

УДК [591.1 + 574.2](57.033)

*В. Д. Романенко, В. І. Юришинець, О. С. Потрохов,
О. Г. Зіньковський*

**ОСОБЛИВОСТІ ФІЗИОЛОГО-БІОХІМІЧНИХ
ВЗАЄМОДІЙ У СИМБІОТИЧНИХ УГРУПОВАННЯХ
ПРІСНОВОДНИХ РИБ ЗА ДІЇ СПОЛУК
НЕОРГАНІЧНОГО АЗОТУ**

Досліджено метаболічні процеси у корошових риб за різного характеру та ступеня інвазії облигатними симбіонтами — екто- та ендопаразитами в умовах фонових показників гідрохімічного режиму і за підвищеного вмісту екзогенних сполук неорганічного азоту. Встановлено суттєві відмінності у гормональній регуляції метаболізму та ферментативній активності різних тканин гідробіонтів за різного ендогенного (паразити) та екзогенного (токсиканти) впливу.

Ключові слова: фізіолого-біохімічна взаємодія, кортизол, корошові риби, симбіонти, паразити.

Забруднення водного середовища токсичними речовинами є глобальним процесом, який останніми десятиліттями охопив усі морські і континентальні водойми світу. Цей процес зумовлений повсюдною індустріалізацією, урбанізацією, хімізацією сільського господарства, використанням сотень тисяч нових хімічних продуктів, які потрапляють у навколишнє середовище. Токсичні речовини бувають природного походження (екзометаболіти, токсини різної природи) та синтезовані людиною — ксенобіотики [5].

У токсичному середовищі відбуваються зміни метаболізму як хазяїна, так і його симбіонтів (включно з паразитами). Особливості реакції паразитів на токсичний вплив пов'язані з різним ступенем опосередкованості токсичного впливу залежно від їх локалізації та метаболізму [7]. Більшість гідробіологічних та екологічних досліджень не враховує той факт, що значна частка особин будь-якого виду гідробіонтів є носієм різних симбіонтів, включно з паразитами і патогенними організмами, які суттєво трансформують метаболізм та адаптаційний потенціал хазяїв [8].

Симбіотичні угруповання прісноводних гідробіонтів у екосистемах сучасних водних об'єктів зазнають постійного впливу комплексу абіотичних і

© В. Д. Романенко, В. І. Юришинець, О. С. Потрохов, О. Г. Зіньковський, 2015

біотичних чинників природного (зокрема, кліматичних змін) та антропогенного походження.

Сполуки азоту як одного з найважливіших біогенних елементів зазвичай розглядаються як одна з причин евтрофікації водойм. Однак за деяких умов вони відіграють роль токсикантів, що суттєво впливають на біоту та екосистеми водойм.

Деякі водойми дендрологічного парку «Олександрія» виявилися природними модельними об'єктами для своєрідного експерименту. У каскад ставків потрапляє джерельна вода з надмірним вмістом сполук неорганічного азоту, внаслідок чого у водному середовищі концентрація цих сполук перевищує ГДК у сотні разів (N-NH_4^+ — 50—320 мг/дм³, N-NO_2^- — 0,08—6,0 мг/дм³). Гідробіоти та їх угруповання у цих водоймах виробили сукупність пристосувань до цих умов, а саме структурно-функціональні перебудови бактеріопланктону та бактеріобентосу, зменшення видового різноманіття і чисельності фіто- та зоопланктону, морфо-функціональні перебудови в організмі риб тощо [3, 6].

Для порівняння впливу різних концентрацій сполук азоту на симбіоценози гідробіотів у системі каскадних ставків дендропарку «Олександрія» нами було проведено паразитологічні дослідження риб у водних об'єктах з різним рівнем навантаження цими сполуками.

З метою з'ясування питання щодо впливу видового і чисельного складу симбіоценозу на метаболізм та адаптаційний потенціал гідробіотів досліджувались метаболічні процеси у риб за різного характеру та ступеня інвазії облигатними симбіонтами — екто- та ендопаразитами. Фізіолого-біохімічні показники вивчали як в умовах фонових показників гідрохімічного режиму, так і за наявності у водному середовищі підвищеного вмісту екзогенних сполук неорганічного азоту.

