

УДК 546.17:(612.453:597.551.2)

В. Д. Романенко, А. С. Потрохов, О. Г. Зиньковский

**ГОРМОНАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ
ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ АДАПТАЦИИ РЫБ К
ВОЗДЕЙСТВИЮ МИНЕРАЛЬНОГО АЗОТА**

Установлено, что кортизол является важной составляющей в цепи развития механизмов адаптации рыб к действию высоких концентраций соединений аллохтонного азота. Отмечены сезонные изменения его содержания в плазме крови. При высоком количестве кортизола в крови наблюдается активация метаболизма рыб, требующая значительных затрат энергоресурсов организма. В период активной детоксикации и выведения избыточного аммиака из организма содержание кортизола у рыб возрастает в 1,5—8,9 раза по сравнению с контролем.

Ключевые слова: карп, кортизол, аллохтонный азот, адаптация.

Рыбы как в естественных условиях, так и при их искусственном выращивании зачастую подвергаются стрессовым факторам различной природы. В процессе адаптации рыб к изменениям факторов среды важная роль принадлежит нейрогуморальному механизму регуляции обмена веществ. При этом отмечается активация синтеза стрессовых гормонов, в частности пролактина, соматотропина, адренокортикотропных гормонов [12, 13, 17, 18, 21, 23].

Среди стрессовых гормонов в процессах энергообеспечения адаптации рыб существенное значение имеет кортизол. У рыб он синтезируется в корковом веществе (интерреналовой ткани) надпочечников, не образующих единого органа [1]. Кортизол является основным гормоном стресса, уровень содержания которого существенно меняется при изменении факторов среды. Быстрый его выброс в плазму крови во время стресса способствует возврату организма в состояние гомеостаза [5, 6, 14, 24, 26].

Согласно литературным данным содержание кортизола в плазме крови рыб в разные сезоны и под действием различных факторов среды колеблется от 0,7 до 800,0 нг/дм³ [16, 18, 19, 23], в частности у карпа — от 20,0 до 434,0 нг/дм³ [17, 25].

Целью данной работы было выяснить влияние высоких концентраций аллохтонного азота (9—62 ПДК по ионам аммония) на уровень содержания кортизола, аммиака, белков и липидов в плазме крови карпа в различные се-

© Романенко В. Д., Потрохов А. С., Зиньковский О. Г., 2010

зоны года в условиях двухлетнего пребывания рыб в загрязненных водоемах.

Материал и методика исследований. Эксперименты проведены на Белоцерковской экспериментальной гидробиологической станции Института гидробиологии НАН Украины. В хронических (2 года) экспериментах использовали карпов (стартовый возраст 3—4 года). Рыбы были расселены в три пруда площадью 0,04 га со средней глубиной 1,2 м. Содержание минерального азота в воде контрольного пруда (№ 1) составляло: аммонийного — 0,088—0,243, нитритного — 0,003—0,010 и нитратного — 0,10—0,28 мг N/дм³. В опытных водоемах № 2 и 3 концентрация аммонийного весной равнялась соответственно 9,1—21,5 и 13,6—26,5, летом — 13,7—35,7 и 15,0—65,4, осенью — 29,2—42,5 и 27,9—62,2 мг N/дм³. Содержание нитритов в опытных прудах составляло весной 0,99—1,46, летом — 1,75—3,27, осенью — 0,32—1,83 мг N/дм³, нитратов за весь период наблюдения — 6,27—21,61 мг N/дм³ [3, 8]. Общая минерализация воды по сухому остатку в среднем была равной 341,0 мг/дм³ (пруд № 1), 1256,0 мг/дм³ (№ 2), 1197,0 мг/дм³ (№ 3).

После адаптации рыб в течение одного года образцы их плазмы крови для проведения дальнейших биохимических исследований были отобраны в начале апреля, июле и середине октября. Плазму крови фиксировали метиловым спиртом в соотношении 3 : 7.

Содержание кортизола определяли колориметрическим методом с помощью реакции с 2,4-динитрофенилгидрозином [15]. В реакционную смесь входили 0,10%-ный раствор 2,4-динитрофенилгидразина с концентрированной соляной кислотой в соотношении 1 : 3 (0,5 мл) и 0,5 мл фиксированного образца. После прохождения реакции при температуре 59°C в течение 90 мин добавляли 0,5 мл 0,4 молярного раствора NaOH и 5,0 мл метанола. Через 20 мин содержание кортизола измеряли на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 470 нм.

