

**ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ БІЛКА ТА ЛІЗОЦИМУ У ДЕЯКИХ ВИДІВ РИБ,
ЗАРАЖЕНИХ ЕКТОПАРАЗИТАМИ, ВОДОЙМ УКРАЇНИ****Куровська Л. Я., Лисенко В. М.***Інститут зоології ім. І.І. Шмальгаузена НАН України, м. Київ***Воловик Г. П.***Інститут сільського господарства Західного Полісся НААН, м. Рівне*

Основні напрямки оцінки здоров'я риб та якості середовища їх проживання пов'язані з пошуком індикаторів різного біологічного рівня, встановленням як неспецифічних, так і специфічних індикаторів, тобто тих, що реагують на певні ксенобіотики розробкою інтегральних систем, які включають декілька тест-об'єктів, біомаркерів і біоіндикаторів різного рівня. Очевидно, що застосування комплексу біоіндикаторів дозволить одержати більш повну інформацію про стан популяцій риб, удосконалити умови їх культивування [1]. Останнім часом велика увага приділяється такому імунологічному показнику як лізоцим – важливій захисній молекулі природженої імунної системи риб [2–4]. Приділяється велика увага біологічній функції лізоциму, молекулярному клонуванню та експресії лізоциму в тканинах гідробіонтів, зокрема риб і креветок, а також застосуванню лізоциму гідробіонтів для запобігання захворювань об'єктів аквакультури [5]. Для оцінки можливості використання активності лізоциму сироватки крові, як критерію при відборі на посилення стійкості до хвороб, у риб в аквакультурі проводять відбір на низьку та високу активність лізоциму, а стійкість до хвороб оцінюють по реакції на патогени [6].

За останні десятиліття водойми України поповнилися 18 інтродукованими видами (рослиноїдні, осетрові) і підвидами риб, що потрапили випадково та самостійно розселилися із територій інших країн. Разом із зарибком рослиноїдних риб з Далекого Сходу до рибгоспів і водосховищ України потрапили малоцінні та сміттєві види риб (чебачок амурський, ротан-головешка, карась сріблястий), які в результаті ненавмисної інтродукції виявилися здатними до агресивної колонізації природних водойм України [7]. Експансія «випадковими» рибами-вселенцями супроводжується біологічним забрудненням нових для них акваторій. У такому забрудненні значна роль належить паразитам. Останні випадково проникають разом із своїми хазяями або самостійно поширюються слід за ними. Наслідки появи таких паразитів-вселенців можуть бути подвійними. З одного боку, одні види паразитів елімінують у новому середовищі, з іншого, як і хазяї, можуть спричинити спалах чисельності, що призводить до погіршення епізоотичної ситуації в водоймі [8].

Метою роботи було визначення рівня лізоциму в тканинах та органах деяких видів риб-вселенців при сумісному утримуванні їх в експериментальних умовах при зараженні ектопаразитами.

Матеріали та методи. Об'єктами дослідження слугували риби, навмисно та ненавмисно (випадково) інтродуковані в прісноводні водойми України, з рибних господарств «Нивка», «Немішаєво» та «Фортуна ХХІ» (Київська обл.): карась сріблястий (*Carassius auratus* L., 1758), амурський чебачок (*Pseudorasbora parva* Temminck, Schlegel, 1846), ротан-головешка (*Perccottus glenii* Dubowski, 1977) та стерлядь – риба абориген (*Acipenser ruthenus* L., 1758), яких утримували в експериментальних умовах у весняний період за температури 15–17 °С.

У дослідних риб проводили паразитологічне дослідження за загальноприйнятою методикою. Розраховували індекс рясності зараження риб ектопаразитами (ІР, екз.). Відносний облік ектопаразитів проводили підрахунком середнього від загального числа виявлених особин у десяти полях зору мікроскопа (10Ч7) з одного мазка. Кількість паразитичних інфузорій та моногеней реєстрували як загальну кількість з поверхні тіла та зябер риб. Паразитологічне дослідження амурського чебачка, ротана-головешки та карася сріблястого на початку досліду показало наявність у них поодиноких екземплярів паразитів, а у стерляді паразити були відсутні.

Для фізіолого-біохімічних досліджень у дослідних риб із серця відбирали кров для одержання сироватки, у якій визначали кількість загального білка за методом Лоурі, уміст лізоциму (мурамідаза) дифузійним методом на агарі. Із органів і тканин риб (печінка, нирки, селезінка, слиз шкіри) були виготовлені водні екстракти тканин (1:50), у яких визначали кількість водорозчинного білка та лізоциму.