Матеріал і методика досліджень. В умовах Білоцерківської експериментальної гідробіологічної станції досліджували корошових риб (короп звичайний, карась сріблястий, білий амур, білий товстолобик) віком від одного до п'яти років у ставках з різним вмістом сполук неорганічного (зокрема, амонійного) азоту. Фонова концентрація становила 0,05—0,5 мг N/дм³, у водоймі з високою концентрацією — 20—60 мг N/дм³ (NH_4^+ — понад 50, NO_2^- — понад 8, NO_3^- — понад 80 мг/дм³).

У зв'язку з тим, що водойми відрізнялися за гідрохімічними характеристиками через надходження до частини ставків води з надмірним вмістом сполук неорганічного азоту, одночасно вивчали залежність між гідрохімічним складом води та показниками інвазії риб і метаболічні взаємодії всередині симбіоценозу за токсичної дії та за її відсутності.

Піддослідних риб було умовно поділено на три групи: 1) вільні від інвазії; 2) з ектопаразитами: інфузоріями, моногеніями та паразитичними ракоподібними на зябрах і поверхні тіла; 3) з ендопаразитами: цестодами у кишечнику, нематодами у порожнині тіла.

1. Умовний поділ риб на групи за інтенсивністю інвазії паразитами (екз/особ.)

| Групи паразитів | Інтенсивність інвазії | |
|-------------------------|-----------------------|--------|
| | низька | висока |
| Ектопаразити* | | |
| Інфузорії | 1—10 | > 10 |
| Моногенії | 1—5 | > 5 |
| Паразитичні ракоподібні | 1—2 | > 2 |
| Ендопаразити | | |
| Цестоди** | 1—4 | 1—50 |
| Нематоди | 1—5 | > 5 |

* Кількість в одній напівязьбі; ** ступінь інвазії залежить від розмірів (маси) паразитів.

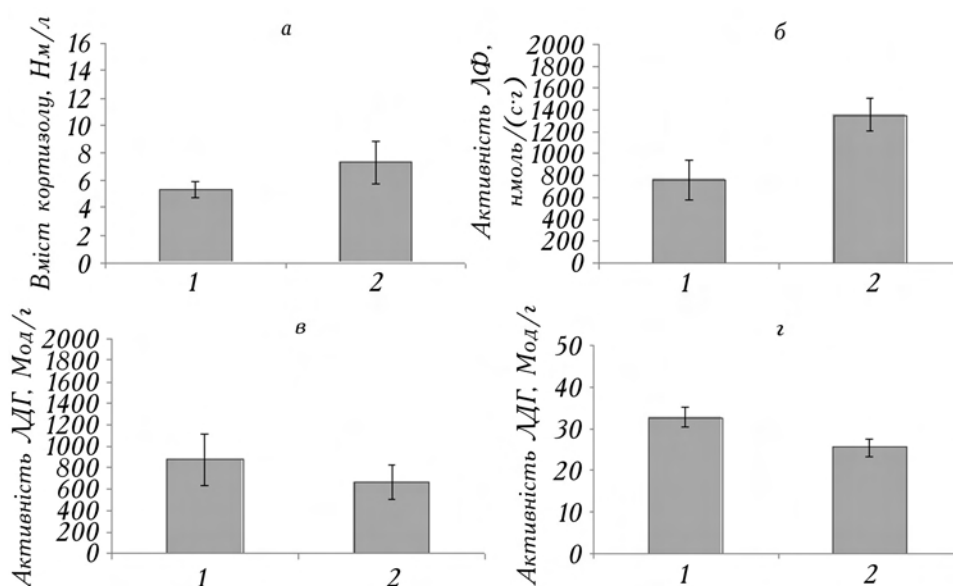
Для узагальнення результатів дослідження інтенсивність інвазії паразитами вважали низькою або високою за сукупною або окремою присутністю певної кількості екто- чи ендопаразитів (табл. 1).

Біохімічні дослідження виконували із застосуванням стандартних методик [4]. Активність лужної фосфатази (ЛФ) (КФ 3.1.3.1) та лактатдегідрогенази (ЛДГ) (КФ 1.1.1.27) встановлювали з використанням наборів реактивів «Лужна фосфатаза» і «ЛДГ» (Філісіт-Діагностика, Україна). Вміст кортизолу визначали у плазмі крові та інших тканинах, використовуючи імуноферментний аналізатор (Rayto RT-2100С) і комерційні набори «ДС-ІФА-Стероїд» (НПО «Диагностические Системы», Росія). Вміст імуноглобулінів визначали імуноферментним методом за допомогою стандартного набору реагентів «Ig A, M, G» (НВЛ Гранум). Статистичну обробку проводили методами дисперсійного аналізу із застосуванням програми Statistica 8.0.

