

УДК [(546.39 + 546.17):597.551.2](285.3)

Ю. Н. Красюк, А. С. Потрохов, О. Г. Зиньковский

**ВЛИЯНИЕ АЛЛОХТОННОГО АЗОТА НА
ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
КРОВИ КАРПОВЫХ РЫБ**

Представлены результаты исследований продолжительного влияния аллохтонного азота на кровь двухлеток карпа и белого амура. Отмечено повышение содержания аммиака, нитритов и общего белка в плазме крови, а также увеличение количества гемоглобина и метгемоглобина в крови. Установлены изменения фракционного состава белков в плазме крови.

Ключевые слова: карп, белый амур, аммоний, нитриты, кровь.

В настоящее время в связи с возрастающим антропогенным воздействием на водные экосистемы соединения неорганического азота становятся практически неотъемлемой частью загрязнения, вызывающего евтрофикацию водоемов. Известно, что соединения минерального азота существенно влияют на физиолого-биохимический статус рыб [2, 13]. По мере снижения температуры воды в конце вегетационного периода направленность обмена веществ у рыб существенно меняется. Соответственно и проявление токсического эффекта азотистых соединений на их физиологическое состояние приобретает специфические черты. В частности рыбы, подверженные действию токсикантов, в большей мере используют энергоемкие соединения, поскольку активность их обмена веществ существенно превышает норму. При особо неблагоприятных условиях для поддержания энергетического баланса рыбы зачастую используют катаболизм белков, что приводит к усилению продуцирования эндогенного аммиака [10, 25]. Аммиак и ионы аммония также свободно проникают из окружающей среды через эпителий жабр в организм рыб [15]. В обменных процессах у рыб нитриты практически не образуются, однако они достаточно легко проникают извне через хлоридные каналы эпителия жабр и накапливаются в организме [23].

Целью нашей работы было оценить характер приспособительных реакций крови карповых рыб на действие высокой концентрации аллохтонного азота в период подготовки к зимовке.

Материал и методика исследований. Эксперименты были проведены на Белоцерковской экспериментальной гидробиологической станции Институ-

© Красюк Ю. Н., Потрохов А. С., Зиньковский О. Г., 2011

та гидробиологии НАН Украины. Биологическим материалом служили двухлетки карпа *Cyprinus carpio* L. украинской чешуйчатой породы массой 200 г и белого амура *Ctenopharyngodon idella* Val. массой 150—200 г.

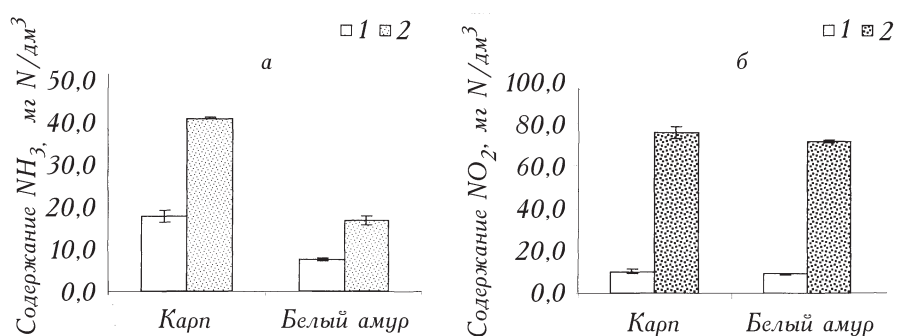
Рыб в течение 3 мес содержали в двух прудах. Температура воды за весь период исследований (с августа по октябрь) находилась в пределах 24—12°C. Концентрация соединений аллохтонного азота в воде опытного пруда составляла 16,4—18,6 мг N/дм³ (16—19 ПДК_{рыбхоз}) по ионам аммония, в том числе аммиака — 0,07—0,34 мг N/дм³ (1—7 ПДК), нитритов — 0,67—0,71 мг N/дм³ (7 ПДК); в контрольном она не превышала соответственно 0,1, 0,01 и 0,01 мг N/дм³. Значение рН воды контрольного пруда составляло 8,0—8,2, опытного — 7,6—7,9. За весь период наблюдений гибели рыб не отмечено.

