b>
<b>Авдеева Е.В., Евдокимова Е.Б.</b> Динамика триенофороза форели в форелевом садковом хозяйстве «Прибрежное» (Калининградская область)	375
<b>Авдеева Е.В., Казимирченко О.В.</b> Микрофлора промысловых видов рыб из естественных водоемов Калининградской области	377
<b>Григорян К.М., Саргсян М.П., Овсепян В.В., Бадалян Г.Н., Гиновьян М.Р.</b> Устойчивость к антибиотикам видов рода <i>Aeromonas spp.</i> изолированных из радужной форели, выращиваемой в Массиском регионе РА	381
<b>Грищенко Л.И., Елсеев Э.Л.</b> Патолого-морфологические изменения при флексибактериозе осетровых рыб	388

Дудин А.С., Чернышёва Н.Б., Шульман Б.С. Изменения паразитофауны плотвы ( <i>Rutilus rutilus</i> L. 1758) Невской губы Финского залива под влиянием антропогенных факторов за длительный период наблюдений	393
Енгашев В.Г., Гончарова М.Н. Профилактика эктопаразитарных болезней при транспортировке рыб	399
Козлов К.В., Грицких Е.А. Паразиты промысловых видов рыб Камчатки, влияющие на товарное качество продукции	405
Конькова А.В. Лигулидоз молоди леща <i>Abramis brama</i> (Linnaeus, 1758) в Северном Каспии	410
Крылова Е.Н., Власов С.О. Зараженность плотвы ( <i>Rutilus rutilus</i> Linnaeus, 1758) метациккариями описторхиса в водных объектах Алтайского края	417
Микряков В.Р., Степанова М.А. Динамика изменения состава паразитафауны леща <i>Abramis brama</i> L. в период размножения	421
Романова Н.Н., Головина Н.А., Головин П.П. Гельминтофауна карповых рыб из водоемов центральной зоны РФ	425
Рязанова Т.В. Паразиты промысловых ракообразных охотского моря и их влияние на качество продукции	433
Скुरатовская Е.Н., Ковыршина Т.Б., Дорохова И.И., Неганова А.А. Влияние метациккарий трематоды <i>Стуртосотуле</i> на биохимические показатели бычка-кругляка <i>Neogobius melanostomus</i> (Азовское море)	439
Соколова А.С., Микряков В.Р., Жаворонкова О.Д., Кузьмичёва С.В. Морфо-физиологические показатели моллюска <i>Anodonta cygnea</i> (Linne, 1758) инвазированного водными клещами из рода <i>Unionicola</i> Haldeman, 1842	445
Микряков Д.В., Степанова М.А., Микряков В.Р. Влияние аналога кортизола на интенсивность инвазии хрусталика глаз стерляди <i>Acipenser ruthenus</i> метациккариями <i>Diplostomum paraspathaceum</i>	450
Федоткина С.Н. лerneоз рыб в Цимлянском водохранилище Волгоградской области	454
<b>СЕКЦИЯ IV. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ОСОБИ, ПОПУЛЯЦИЙ И ЭКОСИСТЕМЫ</b>	<b>457</b>
Аббасова Р.Ф., Надиров С.Н., Гумбатова С.Э, Ахмедова Н.Ф., Гусейнова С.А. Накопление тяжелых металлов в органах и тканях бычка-песочника <i>Neogobius fluviatilis</i> (pallas, 1814) в нижнем течении р. Кура	457
Баджаева О.В., Каниева Н.А. Изменение численности микроорганизмов в воде и грунте в модельных экосистемах под воздействием каспийской нефти	460
Барегамия М.А., Козлова Н.В., Макарова Е.Г., Базелюк Н.Н. Мониторинг генетического разнообразия нижеволжской популяции стерляди ( <i>Acipenser ruthenus</i> ) (по результатам исследований 2013-2014 гг.)	465
Бедукова О.А. Функциональная зависимость морфометрического и цитогенетического гомеостаза ихтиопопуляций рек Ровенского плато	468
Валова В.Н., Амвросов Д.Ю. Реакция крови молоди осетровых рыб на условия окружающей среды при товарном выращивании	475
Воронина Е.А., Дубовская А.В. Комплексная оценка состояния каспийских килек	482
Габдуллин М.А., Нарущко М.В., Петров С.А., Мальчевский В.А., Бажин А.С. Оценка влияния микроорганизмов, выделенных из многолетнемерзлых пород на выклев науплиев <i>Artemia salina</i>	488
Гандзюра В.П., Гандзюра Л.А., Корево Н.И. Вещественно-энергетические и информационные критерии состояния благополучия особи, популяции, сообщества и экосистемы	494
Грицких Е.А., Козлов К.В. Основные результаты санитарно-эпизоотического обследования горбуши Западного и Восточного побережий Камчатки	502
Гудимов А.В. Биосенсорный мониторинг и тестирование дизельного топлива по поведенческим реакциям двустворчатых моллюсков	508
Елеев Э.Л., Грищенко Л.И., Заботкина Е.А., Пономарёв В.Н. Патоморфологические изменения при герпесвирусной инфекции осетровых рыб	512
Ерохина И.А. Некоторые свойства эритроцитов в оценке физиологического состояния морских млекопитающих	517
Запруднова Р.А., Камшилов И.М. Буферные, дыхательные и энергетические особенности окуня ( <i>Perca fluviatilis</i> )	524
Казимирченко О.В., Котлярчук М.Ю. Некоторые особенности функционирования микробных сообществ при выращивании рыбы в УЗВ	526
Клишин А.Ю., Каниева Н.А., Федорова Н.Н., Баджаева О.В. Моллюски как индикаторы нефтяного загрязнения	529

<b>Крылов В.В., Изюмов Ю.Г., Чеботарёва Ю.В.</b> Влияние низкочастотных магнитных полей в комбинации с неблагоприятными факторами среды во время эмбриогенеза на состояние популяций рыб (на примере плотвы <i>Rutilus rutilus</i> )	534
<b>В.Н. Крючков</b> Оценка состояния австралийского рака <i>Cherax quadricarinatus</i> , культивируемого в Астраханской области	544
<b>Кузьмина Н.С., Кулаковская Е.В.</b> Индексы иммунокомпетентных органов придонно-пелагических черноморских рыб из бухт с разным уровнем загрязнения	550
<b>Маврин А.С., Мартемьянов В.И., Силкина Н.И., Микряков Д.В.</b> Содержание катионов в позвонках и малонового диальдегида в печени плотвы <i>Rutilus rutilus</i> L. в зависимости от степени зрелости гонад	557
<b>Макарская Г.В., Андрианова А.В., Тарских С.В.</b> Межвидовые и возрастные особенности антиоксидантной активности суспензий тканей амфипод из разнотипных водотоков	563
<b>Силкина Н.И., Микряков В.Р.</b> Липидный статус леща <i>Abramis brama</i> Рыбинского водохранилища и Озера неро	571
<b>Соколова А.С., Микряков В.Р., Елизарова Н.В.</b> Некоторые иммунофизиологические показатели мидий <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarck, 1819) Черного моря	578



# **ПРОБЛЕМЫ ПАТОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ И ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ РЫБ И ДРУГИХ ГИДРОБИОНТОВ**

*Расширенные материалы  
IV Международной конференции*

Подписано в печать 15.09.15. Формат 60х90 1/16.  
Усл. печ.л. 36,75. Тираж 200 экз. Заказ № 15140.

Отпечатано с готового оригинал-макета  
в типографии ООО «Филигрань»  
150049, г. Ярославль, ул. Свободы, д. 91,  
[pchataet@bk.ru](mailto:pchataet@bk.ru)