Результати досліджень та їх обговорення

Іхтіопаразитологічні дослідження водойми, яка зазнає впливу високого вмісту сполук неорганічного азоту (20—60 мг N/дм³), і у якій мешкали особини білого товстолобика, білого амура, коропа звичайного, карася сріблястого та амурського чебачка показали, що видовий склад симбіонтів протягом вегетаційного періоду не відрізнявся від такого водойм, що характеризувались фоновими гідрохімічними показниками (0,05—0,5 мг N/дм³). Були виявлені паразитичні інфузорії, моногенії, трематоди (метацеркарії), цестоди, паразитичні ракоподібні. Відмінності спостерігались переважно у показниках інвазії популяцій окремих видів риб і розподілі паразитів у різних вікових групах.

Показники інвазії у водоймі з вищим вмістом сполук азоту збільшувались у інфузорій родини Trichodinidae та у деякі сезони — у цестод *Bothriocapalus acheilognathi* Yamaguti.



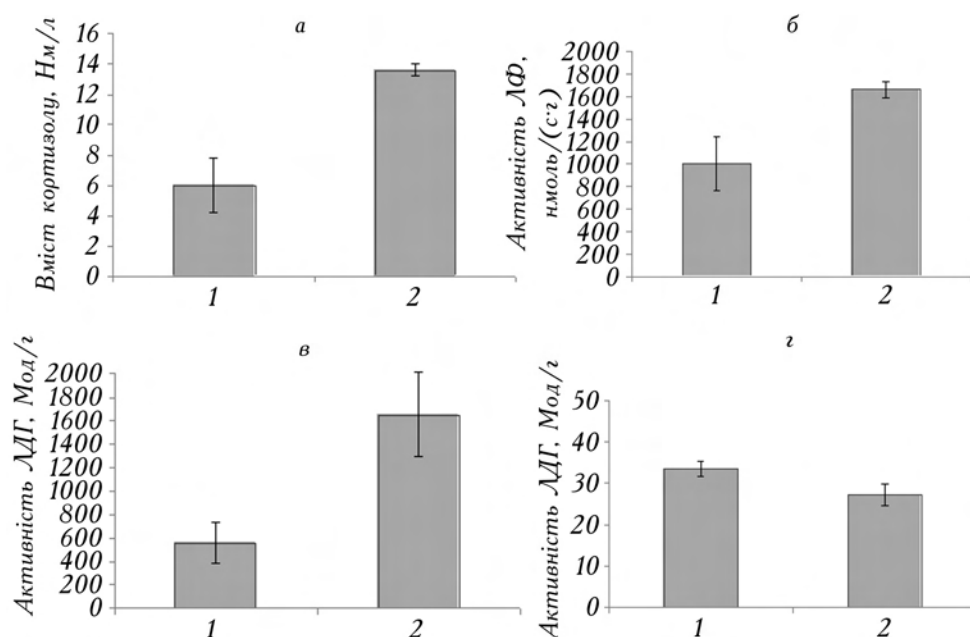
1. Вміст кортизолу (а), активність ЛФ (б) і ЛДГ (в) у плазмі крові та активність ЛДГ у зябрах (г) риб та за дії ектопаразитів (висока ІІ). Тут і на рис 2—4: 1 — незаражені, 2 — заражені.

Найбільш чутливими до впливу сполук екзогенного азоту виявилися моногеней р. *Dactylogyrus* та паразитичні копеподи р. *Ergasilus*. Під час досліджень восени 2011 р. білий амур і білий товстолобик були повністю вільними від інвазії цими паразитами у водоймі з підвищеним вмістом, тоді як у контрольній водоймі екстенсивність інвазії (ЕІ) досягала 60—80%, а інтенсивність інвазії (ІІ) моногенейми та копеподами — відповідно 1—5 та 1—15 екз/особ. Подібна тенденція спостерігалась і протягом вегетаційного періоду: у водоймі з вищим вмістом сполук азоту значення ЕІ цими групами паразитів не перевищувало 20—40%, а ІІ — 1—5 екз/особ.