В крови определяли содержание гемоглобина [24], долю метгемоглобина от общего содержания гемоглобина [8]. В плазме крови устанавливали содержание аммиака [11], нитритов [3] и белков [15]. Электрофорез плазмы крови проводили в полиакриламидном геле [18]. В качестве стандартов для определения подвижности фракций белка были выбраны альбумин плазмы крови (Sigma), дрожжевая РНК-аза и карсидные белки вирусов с известной молекулярной массой (14,4, 20, 30, 67, 94 кДа). Полученные данные статистически обработаны с помощью программы Statistica 5.5.

Результаты исследований и их обсуждение

Как показали наши исследования, содержание аммиака и нитритов в плазме крови двухлеток карпа и белого амура, продолжительное время находившихся под действием высокой концентрации аллохтонного азота значительно превышало контрольную величину (рис. 1).

Так, содержание аммиака в плазме крови карпа под действием азотистых соединений с понижением температуры возросло в 2,3, а белого амура — в 2,4 раза по сравнению с контролем. Поскольку в процессах возможного катаболизма белков, используемого для поддержания энергетических затрат для противодействия токсической нагрузке, не могло образоваться столь значительного количества эндогенного аммиака, то, по всей видимости, присутствующий в крови аммиак был преимущественно экзогенного происхождения. Известно, что при действии высокой концентрации аммонийного азота по мере понижения температуры воды у рыб существенно меняются обменные процессы в жабрах [5]. Это проявляется в снижении активности ферментативной детоксикации и экскреции аммиака, что и приводит к увеличению его содержания в жабрах. Основным путем детоксикации аммиака являются процессы дезаминирования и трансаминирования с использованием ферментов глутамат- и аспартатдегидрогеназы, аспартат- и аланинаминотрансферазы [6]. Однако с понижением температуры активность этих ферментов также снижается. Кроме того, в жабрах происходит потеря ионов кальция, натрия и калия, выведение их из крови во внешнюю среду, а также ингибирование их абсорбции в организм, что приводит к накоплению аммиака в организме.



1. Содержание аммиака (а) и нитритов (б) в плазме крови рыб под действием соединений неорганического азота. Здесь и на рис. 2—5: 1 — контроль, 2 — опыт.

Негативное влияние нитритов, которые также содержались в высокой концентрации в воде опытного пруда, проявляется в превращении гемоглобина в его неактивную форму — метгемоглобин. Вследствие этого происходит снижение обеспечения организма кислородом и накопление продуктов обмена веществ, в частности альдегидов, перекисных соединений и аммиака [23], что особенно важно в условиях пониженной температуры воды. Эти изменения могут снижать интенсивность процессов детоксикации, протекающих в печени. При этом может повреждаться паренхима и нарушаться ее общий гомеостаз, что также приводит к накоплению аммиака в организме рыб.

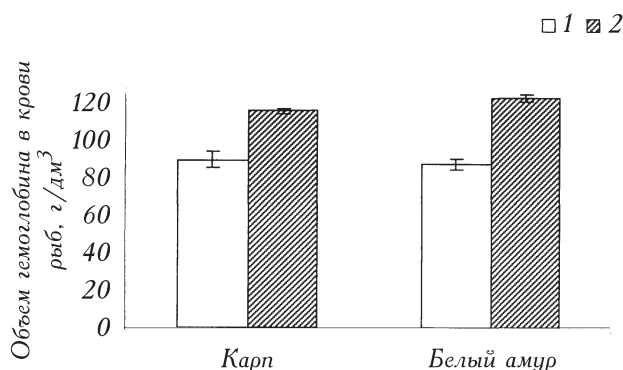
В отличие от аммиака, нитриты попадают в организм рыб только из внешней среды через хлоридные клетки жабр. При повышении концентрации нитритов в воде хлор-ионные насосы этих клеток начинают вместо ионов хлора пропускать нитриты [21].