Для выяснения доли кортизола в общем содержании всех 17-кетостероидов в плазме крови рыб проводили двухмерную хроматографию ее экстрактов на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ 15×15 в сравнении со стандартным раствором кортизола [10]. Подготовку экстрактов проводили следующим образом. В метаноловую вытяжку из образца (0,3 мл) вносили 0,1 мл 0,4 молярного раствора NaOH для гидролиза связанных с белками форм кортизола в течение 30 мин при активном встряхивании. Затем кортизол повторно экстрагировали в 0,3 мл толуола. Для тонкослойной хроматографии применяли следующие системы растворителей: I — хлороформ — этанол (95 : 5); II — эфир — бензол — ацетон (50 : 30 : 20). После хроматографической очистки количество кортизола определяли вышеуказанным методом.

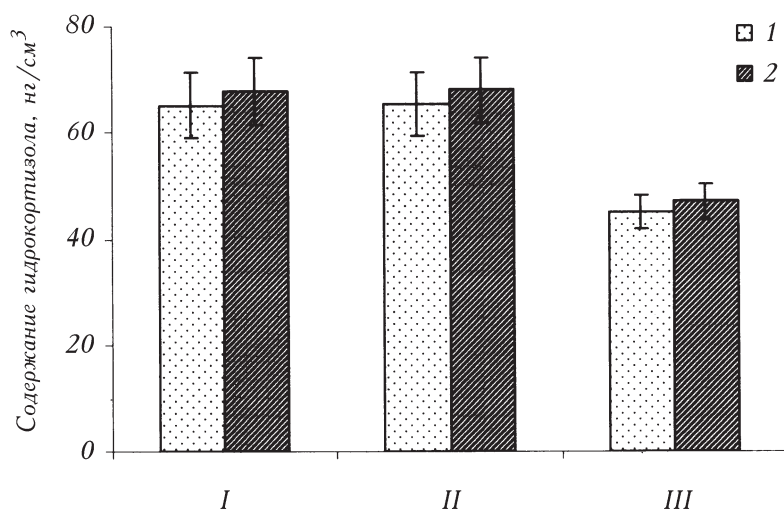
Содержание общих белков определяли по Лоури [9]. Содержание аммиака в тканях определяли по Львову [4], липидов — с помощью сульфо-фосфор-ванилинового реактива [20]. Полученные данные обработаны статистически с помощью программы Statistica 5.5.

Результаты исследований и их обсуждение

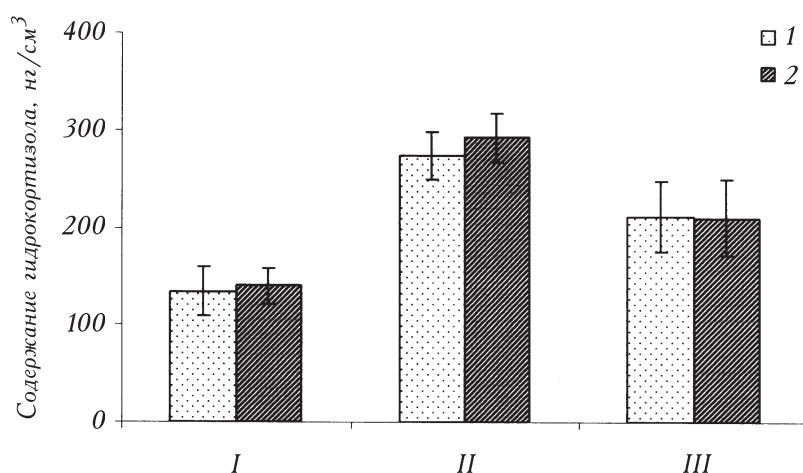
Тонкослойная хроматография экстрактов стероидных гормонов показала, что в плазме крови рыб в основном присутствует фракция кортизола, лишь иногда — незначительное количество других кетостероидов. Таким образом, предварительная очистка вытяжек кортизола из плазмы рыб несущественным образом сказывалась на его общем содержании, определенном прямым колориметрированием. Дополнительная хроматографическая очистка несколько (на 4,2—6,2%) уменьшает содержание кортизола по сравнению с его суммарным количеством, полученным при прямом определении с помощью реакции с 2,4-динитрофенилгидрозином (рис. 1). Причиной этого является удаление минорных фракций кетостероидов. При этом общая закономерность изменения данного показателя под действием аллохтонного азота сохранялась. В результате был сделан вывод, что эти два метода взаимозаменяемы, определение кортизола ими вполне корректно и сопоставимо.