Значний ступінь інвазії ектопаразитами призводив до зростання вмісту кортизолу — гормону стресу, який відповідає за пролонговану гуморальну регуляцію обміну речовин. Також зростала активність ЛФ у плазмі крові і знижувалась активність ЛДГ у плазмі і тканинах (зябра). Зміни активності ферментів можуть бути пов'язані як із стресовим впливом ектопаразитів та регуляцією глікоконезису, так і з розвитком запального процесу, якому сприяє інвазія ектопаразитами (рис. 1).

За додаткового впливу сполук неорганічного азоту суттєво зростав вміст кортизолу та активність ЛФ. Токсиканти були додатковим стресовим чинником. У плазмі крові зростала також активність ЛДГ (рис. 2).

За значних показників інвазії ектопаразитами на тлі зростання вмісту кортизолу ферментативна активність у плазмі крові риб знижувалась, що може бути ілюстрацією своєрідного маскування наявності ектопаразитів, які, споживаючи поживні речовини у кишечнику, розкладають їх гліколітичним шляхом (рис. 3).

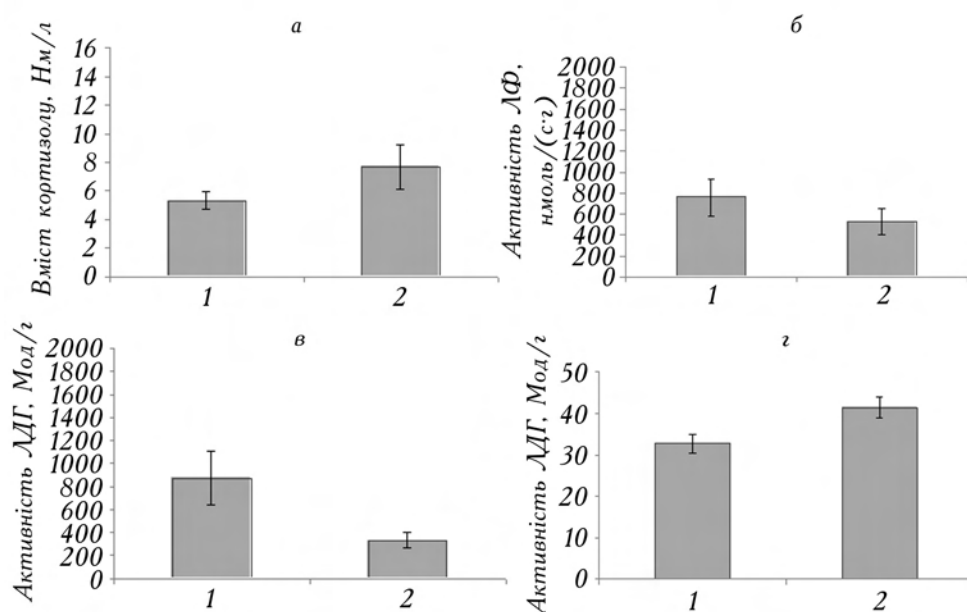


2. Вміст кортизолу (а), активність ЛФ (б) і ЛДГ (в) у плазмі крові та активність ЛДГ у крові і зябрах (г) риби за сумісної дії ектопаразитів (висока П) і сполук неорганічного азоту.

За підвищеного вмісту екзогенних сполук неорганічного азоту вміст кортизолу у плазмі крові суттєво зростає як у незаражених, так і інвазованих ектопаразитами риб, що є проявом стресової реакції. Активність ЛДГ у плазмі крові знижувалась, як і у риб з водойми з фоновими показниками гідрохімічного режиму (рис. 4). Вміст кортизолу та активність ЛФ у незаражених та інвазованих цестодами риб достовірно не відрізнявся.

У процесі співіснування риб з паразитами виробляються відповідні імунні реакції, пов'язані з тривалою взаємодією організму хазяїна з паразитами, які відрізняються локалізацією, кількістю, способом живлення та таксономічною належністю.

Достовірна реєстрація у риб *IgM*, який за будовою подібний до відповідного імуноглобуліну ссавців [9], дозволила нам використати для кількісної оцінки вмісту антитіл методи імуноферментного аналізу, що застосовуються в імунології людини. Було підтверджено наявність агентів специфічного гуморального імунітету — імуноглобулінів як у плазмі крові досліджених риб, так і в тканинах, які безпосередньо контактують з оточуючим середовищем — зябрах і покриттях. Відомо, що *IgM* відповідає за перші етапи формування імунної відповіді і не є вузько специфічним [2, 9]. У риб він виробляється у шкірі для запобігання бактеріальним інфекціям. Ектопаразити, пошкоджуючи шкіру та зябра, сприяють виникненню вторинних інфекцій, однак достовірні відмінності у вмісті *IgM* були виявлені лише за дії сполук азоту (рис. 5).

