

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 597.554.3-115.2+639.3.045+582.28+612.017+577.125

**ИММУНОБИОХИМИЧЕСКИЙ СТАТУС ПЛОТВЫ *RUTILUS RUTILUS*  
ПРИ САПРОЛЕГНИОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ**

© 2011 г. Н.И. Силкина, В.Р. Микряков, Д.В. Микряков

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,

Ярославская обл., пос. Борок 152742

Поступила в редакцию 16.12.2009 г.

Окончательный вариант получен 31.03.2010 г.

Изучено влияние сапролегниозной инфекции на иммунобиохимический статус плотвы. У рыб, пораженных сапролегниозом, отмечена супрессия функций гуморального звена иммунитета и дисрегуляция липидного обмена. Патогенное влияние сапролегний на организм рыбы приводило к снижению адаптивного потенциала и развитию деструктивных процессов в печени.

**Ключевые слова:** рыба, сапролегниоз, иммунитет, липиды.

**ВВЕДЕНИЕ**

Сапролегниоз – одно из самых часто встречаемых заболеваний рыб и их икры грибной этиологии. Считается, что сапролегниоз – вторичное заболевание, возникающее на месте травматических повреждений на теле рыбы, а также как сопутствующее заболевание при других болезнях, как инфекционных, так и инвазионных (Вербицкая и др., 1972; Бауер и др., 1981; Нейш, Хьюз, 1984). Сапролегниозом болеют практически все пресноводные рыбы, подвергшиеся негативному воздействию или попавшие в неблагоприятные условия обитания. Болезнь распространена повсеместно, так как возбудители этой болезни относятся к факультативным паразитам и в зависимости от условий среды ведут себя как сапрофиты и паразиты (Нейш, Хьюз, 1984). Они постоянно присутствуют не только в воде и грунтах, но и на теле рыб. Условиями, способствующими развитию болезни на рыбе, являются стресс-факторы: транспортировка, загрязняющие вещества, низкие показатели pH, дефицит кислорода и др., вызывающие ослабление организма рыб и снижение защитных функций кожного покрова (Микряков, 1979). Сапролегниоз часто возникает в карповых рыбоводных хозяйствах в условиях небрежного обращения с рыбой, при выдерживании в бетонных садках, в результате травматизации при обловах, погрузке и разгрузке живой рыбы. Возбудителем заболевания являются широко распространенные в природе низшие плесневые грибы в основном из рода *Saprolegnia* (*saprolegniales*), относящиеся к нескольким родам: *Achlya*, *Aphanomyces*, *Dictyuchus*, *Leptolegnia*, *Saprolegnia* и др. Наиболее распространенными и патогенными являются следующие виды: *A. flagellata*, *S. parasitica*, *Aph. laevis*, *D. monosporius*, *S. ferax*, *S. mixta*, *S. diclina*. Заболевание может возникать в любое время года, однако каждый вид гриба обладает определенными требованиями к условиям среды и, в частности, имеет свой температурный оптимум. Установлено, что максимум развития для *S. mixta* и *S. ferax* приходится на весну и осень, *S. monica* – на зиму, *A. flagellata* – на лето, *S. parasitica* и *S. diclina* встречается в течение всего года. Гифы гриба проникают в поврежденные ткани мышц, жабр, кожи рыб, разрушая ткани. На различных участках поверхности тела рыбы, плавниках, жабрах сапролегниоз проявляется в виде ватообразного разрастания гриба. Поражая наружный покров, гифы гриба разрушают эпидермис и проникают в дерму и во внутренние органы, нарушая такие