Как показали результаты наших исследований, при длительном воздействии соединений аллохтонного азота, в частности нитритов, содержание NO_2^- в плазме крови карпа повышается в 7,6 раза по сравнению с контролем, а белого амура — в 7,9 раза (см. рис. 1). Кровь, активно участвующая в транспорте различных веществ, доставляет аммиак и нитриты к органам экскреции для последующего их выведения из организма. Показатели крови — один из адекватных индикаторов физиологического состояния рыб [4, 14], поскольку кровь является наиболее лабильной тканью организма, быстро реагирующей на действие разных факторов, ее функции направлены на восстановление равновесия между организмом и средой.

Результаты исследований свидетельствуют о росте содержания общего гемоглобина в крови рыб под действием аллохтонного азота. Значение этого показателя в крови двухлеток карпа и белого амура увеличилось соответственно на 29 и 41% по сравнению с контрольными группами (рис. 2).

Следует отметить, что в ответ на негативное действие повышенной концентрации неорганического азота активность главного кровяного органа

на (селезенки) возросла, а ее масса увеличилась у карпа и белого амура соответственно на 43,3 и 44,8% по сравнению с контролем. По всей видимости, при этом происходит активизация эритропоэза и, соответственно, поступление новых эритроцитов в кровяное русло [9], что подтверждается отмеченным увеличением содержания общего гемоглобина. Это является одним из адаптивных механизмов, который активируется по мере понижения температуры воды.

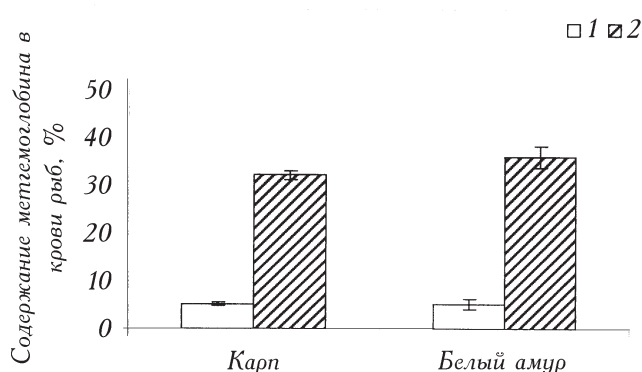


2. Содержание общего гемоглобина в крови рыб под действием соединений неорганического азота.

Негативное влияние аллохтонного азота на рыб также проявлялось в увеличении содержания функционально неактивной формы гемоглобина — метгемоглобина (рис. 3). Как уже отмечалось, образование метгемоглобина — естественный физиологический процесс в любом живом организме [22]. Содержание метгемоглобина у карповых видов рыб в норме составляет 8,0—8,8%. Физиологическая роль метгемоглобина заключается в том, что он является активатором окислительных процессов, обезвреживает цианиды и некоторые продукты межклеточного обмена, такие как фенол, янтарная кислота и др. [20]. Содержание метгемоглобина в крови подопытных карпа и белого амура было выше соответственно в 6,4 и 7,2 раза, чем в контроле (рис. 3). Таким образом, токсическое действие высокой концентрации аммонийного и нитритного азота увеличивает содержание метгемоглобина в крови настолько, что это может вызвать кислородное голодание. Длительное пребывание рыб в таких условиях негативно отражается на уровне транспорта кислорода кровью, а также приводит к интенсивному разрушению эритроцитов. Это может иметь самые негативные последствия для их жизнедеятельности в период зимовки, когда содержание растворенного в воде кислорода снижается.