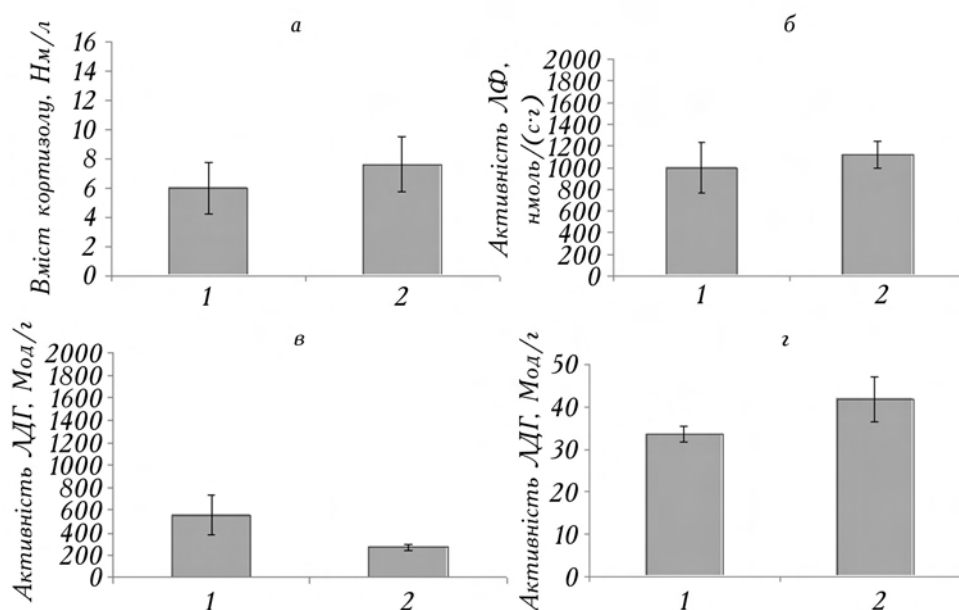


3. Вміст кортизолу (а), активність ЛФ (б) і ЛДГ (в) у плазмі крові та активність ЛДГ у зябрах (г) риб за дії ендопаразитів (висока II).

Дослідження різних рівнів регуляції метаболізму та імунної протидії у симбіоценозах риб показало, що хазяї та їх симбіонти взаємодіють, виробляючи адаптації до змін умов існування. Про це свідчать виявлені відмінності у гормональних і клітинних механізмах регуляції метаболізму риб за різного складу симбіотичного угруповання та впливу токсикантів.

Імунологічні і біохімічні показники дозволяють пояснити як взаємодію всередині симбіотичного угруповання, так і реакцію хазяїна та його симбіонтів на дію чинників водного середовища. Відомо, що системи регуляції обміну речовин і функцій організму утворюють три ієрархічних рівні: центральна нервова система, ендокринна система, внутрішньоклітинні механізми (активність та кількість ферментів, мембранний транспорт) [2]. Узгоджена дія трьох рівнів регуляції обміну речовин забезпечує адекватну реакцію біологічної системи на вплив зовнішніх і внутрішніх чинників. Однак ці реакції організму відрізняються залежно від ступеня дії екологічних чинників і структурно-функціональних характеристик біологічної системи, до яких належить також структура та кількісні показники симбіотичного угруповання. Ці особливості є ще одним аспектом, який характеризує індивідуальну (модифікаційну) мінливість.

Інтегруючими регуляторами, які пов'язують різні регуляторні механізми та метаболізм у різних органах, є гормони. Вони виконують роль хімічних посередників, які переносять сигнали, що виникають в різних органах та ЦНС. Якщо розглядати співіснування паразитів і хазяїна як антагоністичну