Как показали наши исследования, весной, после зимовки рыб, количество кортизола в плазме крови карпов, подвергавшихся действию наибольшего содержания различных форм минерального азота, было на 44,5% ниже, чем у контрольных особей (рис. 1). Отмечена обратная зависимость между концентрацией ионов аммония в воде и содержанием кортизола в крови ($r = -0,74$). В низкотемпературных условиях, когда замедляется активность ферментативных процессов, в частности систем обмена азотистых соединений, нами отмечено существенное угнетение энергоемких процессов у подопытных рыб и рост содержания аммиака в плазме крови [11]. По-видимому, в сложившихся неблагоприятных условиях активность метаболизма рыб подавлена, благодаря чему контакт с внешней средой, содержащей токсические вещества, снижается, и энергетические потребности рыб обеспечиваются за счет гликолиза и катаболизма белков [11]. К концу зимовки у подопытных рыб заметно сокращается объем крови, а общее содержание белков в ее плазме уменьшается в 1,5—2,0 раза по сравнению с контрольным. Снижение содержания кортизола в крови в холодное время года дополнительно подтверждает способность рыб под действием токсической нагрузки использовать в качестве основного адаптивного механизма максимальное ингибирование метаболических процессов. При этом кортизол играет существенную роль в регулировании направленности и активности обменных процессов в их организме.

С повышением температуры воды до 25—28°C количество кортизола в плазме крови контрольных рыб повышается в 2,0 раза, что свидетельствует о возрастании общей активности метаболических процессов. При токсической нагрузке содержание кортизола было еще выше. Обращает на себя внимание тот факт, что максимальное его количество наблюдалось при концентрации минерального азота 10—20 ПДК. Содержание кортизола в плазме крови этих рыб было в 2,1 раза выше, чем в контроле (рис. 2). При выращивании рыб в воде с более высокой концентрацией аммонийного азота (20—30 ПДК) содержание кортизола в их крови повышалось на 51,2% по сравнению с контролем. Нами отмечена прямая зависимость между содержанием ионов аммония в воде и количеством кортизола в плазме крови карпа ($r = 0,71$).

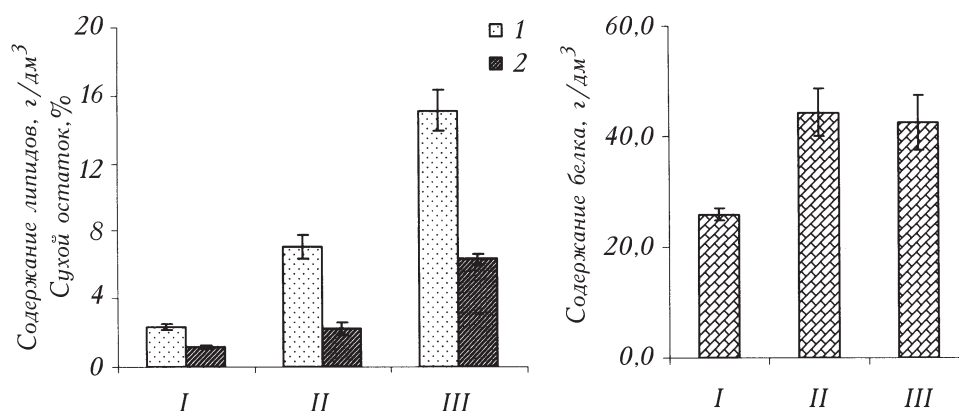


1. Содержание кортизола в плазме крови карпа весной ($n = 7$). Здесь и на рис. 2: 1 — после ТСХ-очистки; 2 — прямое колориметрирование. Здесь и на рис. 2—4: I, II и III — пруды № 1, 2 и 3.



2. Содержание кортизола в плазме крови карпа летом ($n = 7$).