У дослідних риб визначали морфометричні та морфологічні показники: масу, довжину, коефіцієнт вгодованості риб за Фультоном, абсолютну (мг) і відносну (індекс, %) масу печінки, нирок і селезінки риб. Статистичну обробку результатів проводили загальноприйнятою методикою.

Результати досліджень. Проведено дві серії дослідів. У першій серії вивчали вплив зараження ектопаразитами на морфологічні та біохімічні показники амурського чебачка і ротана-головешки, ураженого та не ураженого паразитичним грибом роду *Saprolegnia* (сапролегнія), після сумісного їх утримування протягом 12 діб (табл. 1).

У ротана-головешки, ураженого сапролегнією, відмічено зниження коефіцієнту вгодованості на 7,9 %. Амурський чебачок був заражений ектопаразитами дуже слабо, у той же час у ротана-головешки, не ураженого грибом, були знайдені простіші *Trichodina* sp. (триходіна) та моногеней *Gyrodactylus cyprini* (гіродактилюс), а у ротана, ураженого сапролегнією, – ще і глохидії молюсків *Unio* sp. ІР гіродактилюсами значно вищий у ротана-головешки, ніж у амурського чебачка (у 12 та 40 разів). Слід відмітити високий рівень відносної маси печінки (у 8,5 рази) ротана-головешки у порівнянні з амурським чебачком ($P < 0,001$).

Відомо, що печінка риб, як і теплокровних тварин, виконує травну, метаболічну та імунну функції, що пов'язано з детоксикацією та нейтралізацією ксенобіотиків, екзо- та ендотоксикантів, збудників інфекційних та інвазійних хвороб [9]. У ротана-головешки ці процеси більш активовані, ніж у амурського чебачка, і цей вид риб очевидно більш пристосований до різних умов існування. Інші імунокомпетентні органи (нирки, селезінка) по абсолютним і відносним масам суттєво не відрізнялися у двох досліджених видів риб.

Уміст білка у слизу шкіри та органах не набагато більший у амурського чебачка, ніж у ротана-головешки. Лише в печінці цих риб знайдені достовірні різниці вмісту білка ($P < 0,05–0,01$). У сироватці крові концентрація білка вища у 1,7 рази у ротана-головешки, незараженого сапролегнією, у порівнянні з амурським чебачком. Рівень лізоциму в слизу шкіри, нирках і селезінці вищий у амурського чебачка відповідно у 1,3; 2,9 та 8,1 рази ($P < 0,05$), печінці та сироватці крові – у ротана-головешки у 1,6 та 16,4 рази відповідно, причому у ротана-головешки, ураженого сапролегнією, цей показник нижчий у 1,2 рази.

Результати цієї серії досліджень показали, що показник вмісту лізоциму є більш інформативним, ніж показник концентрації білка в тканинах та органах таких риб-вселенців, як амурський чебачок і ротан-головешка при мішаному зараженні простішими, моногенями та паразитичними грибами.

У другій серії дослідів вивчали рівень зараження ектопаразитами, вміст білка та лізоциму в сироватці крові карася сріблястого та стерляді при сумісному їх утримуванні протягом 12 (дослід 1) та 20 діб (дослід 2). У дослідних риб спостерігалось зниження коефіцієнту вгодованості як у карася сріблястого (на 10,7 %), так і стерляді (на 35,5 %), що цілком природно при експериментальному їх утримуванні (табл. 2).

Розділ 7. Паразитологія

Таблиця 1 – Зараження ектопаразитами та деякі морфологічні та біохімічні показники амурського чебачка та ротана-головешки при сумісному їх утриманні