Гемолиз красных кровяных телец может привести к росту содержания общего белка в крови [17]. Продолжительное содержание рыб (3 мес) в среде с высокой концентрацией аммонийного и нитритного азота в наших исследованиях существенно повысило уровень общего белка в плазме крови. Так, у карпа он достоверно ($p < 0,005$) увеличился в 1,5, а у белого амура — в 2,0 раза по сравнению с контролем (рис. 4).

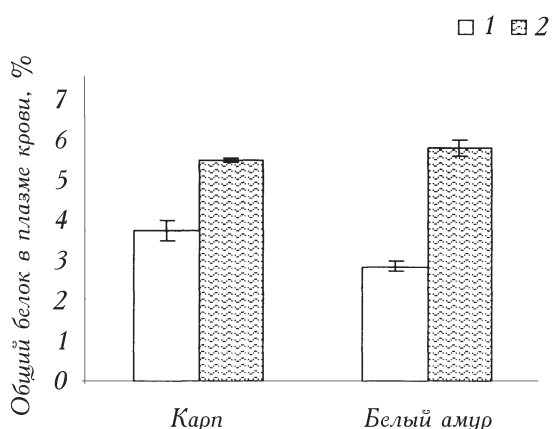
Белки плазмы крови рыб выполняют ряд важных функций — транспортную, дыхательную, защитную и др. [16]. Их содержание может широко варьировать в зависимости от действия разных факторов среды. Одной из ответных адаптивных реакций организма на действие токсического фактора



3. Относительное содержание метгемоглобина от общего гемоглобина в крови рыб под действием соединений неорганического азота.

токсической нагрузке мобилизуется определенное количество белков белых мышц, которые поступают в кровь и переносятся ею в качестве энергетического резерва. Эти процессы, в свою очередь, также приводят к увеличению содержания общего белка в крови рыб [1, 12].

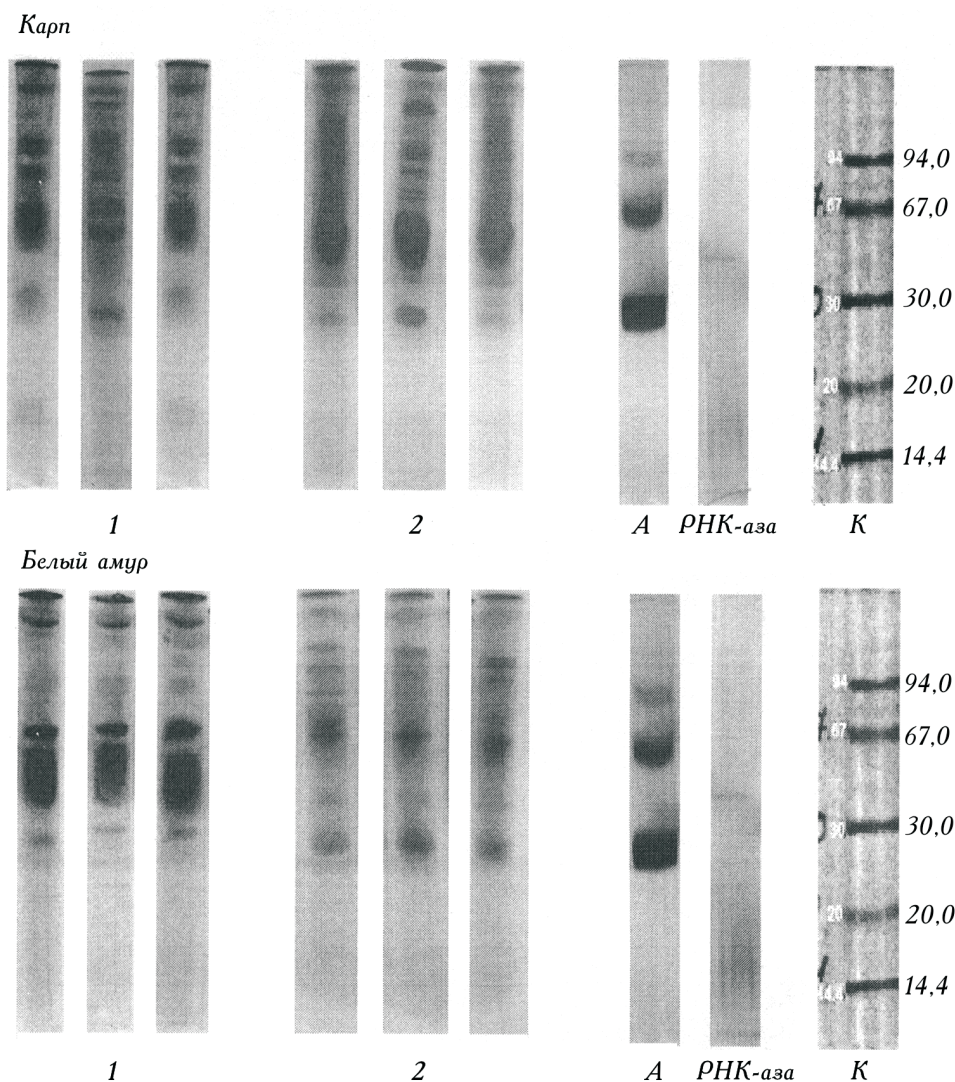
Известно, что в состав белков плазмы крови рыб входит значительное количество электрофоретически разделяемых фракций, в том числе высокомолекулярных: α -глобулины, представленные преимущественно белками ферментов, β -глобулины, принимающие активное участие в энергетическом обмене, и γ -глобулины — высокоспецифические иммунные белки. К низкомолекулярным белкам плазмы крови относятся альбумины, представленные большой группой фракций. Эти белки выполняют в основном транспортную функцию и являются резервными, используемыми как дополнительный энергетический ресурс организма [1, 7].