В связи с активацией сложных метаболических процессов, связанных с детоксикацией и выведением избыточного аммиака, а также благодаря повышенному содержанию кортизола в плазме крови существенно меняется ее биохимический состав. Так, в зависимости от роста содержания аллотонного азота резко увеличивается количество общих липидов (в 3,0—6,0 раза по сравнению с контролем), сухого остатка в плазме (в 1,9—5,4 раза) и белков (на 64,5—71,0%) (рис. 3). Все это свидетельствует об активном противодействии рыб на биохимическом уровне негативному влиянию азотистых соединений, поступающих в их организм из окружающей среды. При этом отмечают прямые корреляционные зависимости между концентрацией аммонийного азота и содержанием в плазме крови рыб общих липидов ($r =$



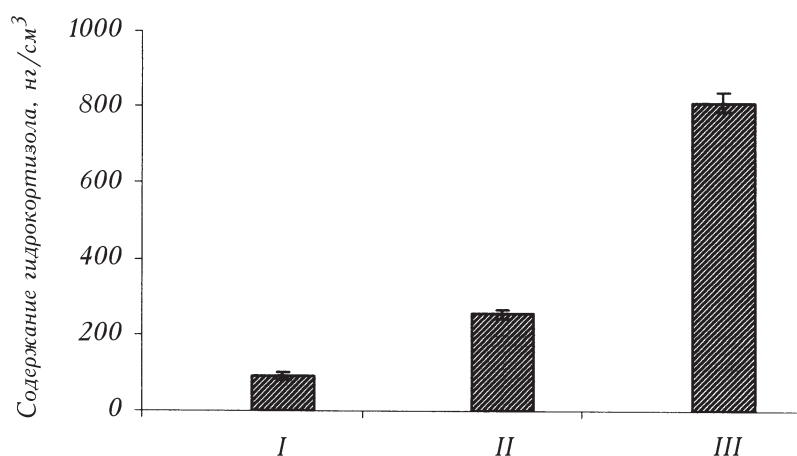
3. Биохимический состав плазмы крови карпа летом ($n = 7$): 1 — липиды; 2 — сухой остаток.

0,94), сухого остатка ($r = 0,86$) и общих белков ($r = 0,92$). В то же время прямая зависимость выявлена только между количеством кортизола в плазме и содержанием общих белков ($r = 0,93$).

Параллельно у подопытных рыб наблюдали возрастание активности тканевых ферментов, скорости выведения из организма азотистых соединений, снижение содержания аммиака в крови и железистом эпителии жабр [11]. Таким образом, в ответ на действие соединений минерального азота в вегетационный период наблюдалось развитие иного, отличного от холодноводного, направления адаптивных механизмов. Для него характерен рост активности метаболических процессов, направленных на противодействие токсическому влиянию факторов среды. Летом адаптивные реакции организма приводили к повышению индекса селезенки и темпов роста карпа [8]. Об успешности противодействия аллохтонному азоту свидетельствует и отсутствие статистически достоверной разницы в содержании аммиака в плазме крови подопытных и контрольных групп рыб.

Известно, что в ответ на действие стрессовых факторов среды в крови рыб повышается содержание не только кортизола, но и соматотропина [21]. Кроме специфического ответа на стресс, соматотропин также способствует адаптации рыб к более высокой минерализации воды [22], вызывая развитие и дифференциацию хлоридных клеток. Общая минерализация воды в опытных прудах была в 3,5—3,7 раза выше, чем в контрольном водоеме.

Можно предположить, что благодаря более высокой интенсивности метаболизма у подопытных рыб, в регулировании которого непосредственное участие принимают кортизол и соматотропин, а также в силу улучшения условий питания, благодаря росту биомассы кормовых объектов, и были отмечены более высокие темпы роста под действием повышенных концентраций аллохтонного азота. Высокий, по сравнению с контролем, индекс селезенки, в свою очередь, обусловлен постоянно повышенным содержанием кортизола, который, как известно, стимулирует активность иммунокомпетентных органов, в частности вызывает рост этого индекса [7].



4. Содержание кортизола в плазме крови карпа осенью ($n = 7$).

Осенью, по мере снижения температуры воды, содержание кортизола в плазме крови контрольных рыб постепенно уменьшается до его весенних значений (рис. 4). Напротив, у подопытных рыб его количество продолжает расти, причем четко соблюдается зависимость между суммарной концентрацией различных форм минерального азота и содержанием кортизола в плазме. При концентрации ионов аммония в воде $0,2 \text{ мг/дм}^3$ количество кортизола в плазме крови составляло $91,0 \text{ нг/мл}$, $25\text{—}35 \text{ мг/дм}^3$ — $254,6 \text{ нг/мл}$, $35\text{—}45 \text{ мг/дм}^3$ — $811,7 \text{ нг/мл}$. Коэффициент корреляции (r) между этими показателями равен $0,87$. В то же время содержание белка в плазме крови подопытных карпов снижалось по сравнению с летними показателями, но отличалось от контрольных всего лишь на $8,5\text{—}12,0\%$. Таким образом, в холодное время года роль транспортирующих аммиак белков в адаптационных процессах уменьшается, к весне их количество будет ниже контрольных значений.