важные функции как слизеотделение, дыхание и осморегуляцию, что в конечном итоге приводит к снижению адаптивного потенциала организма и гибели хозяина. Вместе с тем, сведения о характере реагирования организма рыб на инфекцию сапролегнией и изменениях иммунологических и метаболических функций в литературе отсутствуют. Исходя из этого, нами были изучены реакции рыб на сапролегниевую инфекцию по данным анализа функционального состояния гуморального иммунитета и липидного обмена, что представляется важным при оценке выявляемых нарушений в иммунной системе и процессах метаболизма липидов. Известно, что липиды рыб помимо участия в энергетическом и пластическом обмене, принимают участие в осуществлении целого ряда важнейших жизненных функций – гидростатической, теплоизолирующей, механической, иммунологической и других (Лапин, Шатуновский, 1981; Силкина, 1988; Гершанович и др., 1991; Микряков, 1991; Силкина, Микряков, 2005; Смирнов, Богдан, 2007). У рыб под воздействием различных стресс-факторов нарушаются темпы и направление липидного обмена, изменяется соотношение между процессами липолиза и липогенеза, что в конечном итоге отражается на уровне содержания липидов и их качественном составе. При стрессе, согласно существующим представлениям процессы липолиза активизируются, а липогенеза – падают (Шрейбер, 1987; Pickering, 1993; Wendelaar Bonga, 1997).

Цель настоящей работы – изучение влияния сапролегниозной инфекции на показатели гуморального звена естественного иммунитета рыб и состояние липидного обмена.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования проводили на спонтанно пораженных сапролегниозом особях плотвы *Rutilus rutilus* в возрасте 2+ со средней массой 90-96 г. Рыб содержали в прудовой воде в принудительно аэрируемых 150 л аквариумах при температуре 17-18 °С в условиях оптимального кислородного режима (7,9-8,9 мг/л) и pH (7,5-7,6), где обеспечивалось постоянство гидрохимических условий. Заражение проводили при совместном содержании 70-ти опытных особей (здоровых 2-х-леток плотвы) и 20-ти больных половозрелых рыб, отловленных в Рыбинском водохранилище. По истечении 3-х суток больные рыбы, выловленные в водохранилище, удалялись из аквариума. Опытные рыбы были условно разделены на две группы: в I-ю группу включили особей без видимых внешних поражений сапролегнией, во II-ю – с выраженными признаками сапролегниоза. В качестве контроля использовали плотву, не подвергнутую контакту с больными рыбами, которую содержали в аналогичных условиях в чистой воде. Вода в аквариумах через сутки обновлялась на ¼ объема. О наличии болезни у опытных рыб судили на основании интенсивности обрастания рыб гифами сапролегний. Опыт длился один месяц. Пробы отбирались на 4-е, 18-е и 33-и сутки. О функциональном состоянии гуморального иммунитета судили по бактериостатической активности сыворотки крови (БАСК). Уровень БАСК определяли нефелометрическим методом, адаптированным для рыб (Микряков, 1991). В качестве тест-бактерий использовали бактериальную культуру *Aeromonas hydrophila* (штамм 71). Липиды из печени экстрагировали и определяли общепринятым способом по Фолчу (Folch et al., 1957). Качественный состав липидов определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» в различных системах растворителей, и проводили количественное определение каждого липидного пятна (Кейтс, 1972).

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

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные показали, что плотва, пораженная сапролегниозом, отличалась от здоровой (контроль) показателями гуморального иммунитета (табл. 1). На 4-е сутки БАСК у опытных рыб достоверно не отличался от контроля. На 18-е сутки от начала опыта показатель БАСК упал с 22,9% до 14,6% у опытных рыб I группы и до 9,1% у особей II группы. На 33-и сутки показатель иммунитета опытных рыб I группы стал ниже контроля на 42,6%, а у особей II группы БАСК упала еще больше – с 19,7% до 2,7%.

**Таблица 1.** Уровень БАСК у пораженных и непораженных сапролегниозом рыб.

**Table 1.** Level the BABS at fishes infected and not infected by saprolegniales.

Сутки	Контроль	I группа	II группа
4	23,4±4,5	25,1±3,7	24,6±4,8
18	22,9±3,3	14,6±2,9*	9,1±1,8*
33	19,7±4,7	11,3±6,9*	2,7±2,5*

