

УДК 591.69-7+ 597-1.05

**ВЛИЯНИЕ *LIGULA INTESTINALIS* НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ  
ЛИПИДНОГО ОБМЕНА СЕЛЕЗЕНКИ ХОЗЯИНА —  
ЛЕЩА *ABRAMIS BRAMA* РАЗНОГО ВОЗРАСТА**

© Н. И. Силкина, В. Р. Микряков

Приведены результаты сравнительного анализа селезенки здоровых и инвазированных плероцеркоидами *Legula intestinalis* лещей *Abramis brama* (L.) двух возрастных групп по показателям общих липидов (ОЛ) и их качественному составу, интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и общей (интегральной) антиокислительной активности (ОАА). Показана зависимость характера липидного обмена у инвазированных лигулой рыб как от возраста, так и от разного уровня их индивидуальной инвазированности.

В ряде многочисленных работ показано супрессивное влияние плероцеркоидов *Ligula intestinalis* (Cestoda, Pseudophyllidea) на организм своих промежуточных хозяев — карповых рыб (Taylor, Hoole, 1989; Varus, Prokes, 1995; Куперман и др., 1997; Извекова, 1999, и др.). Полевые наблюдения показывают, что плероцеркоиды встречаются как у молодых, так и у взрослых рыб. Наблюдаемые в организме инвазированных рыб изменения, вызванные плероцеркоидами *L. intestinalis*, связаны с нарушениями ряда жизненно важных функций организма хозяина, в том числе функций иммунной системы, его физиолого-биохимического статуса (Микряков, Силкина, 1997). Нами показано, что инвазия рыб плероцеркоидами сопровождается нарушением липидного обмена, усилением свободнорадикальных и перекисных процессов, дефицитом образования структур антиоксидантной защиты (Силкина, Микряков, 2000, 2003, 2004; Силкина, Жарикова, 2003). Вышеперечисленные работы выполнены на иммунокомпетентных тканях и органах (сыворотка крови, печень). При этом неоднократно отмечалось, что при инвазии рыб лигулидами наблюдались изменения в емкости почек, печени, селезенки, инволюция этих тканей, очаговые кровоизлияния, разрушения клеток и другие изменения в иммунокомпетентных органах. К числу важнейших иммунокомпетентных органов относится селезенка. Селезенка у рыб является важным гемопозитическим органом, где происходит образование эритроцитов и лейкоцитов, она участвует в нейтрализации чужеродных тел и синтезе специфических антител (Микряков, 1984; Микряков и др., 2001). Вместе с тем в доступной литературе сведения об особенностях липидного обмена в тканях селезенки, в том числе перекисного окисления липидов у рыб разного возраста при их заражении лигулидами, отсутствуют. Между тем этот аспект представляется весьма важным для понимания механизмов взаимной адаптации обоих партнеров и характера влияния парази-

тов на организм хозяина в процессе созревания червя к обитанию в окончательном хозяине (рыбоядных птицах).