4. Содержание общего белка в плазме крови рыб под действием соединений неорганического азота.

может быть увеличение интенсивности обмена веществ. Активация метаболизма приводит к интенсификации транспорта ряда веществ, в том числе тиреоидных гормонов, холестерина, триглицеридов, железа и др. Этот транспорт осуществляется преимущественно с помощью белков альбуминовой фракции плазмы крови. Кроме того, при

У двухлеток карпа и белого амура под действием высокой концентрации неорганического азота существенно изменилась функция плазмы крови и весь спектр высокомолекулярных фракций белков (α -глобулинов) по сравнению с контролем (рис. 5). Поскольку фракция α -глобулинов содержит основные ферменты плазмы крови, то эти изменения свидетельствуют об активации ферментативных процессов, направленных на детоксикацию и экскре-



5. Электрофореграммы фракций белков плазмы крови рыб под действием соединений неорганического азота. Стандарты: *A* — альбумин плазмы крови, РНК-аза — рибонуклеаза, *K* — карсидные белки вирусов.

цию токсикантов, в частности аммиака и нитритов.

Изменяется как количество фракций белков в плазме крови, так и их соотношение. Наиболее существенно изменение в более низкомолекулярной части фракций глобулинов. Так, β - и γ -глобулины плазмы контрольных рыб представлены одной фракцией, а подопытных — тремя (см. рис. 5).

Однако наиболее заметные изменения удельного содержания белков происходили во фракции альбуминов. Кроме того, анализ результатов показал существенную разницу (в 2—3 раза) в количестве альбуминовых фрак-

ций между контролем и опытом. Поскольку содержание этой группы белков составляет более 60% общего, то его значительное возрастание у подопытных рыб объясняет увеличение содержания общих белков в плазме крови. По-видимому, негативное воздействие высокой концентрации аммонийного и нитритного азота на рыб приводит к росту активности транспорта и экскреции аммиака и нитритов. Это и вызывало увеличение содержания как альбуминов, так и общего белка в плазме крови карпа и белого амура (см. рис. 4). Кроме того, по мере снижения температуры воды обмен веществ рыб сдвигался в сторону использования катаболизма белков, а запасные белки, утилизируемые в этом процессе, относятся к низкомолекулярным альбуминовым фракциям.