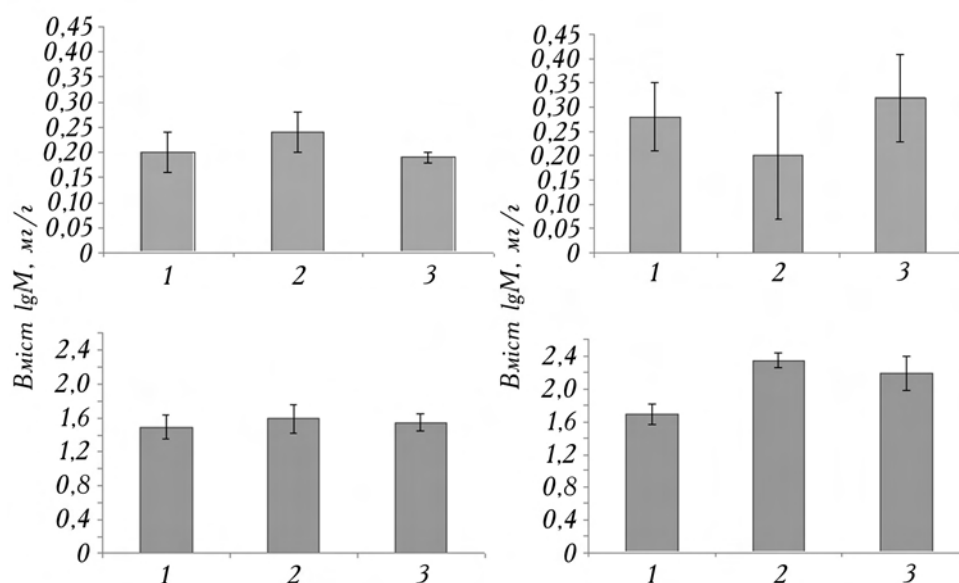
4. Вміст кортизолу (а), активність ЛФ (б) і ЛДГ (в) у плазмі крові та активність ЛДГ у крові і зябрах (г) риб за сумісної дії ендопаразитів (висока II) і сполук неорганічного азоту.

взаємодію, то інтегральним показником, що відображає реакцію хазяїна на зараження різними паразитами, може бути вміст кортизолу.

Відомо, що ектопаразити (інфузорії, моногенії, паразитичні копеподи), пошкоджуючи тканини покривів, сприяють розвитку вторинних бактеріальних і вірусних інфекцій у риб [7]. Тому зареєстроване нами зростання вмісту кортизолу, який є не лише гормоном стресу, а бере участь у регулюванні запального процесу, може бути викликане як стресовим впливом сполук азоту, так і впливом ектопаразитів разом із вторинною бактеріальною інфекцією.

Кортизол є регулятором вуглеводного обміну організму і бере участь у розвитку стресових реакцій. Потрапивши у кров, він досягає клітин — мішеней (зокрема, клітин гепатопанкреасу). Завдяки своїй ліпофільній природі цей гормон легко проникає через клітинну мембрану у цитоплазму і ядро, де зв'язується зі специфічними рецепторами. Гормон-рецепторний комплекс є чинником транскрипції — активує транскрипцію певних ділянок ДНК. У результаті синтез глюкози у гепатоцитах посилюється, тоді як у м'язах знижується її розпад. Таким чином, ефект кортизолу полягає у збереженні енергетичних ресурсів організму шляхом активації глюконеогенезу, який відновлює у крові вміст глюкози та жирних кислот, втрачених після симпатико-адреналової накачки [2].

Відомо [2], що за принципом негативної зворотної регуляції підвищення рівня кортизолу в крові знижує секрецію кортиколиберіна (а значить, і аде-



5. Вміст *IgM* у плазмі (а) та покритках (б) риби за впливу ектопаразитів та сполук неорганічного азоту: 1 — незаражені; 2 — низька II; 3 — висока II.

нокортикотропного гормону). Надлишкова продукція кортизолу при збитому впливі стрес-факторів призводить до небажаних наслідків, оскільки переводить стадію резистентності у стадію виснаження. У цих умовах лейкоцити і лімфатична система в цілому атрофуються, через те що білки, які утворюють білі клітини крові і лімфоїдні структури, використовуються у процесі глікоонегенезу. Результатом є різке ослаблення захисних реакцій організму і розвиток вторинних патологій з інфекційним початком. Останнє знаходить сприятливий ґрунт в організмі, який зазнає стресу, на тлі виникаючих геморагічних змін (виразки шлунково-кишкового тракту, зябрового апарату, плавців) [2].

Можливо, значна смертність молодих особин корошових риби унаслідок ботріоцефальозу викликається як впливом паразитів (споживання поживних речовин, виділення токсинів), так і збитим стресом, який супроводжується підвищеним вмістом кортизолу та індукованою ним зміною метаболізму.