Показники	Амурський чебачок	Ротан-головешка	
		Без сапролегнії	З сапролегнією
Маса риби, г	5,1±0,9	25,0±3,5	18,1±7,6
Довжина риби, см	7,1±0,3	10,2±0,4	9,3±1,0
Коефіцієнт вгодності за Фультоном	1,35±0,03	2,28±0,05	2,10±0,25
Зараження паразитами (IP, екз.) <i>Trichodina</i> sp.	0	20,4	20,0
<i>Gyrodactylus cyprini</i>	0,2	2,4	8,0
<i>Unio</i> sp. (глохидії)	0	0	8,0
Абсолютна маса, мг Печінка	32,0±6,5	1264,0±143,4	1010,0±441,0
Нирки	9,0±6,5	57,0±12,5	37,0±24,1
Селезінка	5,6±4,4	28,6±4,9	20,5±6,5
Відносна маса (індекс), ‰ Печінка	6,5±1,4*	52,1±5,0*	55,1±1,3*
Нирки	1,3±0,7	2,2±0,3	1,8±0,6
Селезінка	0,8±0,4	1,2±0,2	1,5±1,0
Уміст білка, г/100 г тканини Слиз шкіри	2,9±1,0	1,5±0,7	1,6±1,2
Печінка	0,7±0,1*	0,4±0,1*	0,1±0*
Нирки	0,8±0,2	0,5±0,2	0,6±0,4
Селезінка	1,0±0,4	0,9±0,2	0,8±0,1
Сироватка крові, г/л	13,0±2,9	22,3±6,7	14,5±3,5
Вміст лізоциму, мкг/г тканини Слиз шкіри	213,3±11,9	165,9±11,9	109,2±10,9
Печінка	60,8±5,1	96,9±8,5	48,0±11,4
Нирки	377,1±10,8*	130,5±6,2*	215,6±10,4
Селезінка	615,6±21,4*	75,7±9,6*	160,5±5,4*
Сироватка крові, мкг/мл	3,9±1,0*	64,0±4,2*	55,3±12,9*

Примітка: * – різниці між даними дослідів достовірні (пояснення в тексті)

Таблиця 2 – Зараження ектопаразитами, уміст білка та лізоциму в сироватці крові карася сріблястого та стерляді при сумісному їх утриманні

Показники	12 діб		20 діб	
	Карась сріблястий	Стерлядь	Карась сріблястий	Стерлядь
Маса риби, г	50,3±10,6	11,2±0,9	42,1±9,0	24,4±1,2
Довжина риби, см	12,0±1,0	12,2±0,9	11,8±0,8	18,2±1,3
Коефіцієнт вгодності за Фультоном	2,81±0,19	0,62±0,02	2,51±0,14	0,40±0,02
Зараження паразитами (IP), екз. <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	2,0	0	1,0	8
<i>Dactylogyrus</i> sp.	7,6	0	14,3	0
<i>Gyrodactylus</i> sp.	28,4	0	6	2
<i>Argulus</i> sp.	0,4	0	0	1
Вміст білка, г/л	6,2±2,3	1,0±0*	6,7±1,3	3,5±0,8*
лізоциму, мкг/мл	2,4±0,9*	32,8±2,9*	5,3±1,4*	35,7±2,7*

При паразитологічному дослідженні карася сріблястого та стерляді при сумісному утриманні протягом 12 діб у першого знайдено простіші *Ichthyophthirius multifiliis* (іхтіофтіріус), моногенні родів *Dactylogyrus* (дактилогірус) та *Gyrodactylus*, ракоподібні роду *Argulus* (аргюлюс).

Кількість гіродактилюсів, що знаходилися на поверхні тіла, переважала кількість дактилогірусів, знайдених на зябрах, у 3,7 рази. У стерляді ектопаразити були відсутні. Уміст білка у сироватці крові карася сріблястого перевищував цей показник у стерляді у 6,2 рази, а вміст лізоциму був нижчим у 13,7 рази ($P < 0,001$).

У досліді 2 у карася сріблястого знизилася зараження гіродактилюсами, але підвищилася кількість дактилогірусів на зябрах, що призводить до більш патологічного впливу ектопаразитів на кров риби. При цьому відмічено незначне підвищення вмісту білка у сироватці крові та більш значне підвищення вмісту лізоциму (у 2,2 рази) в порівнянні з дослідом 1. У стерляді на поверхні тіла були знайдені іхтіофтіріуси, гіродактилюси та аргюлюси. У карася сріблястого у цьому досліді вміст білка у сироватці крові був вищим у 1,9 рази, а вміст лізоциму нижчим у 6,7 рази в порівнянні з показниками стерляді ($P < 0,001$). В останньої, у порівнянні з дослідом 1, спостерігалася збільшення вмісту білка в 3,5 рази ($P < 0,05$), а рівень лізоциму підвищився незначно (на 12,5 %).