Возрастание токсичности среды по мере понижения температуры приводит к активации ряда компенсаторных механизмов, в частности транспорта аммиака белками крови. Активация катаболизма белков характерна для зимовки рыб в данных условиях и также увеличивает поступление экзогенного азота, что вызывает рост содержания фракций альбуминов и низкомолекулярных глобулинов. Эти белки связывают аммиак и транспортируют его от органов к жабрам [19].

Высокая лабильность белкового состава плазмы крови рыб обеспечивает своевременное и адекватное развитие адаптивных механизмов, направленных на противодействие токсическому влиянию соединений минерального азота. Результатом этого является повышенная толерантность рыб и отсутствие гибели отдельных особей в вегетационный период и при подготовке к зимовке.

Заключение

Как показали наши исследования, содержание аммиака в плазме крови всех групп карпа было в 2 раза выше, чем у белого амура, что связано с их рационом питания. Поскольку карп относится к бентофагам и в его рационе преобладает белковая пища, то основная составляющая общего содержания аммиака в плазме его крови эндогенного происхождения. В свою очередь это предполагает хорошо развитую систему детоксикации аммиака у карпа и более широкие границы его адаптационных возможностей.

Повышение содержания аммиака и нитритов в плазме крови рыб в условиях нагрузки неорганическим азотом было значительно меньшим, чем в водной среде. Это свидетельствует о достаточно надежных механизмах изоляции организма от проникновения экзогенного аммония и нитритов.

Изменение изученных показателей крови рыб не указывает на существование значительных видовых различий в проявлении токсического действия аллохтонного азота. Отмечается лишь превышение содержания общего белка в плазме крови белого амура (на 25%) по сравнению с карпом.

Основные изменения в плазме крови подопытных рыб касаются состава белков, в частности содержания и количества фракций альбуминов. В ответ на токсическое действие аммонийного и нитритного азота у рыб возрастает транспортная емкость плазмы крови. Запасные белки альбуминовой природы активно мобили-

зуются для энергетического обеспечения процессов детоксикации, транспорта и экскреции токсикантов.

Полученные результаты свидетельствуют о компенсированном и адекватном функционировании адаптивных механизмов, противодействующих негативному влиянию аллохтонного азота у обоих видов рыб.

**

Наведено результати досліджень тривалої дії мінерального азоту на кров дворічок коропа і білого амура. Показано, що під впливом алохтонного азоту підвищувався вміст аміаку, нітриту і загального білка у плазмі крові, а також збільшувалась кількість гемоглобіну і метгемоглобіну в крові. Відмічено зміни фракційного складу білків у плазмі крові.

**

The results of researches are presented on prolonged influence of mineral nitrogen on blood of carp and grass carp (age two years). It is pointed that under the effect of mineral nitrogen content of ammonia, nitrites and total albumen in blood plasma increased, content of haemoglobin and methemoglobin in blood also increased. Changes of albumen fractionous relation in the blood plasma were observed.

**

1. Андреева А.М. Структурно-функциональная организация альбуминовой системы крови рыб // Вопр. ихтиологии. — 1999. — Т. 39, № 6. — С. 825.
2. Веселов Е.А., Бурия В.Ф. Влияние аммонийного азота на некоторые виды пресноводных рыб // Проблемы водной токсикологии. — Петрозаводск, 1978. — С. 52—58.
3. Голиков П.П., Николаева Н.Ю. Метод определения нитрита/нитрата (NO_x) в сыворотке крови // Биомед. химия. — 2004. — Т. 50, № 1. — С. 79—85.
4. Головина Н.А. Морфофункциональная характеристика крови рыб — объектов аквакультуры: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — М., 1996. — 53 с.
5. Грубинко В.В. Адаптивні реакції риби до дії аміаку водного середовища: Автореф. дис. ... докт. біол. наук. — К., 1995. — 44 с.
6. Грубинко В.В. Механизм выведения аммиака у карпа, роль в нем глутаминсинтеказы и ее свойства: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1988. — 17 с.
7. Грубинко В.В., Синюк Ю.В., Курант В.В. Состояние белков сыворотки крови карпа при воздействии ионов тяжелых металлов // Всерос. конф. «Современные проблемы водной токсикологии»: Тез. докл. — Борок, 2002. — С. 35—36.
8. Канаев А.И., Полякова В.Н., Козаченко Н.Г. и др. Метод определения метгемоглобина в крови карпов // Бюл. ВНИИ эксперим. ветеринарии. — 1987. — № 63. — С.18—21.
9. Красюк Ю.Н., Худияш Ю.Н. Изменение физиологического состояния карпов под действием соединений минерального азота // Материалы 2-й науч. конф. с участием стран СНГ «Современные проблемы физио-