У вищих тварин активність ЛФ у крові знижується після гіпофізектомії, кастрації, а також у результаті застосування препаратів кортикостероїдних гормонів [2]. Фактори, які викликають стрес, сприяють збільшенню активності ЛФ у лейкоцитах. Відмічено також зростання її активності в усіх органах корошових риби, заражених інфузоріями та моногеніями. Особливо відчутним (на 93—96%) воно було у плазмі крові [7]. Це підтверджують і результати наших досліджень.

Відзначається, що при високій інтенсивності зараженості ектопаразитами (інфузоріями та моногеніями) адаптаційні зміни фізіолого-біохімічних процесів певний час здатні підтримувати рівновагу у паразито-хазяїнній системі, однак ця рівновага не може бути тривалою і часто її порушення призводить до загибелі риб (особливо молоді) [7]. У результаті зараження та розвитку інвазії ектопаразитами, реакція риб відповідає механізмам загального адаптивного синдрому, який виникає в результаті дії стрес-фактора [1].

У наших дослідженнях за сукупної дії двох стресових чинників (ектопаразити та сполуки азоту) синергічного підвищення активності ферменту не відбувалось, а дія токсиканту викликала більш генералізовану реакцію організму риб, яка у всіх варіантах проявлялась підвищенням активності ЛФ у плазмі крові.

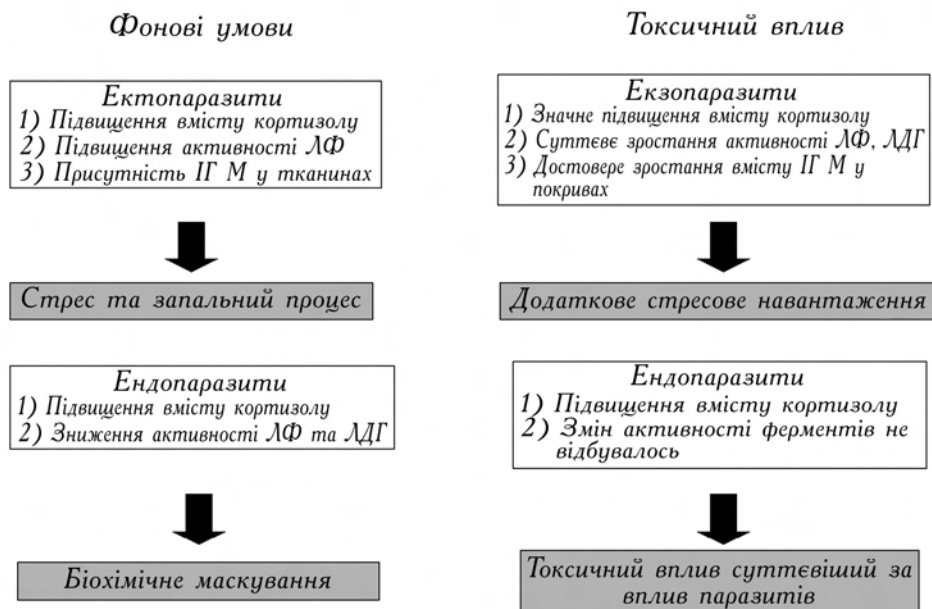
Як зазначалось, у вищих хребетних активність фосфатаз знижувалась у відповідь на зростання вмісту кортикостероїдів. Кореляційний аналіз наших результатів показав існування позитивного зв'язку між вмістом кортизолу та активністю ЛФ ($r = 0,87$) у плазмі крові незаражених риб. Якщо розглядати сукупну вибірку заражених риб, то корелятивний зв'язок між цими двома показниками був відсутнім. Незначний негативний зв'язок ($r = -0,23$) відмічений при значній II цестодами, а позитивний ($r = 0,81$) — при інвазії риб значною кількістю нематод *Sinichthionema*, які локалізуються у порожнині тіла білих амурів.

Зміни активності ЛДГ за сукупної токсичної дії сполук азоту та ектопаразитів (підвищення) і ендопаразитів (зниження) можна розглядати як результат гуморальної регуляції глюконеогенезу в умовах комплексної стресової реакції.

Агентом специфічної гуморальної імунної відповіді у хребетних є антитіло до певного антигену, яке продукується трансформованим В-лімфоцитом. У риб знайдено два класи імуноглобулінів — *IgM* та *IgG*. Елімінація антигену при дії на нього антитіла відбувається шляхом преципітації розчинених у плазмі антигенів, аглютинації чужерідних клітинних структур, лізису вільних від комплементу антигенів. Крім того, антиген піддається нейтралізації шляхом зв'язування з антитілом. Можлива і опсонізація антигену, тобто утворення комплексу, який легко фагоцитуються макрофагом. Власне захист організму від специфічного антигену виникає тоді, коли лімфоцитами виробляється певна кількість антитіл.