Аналіз досліджень другої серії дослідів показав, що рівень лізоциму у стерляді значно вищий, а рівень білка нижчий, ніж у карася сріблястого незалежно від рівня зараженості. При збільшенні кількості паразитів на поверхні тіла та зябрах досліджених риб відбувається збільшення кількості білка та лізоциму у сироватці крові, як захисні реакції організму риби для збереження стійкого гомеостазу.

Висновки. 1. Проведені досліді показали, що амурський чебачок і стерлядь більш стійкі до зараження ектопаразитами, ніж карась сріблястий та ротан-головешка при сумісному їх утриманні в експериментальних умовах.

2. Порівняльний аналіз досліджених біохімічних показників в органах і тканинах амурського чебачка, ротана-головешки, карася сріблястого та стерляді показав, що вміст білка та лізоциму в сироватці крові, імунокомпетентних органах і слизу шкіри риб може бути інформативною характеристикою їх фізіологічного стану під впливом змін якісного та кількісного складу паразитів. У досліджених риб спостерігається різний механізм реакції досліджених показників при збільшенні кількості ектопаразитів. У ротана-головешки при збільшенні рівня зараженості підвищується вміст лізоциму в сироватці крові (55–64 мкг/л), у карася сріблястого – рівень білка до 7 г/мл. У стерляді високий рівень лізоциму у сироватці крові захищає її організм від надмірного зараження, а амурського чебачка – значний вміст лізоциму в імунокомпетентних органах (особливо у селезінці) – 616 мкг/мг тканини.

Список літератури

1. Руднева, И.И. Применение биохимических маркеров для оценки здоровья рыб [Текст] / И.И. Руднева // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов – 2 : расширенные материалы Междунар. науч.-практ. конф. – М., 2007. – С. 234–238.
2. Protective effect of lysozyme-galactomannan or lysozyme-palmitic acid conjugated against *Edwardsiella tarda* infection in carp, *Cyprinus carpio* L. [Text] / Soichiro Nakamura [et al.] // FEBS Lett. – 1996. – Vol. 383, № 3. – P. 251–254.
3. Modulation of nonspecific defense mechanisms and specific immune responses after suppression induced by xenobiotics [Text] / M. Studnicka [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2000. – Vol. 16, № 1. – P. 1–7.
4. Saurabh, Sh. Lysozyme: An important defense molecule of fish innate immune system [Text] / Sh. Saurabh, P.R. Sahoo // Aquacult. Res. – 2008. – Vol. 39, № 3. – P. 223–239.
5. Zheng, Qing-mei Прогресс в исследованиях лизоцима гидробионтов [Text] / Qing-mei Zheng, Rui-quan Wu, Xing Ye // Shanghai shichan daxue xuebao = J. Shanghai Fish Univ. – 2006. – Vol. 15, № 4. – P. 483–487.
6. Rshed, K. H. Disease resistance and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for lysozyme activity [Text] / K.H. Rshed, S.-E. Fevolden, K.T. Fjalestad // Aquaculture. – 2002. – Vol. 209, № 1–4. – P. 91–101.
7. Жукинський, В.Н. Адвентивные виды и изменение ареалов аборигенных гидробионтов в поверхностных водных объектах Украины. Сообщ. 2. Лучеревые рыбы [Текст] / В.Н. Жукинський, Т.А. Харченко, А.В. Ляшенко // Гидробиол. журн. – 2007. – Т. 43, № 4. – С. 3–24.
8. Экология паразитов водоемов Украины [Текст] : монография / О.Н. Давыдов [и др.]. – К., 2011. – 492 с.
9. Влияние сублетальных концентраций солей ртути, кадмия и меди на содержание лизоцима в тканях молоди ленского осетра *Acipenser baeri* [Текст] / Т.Б. Лапирова [и др.] // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 2000. – Т. 36, № 1. – С. 37–39.

DETERMINING THE LEVEL OF PROTEIN AND LYSOZYME IN SOME SPECIES OF FISH, INFECTED WITH ECTOPARASITES IN THE WATERS OF UKRAINE

Kurovskaja L. Ya., Lysenko V.N.

I.I. Schmalhausen Institute of Zoology NAS of Ukraine, Kyiv

Volovyk G.P.