- логии и биохимии водных организмов», Петрозаводск, 11—14 сент. 2007 г. — Петрозаводск, 2007. — С. 75—76.
10. Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1983. — 320 с.
 11. Львов Н.П. Микродиффузионный метод определения аммиака // Методы современной биохимии. — М.: Наука, 1975. — С. 58—61.
 12. Мацук В.Е., Новиков Г.Г. Динамика белкового и липидного состава крови радужной форели *Salmo gairdneri* Rich. // Вопр. ихтиологии. — 1979. — Т. 18, вып. 2 (109). — С. 329—341.
 13. Потрохов А.С., Зиньковский О.Г., Киризий Т.Я., Худияш Ю.Н. Изменение ряда морфологических показателей карпов под воздействием повышенной концентрации минерального азота в воде // Гидробиол. журн. — 2006. — Т. 42, № 6. — С. 81—90.
 14. Практикум по биохимии / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. — 510 с.
 15. Романенко В.Д., Потрохов А.С., Зиньковский О.Г. Метаболические особенности адаптации карпа к изменению концентрации минерального азота в водной среде // Объед. III Всерос. конф. по вод. токсикологии, посвященная памяти Б. А. Флерова «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы», 11—16 нояб. 2008 г., Борок. — Борок, 2008. — С. 132—136.
 16. Смит Л.С. Введение в физиологию рыб. — М.: Агропромиздат, 1986. — 168 с.
 17. Справочник по физиологии рыб / Под ред. А. А. Яржомбека. — М.: Агропромиздат, 1986. — 192 с.
 18. Титов В.Н., Амелюшкина В.А. Электрофорез белков сыворотки крови. — М., 1994. — 109 с.
 19. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Мир, 1977. — 398 с.
 20. Шерман Л.Я. О метгемоглобине в крови рыб // Вопр. ихтиологии. — 1970. — Т. 10, вып. 5 (64). — С. 932—934.
 21. Bath R.N., Eddy F.B. Transport of nitrite across fish gills // J. Exp. Zool. — 1980. — Vol. 214, N 1. — P. 119—121.
 22. Dabrowska, H., Wlasow T. Sublethal effect of ammonia on certain biochemical and haematological indicators in common carp (*Cyprinus carpio* L.) // Comp. Biochem. Physiol. — 1986. — Vol. 83. — P. 179—184.
 23. Huertas M., Gisbert E., Rodriguez A. et. al. Acute exposure of Sibirian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) yearlings to nitrite: median-lethal concentration (LC(50)) determination, haematological changes and nitrite accumulation in selected tissues // Aquat. Toxicol. — 2002. — Vol. 57, N 4. — P. 257—266.
 24. Van Kampen E.J., Zaistra W.G. Standardization of hemoglobinometry. II. The hemoglobinocyanide method // Clin. Chem. Acta. — 1961. — Vol. 6. — P. 538—544.
 25. Wilkie M.P. Mechanisms of Ammonia Excretion Across Fish Gills // Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology. — 1997. — Vol. 118, N 1. — P. 39—50.