Значна дисперсія значень вмісту *IgM* за впливу сполук неорганічного азоту може ілюструвати розбалансування гуморальних механізмів імунної відповіді на дію токсикантів. Відповідно, різні за структурою симбіотичні системи по-різному взаємодіють з оточуючим середовищем, змінюючи метаболізм, гормональний фон та імунну протидію поширенню та розвитку паразитів і стресовому токсичному впливу (рис. 6).

Фізіолого-біохімічні прояви паразитарної (інфекційної) мінливості, яка полягає у суттєвих відмінностях у гормональній регуляції метаболізму та ферментативній активності різних тканин гідробіонтів за різного ендоген-



6. Схема трансформації фізіолого-хімічних взаємодій у симбіоценозах риб під впливом паразитів і токсикантів.

ного (паразити) та екзогенного (токсиканти) впливу, свідчать про те, що симбіотичні угруповання є додатковим чинником, який визначає адаптаційні можливості гідробіонтів-хазяїв.

Висновки

Між організмом хазяїна та представниками різних груп облигатних симбіонтів існують тісні метаболічні зв'язки та взаємодії, які проявляються на рівні біоенергетичних процесів. Це, зокрема, зміни активності лужної фосфатази та лактатдегідрогенази, ендокринної регуляції стресових реакцій і протизапальних процесів за рахунок підтримання певного рівня вмісту кортизолу у тканинах, імунної відповіді шляхом синтезу імуноглобуліну М.

Сполуки неорганічного азоту впливають на структуру симбіоценозів риб шляхом безпосередньої дії на симбіонтів, змінюючи їх чисельність і видове багатство, та опосередкованої — на організм хазяїна, який перебудовує свій метаболізм, трансформуючи умови існування симбіонтів.

Дія токсикантів модифікує вплив паразитів на метаболізм хазяїв, змінюючи їх адаптаційні можливості. Різні за видовим складом та інтенсивністю інвазії симбіотичні системи по-різному пристосовуються до дії токсикантів, які відіграють роль додаткового стрес-фактора.

**

Исследования метаболических процессов у карповых рыб с различной степенью инвазии облигатными симбионтами — экто- и эндопаразитами в условиях фоновых показателей гидрохимического режима и при повышенном содержании экзогенных соединений неорганического азота показали существенные различия в гормональной регуляции метаболизма и ферментативной активности различных тканей гидробионтов при различном эндогенном (паразиты) и экзогенном (токсиканты) воздействии.

**

The investigations of metabolic processes in carp fishes with different intensity of infection by obligate symbionts — ecto- and endoparasites under normal hydrochemical regime and high concentration of inorganic nitrogen compounds showed significant differences in hormonal regulation of metabolism and enzymatic activity of various tissues of the aquatic organisms under different endogenous (parasites) and exogenous (toxicant) influence.

**

1. Вегемеер Г. А. Стресс и болезни рыб. — М., 1981. — 150 с.
2. Иванов А. А. Физиология рыб. — М.: Мир, 2003. — 284 с.
3. Красюк Ю. М. Токсикорезистентність корошових видів риб до дії сполук неорганічного азоту: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2011. — 21 с.
4. Практикум по биохимии: Учеб. пособие / Под. ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. — 509 с.
5. Романенко В. Д. Основы гидроэкологии. — Киев: Генеза, 2004. — 664 с.
6. Старосила Е. В., Олейник Г. Н., Крот Ю. Г. Структурные параметры бактериопланктона в прудах с высоким содержанием минерального азота // Гидробиол. журн. — 2007. — Т. 43, № 3. — С. 94—104.
7. Экология паразитов рыб водоемов Украины / О. Н. Давыдов, С. И. Неборачек, Л. Я. Куровская, В. Н. Лысенко. — Киев, 2011. — 492 с.
8. Combes C. Ekologia i ewolucja pasozytnictwa. Dlugotrwałe oddziaływanie. — Warszawa: Wydawnictwo naukowe PWN, 1999. — 628 p.
9. Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. Immunobiology. — 5th ed. — Garland Publ., 2001. — ISBN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/>).