У рыб из загрязненных водоемов осенью не наблюдалось замедления активности метаболизма и преобладания процессов синтеза, направленных на накопление энергоёмких веществ. У них продолжается активный обмен веществ, обусловленный противодействием влиянию токсикантов, требующим дополнительных энергетических затрат. В силу этих особенностей метаболизма в органах и тканях не накапливается достаточного количества липидов и гликогена. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в органах подопытных рыб превышает контрольные значения в $2\text{—}3$ раза, что свидетельствует о неравновесном состоянии организма. Сохраняющийся активный метаболизм и высокие энергозатраты изменяют пищевое поведение рыб, они продолжают активно питаться, их линейный рост преобладает над весовым [2].

Заключение

Установлено, что кортизол принимает активное участие и является важной составляющей в цепи развития механизмов адаптации рыб к действию высоких кон-

центраций соединений аллохтонного азота. Отмечены сезонные изменения его содержания в плазме крови.

Весной, при низких температурах воды, количество кортизола в плазме крови минимально, причем при токсической нагрузке содержание циркулирующего в организме гормона понижено.

По мере повышения температуры окружающей среды и при активации метаболических процессов, направленных на детоксикацию и выведение избыточного аммиака из организма, количество кортизола возрастает в 4,3—4,4 раза.

Осенью, при снижении активности метаболизма и подготовке рыб к зимовке, у контрольной группы карпов наблюдается уменьшение содержания кортизола в крови в 1,5 раза. В то же время у подопытных рыб содержание кортизола в плазме крови или остается стабильным, или повышается в 3,9 раза на фоне активного протекания метаболических процессов, требующих значительных энергетических затрат. Выявлена прямая зависимость между концентрацией ионов аммония в воде и количеством кортизола в плазме крови рыб.

**

Встановлено, що кортизол є важливою складовою у розвитку механізмів адаптації риб до дії високих концентрацій алохтонного азоту. Відмічено сезонні зміни його вмісту в плазмі крові. При високій кількості кортизолу в крові спостерігається активація метаболізму риб, яка потребує значних затрат енергоресурсів організму. В період активної детоксикації та екскреції надлишкового аміаку з організму вміст кортизолу у риб зростає в 1,5—8,9 разу порівняно з контролем.

**

It is established that cortisol is an important component in development of mechanisms of fish adaptation to the impact of high concentration of allochthonous nitrogen. Seasonal changes of its content in the blood plasma were noted. At high cortisol content in blood fish metabolism intensifies and needs significant expenses of the energy resources of the organism. During active detoxication and excretion of excess ammonia from the organism, cortisol contents in fish grows 1,5—8,9 times as compared with control.

**

1. Анисимова И.М., Лавровский В.В. Ихтиология. — М.: Высш. шк. — 1983. — 123 с.
2. Зиньковский О.Г., Потрохов А.С., Соломатина В.Д., Могилевич Н.А. Влияние аллохтонного азота на некоторые физиолого-биохимические показатели карпа // Гидробиол. журн. — 2006. — Т. 42, № 5. — С. 95—106.
3. Киризий Т.Я., Бабич Г.Б., Самойлова Т.Д. Динамика минерального азота в водоемах дендропарка «Александрия» // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія. — 2005. — 3 (26). — С. 199—200.
4. Львов Н.П. Микродиффузионный метод определения аммиака // Методы современной биохимии. — М.: Наука, 1975. — С. 58—61.