Цель данной работы — изучение особенностей влияния плероцеркоидов *Ligula intestinalis* (Cestoda, Pseudophyllidea) на особенности липидного обмена селезенки, выяснение роли перекисного окисления липидов и антиоксидительной защиты (АОЗ) в механизме паразитарной интоксикации у лещей *Abramis brama* (L.) разного возраста.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования проводились на селезенке рыб, отловленных в сентябре 2003 г. в Рыбинском водохранилище. Для сравнительного анализа отбирались пораженные лигулидами и непораженные особи лещей *Abramis brama* L. двух возрастных групп — подлещики возрастом 4+—5+ и взрослые половозрелые особи в возрасте 7+ и 8+. Рыб каждой возрастной категории условно разделили на 3 группы. В состав I—III групп входили молодые рыбы (4+—5+), а IV—VI групп — половозрелые лещи (7+ и 8+). В I группу включили молодых рыб непораженных (контроль); во II — зараженных особей, имеющих по 1 лигуле со средней длиной 375 мм и массой 0.99 г; в III — зараженных лещей, являющихся хозяином 6 червей, у которых средняя длина составляла 288 мм, масса 1.7 г.; в IV — взрослых непораженных рыб (контроль); в V — зараженных особей, имеющих по 1 лигуле со средней длиной 330 мм и массой 1.27 г.; в VI — зараженных особей, имеющих по 6 лигулид со средней длиной 351 мм и массой 2.06 г. Экстракцию липидов из тканей селезенки проводили методом Фолча (Folch et al., 1957). Качественный состав липидов определяли методом тонкослойной хроматографии на силуфольных пластинках «Silufol» (Чмутов, 1978). Об интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях селезенки судили по накоплению одного из конечных продуктов перекисления липидов малонового диальдегида (МДА). Концентрацию МДА в тканях рыб определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (Андреева и др., 1988). Интенсивность окрашивания определяли спектрофотометрически по изменению максимума поглощения при 532 нм. Расчет содержания продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции МДА, равного  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ . Общую (интегральную) антиоксидительную активность биологического материала (ОАА) устанавливали по кинетике окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолинодофенола кислородом воздуха в присутствии и отсутствии тканевых экстрактов. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 510 нм (Семенов, Ярош, 1985). Данные обработаны методом вариационной статистики с использованием пакета прикладных данных «Excel 97», применяя t-тест Стьюдента с последующей оценкой различий при  $P \leq 0.05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных показал, что инвазия *L. intestinalis* существенно влияет на показатели липидного обмена в селезенке у обеих возрастных групп леща. При этом установлено достоверное ( $P \leq 0.05$ ) изменение исследованных показателей липидного обмена с возрастом рыб, что согласуется с имеющимися литературными данными (Шатуновский, 1980; Силкина, 1988). Интенсивность накопления как общих липидов, так и отдельных

Таблица 1

Влияние инвазии *Ligula intestinalis* на характеристики липидного обмена селезенки леща  
 Table 1. The effect of the infestation by *Ligula intestinalis* on the characteristics of lipid exchange in the spleen of bream

Группа рыб	ОЛ	Фракции липидов, % суммы						МДА	ОАА
		Ф	Х	НЭЖК	Т	ЭС	У		
4+—5+									
контроль,	765	47.7	7.5	3.8	35.3	4.8	0.9	3.18	14.98
зараженный <i>L. intestinalis</i>	775	47.1	11.9*	6.1*	32.2*	2.2*	0.5	4.14*	12.54*
8+—9+									
контроль,	825	46.1	8.9	4.8	37.0	3.0	0.2	4.55	19.07
зараженный <i>L. intestinalis</i>	870**	41.4**	12.5**	9.0**	34.9**	2.0	0.2	6.13**	16.07**

Примечание. ОЛ — общие липиды, мг %; Ф — фосфолипиды; Х — холестерин; НЭЖК — неэстерифицированные жирные кислоты; Т — триацилглицерины; ЭС — эфиры стериннов; У — углеводороды; МДА — содержание малонового диальдегида, нМоль/г; ОАА — общая (интегральная) антиокислительная активность, л × мл<sup>-1</sup> × мин<sup>-1</sup>; \* — достоверно относительно незараженных подлещиков при P < 0.05; \*\* — достоверно относительно незараженных лещей при P < 0.05.