**Примечание:** здесь и в таблице 2: \* – различия достоверны относительно контроля при  $p = 0,05$ .

**Note:** \*difference is significant at  $p = 0,05$ .

**Таблица 2.** Содержание общих липидов и фракционный состав липидов печени.

**Table 2.** The maintenance of the general lipids and fractional structure of lipids of liver.

С У Т К И	Г Р У П П А	Общие липиды (мг%)	Фракции липидов (% суммы)					
			Фосфоли- пиды	холестерин	неэстерифи- цированные жирные кислоты	триацилгли- церины	эфир стеринов	углеводо- ролы
4	К	2112±25	50,9±0,5	7,4±0,2	4,9±0,2	21,7±0,8	14,9±0,5	0,2±0,1
	I	2129±37	51,8±0,3	7,7±0,3	4,7±0,2	21,5±0,5	14,1±0,3	0,2±0,1
	II	2129±37	47,3±0,3*	12,7±0,3*	7,9±0,2*	17,8±0,5*	14,1±0,3	0,2±0,1
18	К	2209±33	51,1±0,3	7,5±0,3	5,0±0,2	21,7±0,4	14,6±0,3	0,1±0,1
	I	2116±29*	44,4±0,5*	14,2±0,2*	9,2±0,4*	18,2±0,3*	13,9±0,2	0,1±0,1
	II	2015±29*	43,4±0,5*	14,0±0,2*	9,9±0,4*	18,7±0,3*	13,9±0,2	0,1±0,1
33	К	2137±43	50,7±0,4	8,2±0,4	5,5±0,5	21,3±0,7	14,1±0,5	0,2±0,1
	I	2024±39*	43,7±0,3*	14,9±0,2*	10,1±0,3*	17,4±0,3*	13,7±0,4	0,2±0,1
	II	2024±39*	44,6±0,4*	15,2±0,2*	10,2±0,3*	14,1±0,4*	15,8±0,3*	0,1±0,1

При заражении сапролегниозом у рыб изменялись также и показатели липидного обмена (табл. 2). Уровень общих липидов (ОЛ) на 4-е сутки не отличался от контроля в обеих группах опытных рыб, но содержание ОЛ у больных рыб на 18-е и 33-и сутки изменилось: наблюдалось уменьшение ниже контрольного уровня на 4,2% в I группе, и на 2,1% во II группе, а на 30-е сутки – на 5,3% и 11,4% соответственно. Отмечены также количественные отличия во фракционном составе липидов. Причем, такие отклонения от нормы зафиксированы не только у рыб с явными признаками болезни, но и у опытных рыб I группы, не имеющих явных признаков заражения. Не выявлены достоверные отличия в количественном составе липидов у опытных рыб, только у рыб I группы на 4-е сутки, а в другие сроки наблюдений опытные рыбы отличались от контроля. Повышался уровень холестерина (Хл) и неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК), а относительное содержание фосфолипидов (ФЛ) и триацилглицеринов (ТАГ) снижалось.



Из представленных в таблицах 1, 2 данных следует, что печень рыб на сапролегниозную инфекцию реагирует нарушением липидного обмена. Печень, как известно, полифункциональный орган, принимающий активное участие в реализации метаболических и иммунологических процессов и детоксикации токсикантов (Микряков, 1979; Шрейбер, 1987; Арцимович и др., 1992; Маянский, 1992; Хаитов, Лесков, 2001). Изменение уровня общего метаболизма липидов в печени сопровождалось перераспределением липидных фракций: снижение наиболее весомых структурных ФЛ и запасных ТАГ, и возрастание доли НЭЖК и Хл. Присутствие в печени зараженных рыб избытка НЭЖК и Хл, принимающих участие в возникновении целого ряда патологических состояний, характеризует серьезные нарушения липидного обмена (Лапин, Шатуновский, 1981; Гершанович и др., 1991). Сдвиг липидных фракций, сопровождающийся, в частности снижением доли фосфолипидов, может быть связан с нарушением синтеза ФЛ из-за недостаточного образования или поступления в печень рыб липотропных веществ (холин, метионин и др.). Известно, что при их дефиците значительно снижается синтез ФЛ из нейтрального жира (глицерина, жирных кислот). Одновременно со снижением структурных ФЛ отмечено снижение запасных энергетических липидов – ТАГ, недостаток которых в печени больных рыб свидетельствует об общем истощении организма. Важно также отметить, что ФЛ и Хл 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 Хл 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 и функционировании иммунной системы наблюдаются отклонения от нормы при поражении паразитами, а также при ряде стрессирующих факторов биотической и абиотической природы (Микряков, 1979; Силкина, 1988; Микряков, 1991; Силкина, Микряков, 2005; Микряков, Силкина, 2006; Смирнов, Богдан, 2007).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ полученных результатов и сравнение их с литературными данными свидетельствует, что сапролегниевые грибы оказывают значительное патогенное влияние на иммунную систему и липидный обмен хозяина. У зараженных рыб снижается адаптационный потенциал и в печени развиваются деструктивные процессы. Негативное воздействие сапролегнии на организм рыбы проявлялось дисрегуляцией липидного обмена и супрессией иммунологических функций.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Арцимович Н.Г., Настоящая Н.Н. и др. Печень как орган иммунобиологической системы гомеостаза // Успехи соврем. биологии. 1992. Т. 112. №1. С. 88-99.
- Бауер О.Н. и др. Болезни прудовых рыб. 2-е изд. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. 320 с.
- Вербицкая И.Н. и др. Основные болезни прудовых рыб. М.: Колос, 1972. 72 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., 1972. 300 с.