5. Микряков Д. В. Влияние некоторых кортикостероидных гормонов на структуру и функции иммунной системы рыб: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2004. — 24 с.
6. Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние гидрокортизона на антителообразовательную функцию иммунной системы карпа *Cyprinus carpio* // Вопр. ихтиологии. — 2002. — Т. 42, № 6. — С. 820—824.
7. Микряков Д. В., Микряков В. Р., Силкина Н. И. Изменение морфофизиологических показателей иммунокомпетентных органов карпа *Cyprinus carpio* под влиянием гормона стресса // Там же. — 2007. — Т. 47, № 3. — С. 418—424.
8. Потрохов А.С., Зиньковский О.Г., Киризий Т.Я., Худияш Ю.Н. Изменение ряда морфофизиологических показателей карпа под действием повышенной концентрации минерального азота в воде // Гидробиол. журн. — 2006. — Т. 42, № 6. — С. 71—90.
9. Практикум по биохимии / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. — 510 с.
10. Резников А.Г. Методы определения гормонов: Справочное пособие. — Киев: Наук. думка, 1980. — 400 с.
11. Романенко В.Д., Потрохов А.С., Зиньковский О.Г. Метаболические особенности адаптации карпа к изменению концентрации минерального азота в водной среде // Материалы III Всерос. конф. по вод. токсикологии, посвящ. памяти Б.А. Флерова «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы», конф. по гидроэкологии «Критерии оценки качества вод и методы нормирования антропогенных нагрузок», школы-семинара «Современные методы исследования и оценки качества вод, состояния водных организмов и экосистем в условиях антропогенной нагрузки», Борок, 11—16 нояб. 2008 г. — Борок, 2008. — Ч. 2. — С. 132—136.
12. Саутин Ю.Ю. Соматотропная и пролактинообразующая активность гипофиза и некоторые стороны обмена белков и липидов у карпа при тепловодном и прудовом выращивании // Гидробиол. журн. — 1985. — Т. 21, № 3. — С. 92—98.
13. Саутин Ю.Ю. Об участии пролактиноподобного гормона гипофиза в контроле энергетических и структурных липидов при изменениях температурных условий // Энергетический обмен у рыб. — М., 1986. — С. 57.
14. Хаитов Р.М., Лесков В.П. Иммунитет и стресс // Рос. физиол. журн. — 2001. — Т. 87, № 8. — С. 1060—1072.
15. Bartos J., Perez M. Colorimetric and fluorimetric determination of steroids // Pure & Appl. Chem. — 1979. — Vol. 51. — P. 2157—2169.
16. Brodeur J.C., Woodburn K. B., Klecka G.M. Potentiation of the vitellogenic response to 17 alpha-ethinylesterodiol by cortisol in the fathead minnow *Pimephalas promelas* // Environ. Toxicol. Chem. — 2005. — Vol. 24. — P. 1125—1132.
17. Dobirova R., Svobodova Z., Blahova J. et al. Stress response to long distance transportation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) // Acta vet. — 2006. — Vol. 75. — P. 437—448.

18. *Friedrich M.* Impact of transportation and environmental change on the levels of glucocorticoids, electrolytes and osmolarity of the blood of carp (*Cyprinus carpio* L.) // *Acta ichthyol. et pisc.* — 1996. — Vol. 26 (1). — P. 55—60.
19. *Hopkins T.E., Wood C. M., Walsh P.J.* Interactions of cortisol and nitrogen metabolism in the ureogenic gulf toadfish *Opsanus beta* // *J. Exper. Biol.* — 1995. — Vol. 198. — P. 2229—2235.
20. *Knight J.A., Anderson S., Rawle J.M.* Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids // *Clin. Chem.* — 1972. — Vol. 18, N 3. — P. 199—202.
21. *Miller L.L., Rasmussen J.B., Palace V.P., Hontela A.* Physiological stress response in white suckers from agricultural drain waters containing pesticides and selenium // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* — 2009. — Vol. 72, N 4. — P. 1249—1256.
22. *Sakamoto T., McCormick S.D.* Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation // *Gen. Comp. Endocrinol.* — 2006. — Vol. 147, N 1. — P. 24—30.
23. *Webb M.A., Allert J.A., Kappenman K.M. et al.* Identification of plasma glucocorticoids in pallid sturgeon in response to stress // *Ibid.* — 2007. — Vol. 154, N 1—3. — P. 98—104.
24. *Wendelaar Bonga S. E.* The stress response in fish // *Physiol. Rev.* — 1997. — Vol. 77. — P. 591—625.
25. *Weyts F.A., Verburg-van Kemenade B.M., Flik G. et al.* Conservation of apoptosis as an immune regulatory mechanism: effect of cortisol and cortisone on carp lymphocytes // *Brain. Behav Immun.* — 1997. — Vol. 11, N 2. — P. 95—105.
26. *Wojtaszek J., Dziwulska-Szwajkowska D., Lozińska-Gabska M. et al.* Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood // *Gen. Comp. Endocrinol.* — 2002. — Vol. 125, N 2. — P. 176—183.