липидных компонентов в селезенке леща с возрастом менялась (табл. 1). У пораженных *L. intestinalis* рыб отмечено повышение уровня общих липидов, существенное перераспределение отдельных липидных компонентов, усиление интенсивности перекисного окисления липидов и снижение антиокислительной активности в селезенке у обеих возрастных групп леща. У инвазированных особей установлено увеличение относительного содержания триацилглицеринов, холестерина и НЭЖК (неэстерифицированных жирных кислот) и снижение уровня фосфолипидов и эфиров стериннов. Заражение рыб лигулидами оказывало более значительное влияние на липидную систему взрослых рыб (8+—9+), чем на таковую системы молодых (4+—5+). Так, если у молодых рыб содержание общих липидов повышалось недостоверно, то у взрослых данный показатель увеличился на 5.45 % по сравнению с инактивными особями. У молодых рыб содержание структурных фосфолипидов после заражения изменилось недостоверно, а у взрослых рыб фосфолипидов стало меньше на 4.7 %. Картина перераспределения остальных липидных фракций имеет сходный характер у взрослых и молодых рыб. Уровень холестерина и НЭЖК у молодых и взрослых лещей относительно контрольных повысился соответственно на 4.4 и 2.3 % против 3.6 и 4.2 %. Повышение холестерина и НЭЖК сопровождалось снижением триацилглицеринов и эфиров стериннов у зараженных молодых рыб соответственно на 3.1 и 2.6 %, у взрослых — на 2.1 и 1. %. Зараженность рыб лигулидами приводила к усилению интенсивности ПОЛ: у молодых рыб уровень конечных молекулярных продуктов перекисеобразования — МДА повысился на 30.2 %, у взрослых — на 34.7 %. Инвазия *L. intestinalis* отражалась на состоянии антиокислительной системы: у молодых рыб ОАА снизилась на 16.3 %, тогда как у взрослых — на 18.7. При заражении рыб лигулидами наблюдалась обратная корреляция между изменением ОАА и содержанием МДА: снижение антиокислительной активности у молодых рыб до 12.54 л × мл<sup>-1</sup> × мин<sup>-1</sup> и до 16.06 л × мл<sup>-1</sup> × мин<sup>-1</sup> у взрослых коррелировало с повышением концентрации МДА соответственно до 4.14 и 6.13 нМоль/г.

Таблица 2

Результаты исследования липидного обмена селезенки леща при разном уровне его инфицированности *Ligula intestinalis*

Table 2. The results of the investigation of lipid exchange in the spleen of bream under different levels of the infestation by *Ligula intestinalis*

Показатель	Группа подлещиков (4+—5+)			Группа взрослых лещей (8+—9+)		
	I	II	III	IV	V	VI
Фосфолипиды	47.7	47.5	45.7*	46.1	42.2**	41.7**
Холестерин	7.5	9.4*	14.4*	8.9	11.5**	12.4**
НЭЖК	3.8	6.1*	6.0*	4.8	8.8**	9.2**
Триацилглицерины	35.3	33.1*	31.3*	37.0	34.8**	35.1**
Эфиры стероинов	4.8	3.4*	2.1*	3.0	2.5	1.5*
Углеводороды	0.9	0.5	0.5	0.2	0.2	0.1
МДА	3.18	3.32	5.16*	4.55	6.06**	6.21**
ОАА	14.98	14.22*	10.87*	19.07	15.88**	16.27**

Примечание. I — непораженные подлещики (контроль); II — зараженные, имеющие по 1 лигуле; III — зараженные, имеющие по 6 лигул; IV — взрослые непораженные рыбы (контроль); V — зараженные, имеющие по 1 лигуле; VI — зараженные, имеющие по 6 лигул; МДА — содержание малонового диальдегида, нМоль/г; ОАА — общая (интегральная) антиокислительная активность,  $л \times мл^{-1} \times мин^{-1}$ ; \* — достоверно относительно I группы при  $P < 0.05$ ; \*\* — достоверно относительно IV группы при  $P < 0.05$ .