Institute of Agriculture of Western Polissay NAAS of Ukraine, Rivne

*A comparative analysis of protein and lysozyme content in the organs and tissues of the *Pseudorasbora parva*, *Percocottus glenii*, *Carassius auratus* and *Acipenser ruthenus* at the experimental infection with ectoparasites has been carried out. It has been shown that these parameters can be informative characteristic of changes in the physiological state of the fish.*

УДК 619:616.99:636.98

ВПЛИВ ЕКТОПАРАЗИТАРНОЇ ІНВАЗІЇ НА РІВЕНЬ ХРОМОСОМНИХ МУТАЦІЙ У СОМАТИЧНИХ КЛІТИНАХ ОДНОРІЧОК КОРОПА

Лобойко Ю.В.

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького, м. Львів

Однією із причин, що перешкоджають розвитку рибництва та збільшення рибопродуктивності є ектопаразитарні хвороби риб, які спричиняють значні економічні збитки. За останній час на багатьох рибпромислових водоймах України, особливо ставках, набувають значного поширення спалахи таких ектопаразитарних захворювань риб як дактилогіроз, гіродактильоз, аргульоз, лернеоз та інші [1, 2, 3].

Хромосомний апарат риб, при всій його досконалості, не залишається незмінним, час від часу в генах і хромосомах відбуваються мутації – структурні зміни, які передаються спадково. Швидкість мутаційних процесів у риб значно підвищується при дії різних факторів, зокрема хвороб [4].

Відмічено, що в органах риб з певною частотою зустрічаються клітини з хромосомними абераціями, у зв'язку з чим вони вважаються перспективними у використанні в якості тест-об'єктів для цитогенетичного моніторингу [5, 6].

Метою наших досліджень було вивчення впливу інвазії ектопаразитами на рівень хромосомних мутацій у соматичних клітинах одnorічок коропа.

Матеріали та методи досліджень. З метою визначення рівня хромосомних мутацій у соматичних клітинах одnorічок коропа за ураження ектопаразитами з різним ступенем інвазії в акваріальних умовах було проведено дослід, в якому використовували спонтанно інвазованих збудниками дактилогірозу та лернеозу риб.

Період акліматизації риб становив 14 діб за температури води 16–18 °С. Перед виконанням дослідів було проведено паразитологічне дослідження риб та визначено показники рівня їх інвазованості. Для цього було сформовано дванадцять груп риб по 6 особин у кожній, масою тіла 38,0±4,8 г. По чотири групи риб (контрольна та три дослідні) за ураження ектопаразитами *L. suprinasea*, *D. vastator* та за змішаної інвазії. При ураженні *L. suprinasea* риби першої групи були контрольними, другої – з інтенсивністю інвазії до 0,08 лерней на г маси тіла (г м.т.), третьої – з інтенсивністю від 0,11 до 0,26 лерней на г м.т. і четвертої – більше 0,26 лерней на г м.т. риби. За ураження *D. vastator* риби першої групи були контрольними, другої – уражені з інтенсивністю до 0,26 дактилогірусів на г м.т., третьої – від 0,29 до 0,53 дактилогірусів на г м.т. та четвертої – більше 0,53 дактилогірусів на г м.т. За змішаної інвазії риби першої групи були контрольними, другої – з інтенсивністю інвазії до 0,08 лерней на г м.т. та до 0,26 дактилогірусів на г м.т., третьої – з інтенсивністю 0,11–0,26 лерней на г м.т. та 0,29–0,53 дактилогірусів на г м.т. і четвертої – більше 0,26 лерней г м.т. та 0,53 дактилогірусів на г м.т. Іхтіопаразитологічний аналіз проводили за методом неповного паразитологічного розтину за І.Є. Биховською-Павловською [7]. Видову належність паразитів визначали за «Определителем паразитов пресноводных рыб фауны СССР» [8].

Інтенсивність інвазії (I) визначали шляхом підрахунку кількості паразитів на тілі та зябрах досліджуваної риби.

Рибу утримували в акваріумах ємністю 40 дм³ зі штучною аерацією за температури 18–20 °С. Догляд за рибою та її годівлю проводили згідно з відповідними нормами та раціонами. Протягом усього періоду досліджень спостерігали за поведінкою та клінічним станом риб.

Для оцінки стану хромосом як дослідний матеріал використовували тканини нирок та лімфоїдного органу, з яких готували препарати метафазних хромосом [9], оскільки вони володіють високою мітотичною активністю та рекомендуються для вивчення хромосомного апарату риб.

Рівень хромосомних мутацій у соматичних клітинах одnorічок коропа визначали згідно з відповідними методичними рекомендаціями [10].