Латин В.И., Шатуновский М.И. Особенности состава, физиологическое и экологическое значение липидов рыб // Успехи соврем. биологии. 1981. Т. 1. С. 380-394.

Маянский А.Н. Иммунологические свойства синусоидных клеток печени // Успехи соврем. биологии. 1992. Т. 112. №1. С. 52-61.

Микряков В.Р. Иммуитет рыб при сапролегниозе // Тез. докл. VII Всесоюз. совещ. по паразитам и болезням рыб. Л., 1979. С. 71-72.

Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. 153 с.

Микряков В.Р., Силкина Н.И. Иммунофизиологические реакции при адаптации рыб к эндопаразитам на примере системы лещ (*Abramis brama* L.) – *Ligula intestinalis* // Принципы и способы сохранения биоразнообразия. Сб. мат. II Всерос. науч. конф. 28-31 января 2006 г. Йошкар-Ола, 2006. С. 321-322.

Нейи Г., Хьюз Г. Микозы рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 96 с.

Силкина Н.И. Сезонная динамика липидов сыворотки крови и ее связь с иммунологической реактивностью рыб. Автореф. диссерт. на соиск. уч. степени кандидата биол. наук. М.: ИМЭЖ РАН, 1988. 17 с.

Силкина Н.И., Микряков В.Р. Влияние *Ligula intestinalis* на некоторые показатели липидного обмена селезенки хозяина – леща *Abramis brama* разного возраста // Паразитология, 2005. Т. 39. Вып. 4. С. 299-305.

Смирнов Л.П., Богдан В.В. Липиды в физиолого-биохимических адаптациях экотермных организмов к абиотическим и биотическим факторам среды. М.: Наука, 2007. 182 с.

Хаитов Р.М., Лесков В.П. Иммуитет и стресс // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2001. Т. 87. №8. С. 1060-1072.

Шрейбер В. Патофизиология желез внутренней секреции. Прага: Авиценум, 1987. 493 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. Pp. 497-509.

Pickering A.D. Endocrine-induced pathology in stressed salmonid fish // Fish. Res. 1993. V. 17. Pp. 35-40.

Wendelaar Bonga, Sjoerd E. The stress response in fish // Physiol. Rev. 1997. V. 77. №3. Pp. 591-625.

## THE IMMUNOBIOCHEMICAL STATUS OF ROACH *RUTILUS RUTILUS* AT SAPROLEGNIALES INFECTION

© 2011 y. N.I. Silkina, V.R. Mirkjakov, D.V. Mirkjakov

Papanin's Institute for biology of inland waters of the Russian Academy of Science, Borok

Influence of saprolegniales infection on the immunobiochemical status of roach have been studied. At the fishes infected with saprolegnia, have been noted suppression of humoral link functions of immunity and disregulation of lipid exchange. Pathogenic influence of saprolegnia on an organism of fish led to decrease in adaptive potential and development of destructive processes in a liver.

Key words: fish, roach, saprolegnia, immunity, lipids.