Сравнение показателей липидного обмена у рыб с разным уровнем индивидуальной инфицированности показывает, что и у молодых, и у взрослых рыб более сильное влияние лигулид на организм хозяина проявляется при наличии большего числа полостных паразитов (табл. 2). Соотношение липидных фракций изменилось у всех зараженных рыб при наличии в полости рыб как одного, так и шести паразитов. В группе молодых рыб характеристики уровня МДА и ОАА менее всего отклонились от контрольных отметок при наличии 1 червя, а при 6 червях отличия показателей проявились в большей степени; в группе взрослых лещей эти же показатели отклонились от контроля сильнее по сравнению с молодыми как при 1, так и при 6 паразитах, причем у более инфицированных лещей отличия показателей МДА и ОАА были существеннее.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что в основе воздействия *L. intestinalis* на организм леща лежит изменение липидного обмена и уровня окислительно-восстановительных процессов. Повышению общего метаболизма липидов, сопровождающемуся перераспределением липидных фракций (снижение наиболее весомых структурных фосфолипидов и запасных триацилглицеринов и возрастание доли НЭЖК и холестерина), сопутствовало снижение антиокислительной активности. Присутствие в селезенке зараженных рыб избытка НЭЖК и холестерина, принимающих участие в возникновении целого ряда патологических состояний, характеризует серьезные нарушения липидного обмена (Шатуновский, 1980; Гершанович и др., 1991). Сдвиг липидных фракций, в частности, снижение доли фосфолипидов, может быть связан с нарушением синтеза фосфолипидов из-за недостаточного образования или поступления в печень рыб липотропных веществ (холин, метионин и др.). Известно, что при их дефиците значительно снижается синтез фосфолипидов из нейтрального жира (глицерина, жирных кислот). Одновременно со снижением структурных фосфолипидов отмечено снижение запасных энергетических липидов — триацилглицеринов, недостаток которых в селезенке зараженных рыб сви-

детельствует об общем истощении организма. Важно отметить, что фосфолипиды и холестерин являются основными компонентами биологической мембраны, и их количественное изменение приводит к изменению свойств биомембран (проницаемости, степени устойчивости, микровязкости и др.). Выявленная пониженная антиокислительная активность у зараженных рыб по сравнению с интактными свидетельствует о том, что под влиянием паразитов содержание антиоксидантов у рыб снижается. Изменения в системе липидного метаболизма приводят к активации свободнорадикальных и перекисных реакций, к изменению равновесия окислительного гомеостаза и к серьезным нарушениям жизнедеятельности клеток и организма хозяина (Владимиров, Арчаков, 1972; Силкина, Микряков, 2000; 2003; Силкина, Жарикова, 2003).

Переокисное окисление липидов, характеризуя одну из важных сторон липидного обмена, является активным метаболическим и регуляторным фактором. ПОЛ, отражая накопление промежуточных метаболитов и физиологически активных интермедиаторов, свидетельствует об ответной защитной реакции организма на физиолого-биохимическом уровне на действие стрессорных неспецифичных для организма факторов и о характере течения общего адаптационного синдрома по Селье (Владимиров, Арчаков, 1972; Прайор, 1979; Winston, 1991; Грубинко, Леус, 2001). При нормальных условиях ПОЛ осуществляется на определенном стационарном для каждого живого организма уровне благодаря системе антиоксидантной защиты (АЗ), обеспечивающей детоксикацию продуктов перекисления липидов. Для каждого периода жизни рыб характерно определенное соотношение процессов ПОЛ и АЗ, поскольку окислительные и антиоксидантные системы, являющиеся важными звеньями и составляющими гомеостаза организма, способны хорошо защищать организм от последствий колебания неблагоприятных факторов среды. При воздействии экстремальных факторов (стрессорных и других неспецифичных для организма) равновесие в системе ПОЛ—ОАА смещается в сторону усиления ПОЛ.

Из материалов исследований следует, что инвазия плероцеркоидами *L. intestinalis* вызывает существенные изменения обменных процессов в организме хозяина, приводит к усилению перекисного окисления липидов. Направленность изменений показателей перекисления липидов, вызываемых инвазией *L. intestinalis*, у леща разного возраста и с разной индивидуальной инфицированностью имеет черты сходства, но можно предполагать, что большее число паразитов, находящихся в полости тела взрослого хозяина, оказывают на организм рыб более стрессирующее воздействие. Более сильные отклонения исследованных показателей у зараженных лигулидами взрослых рыб по сравнению с таковыми неполовозрелых могут быть связаны также с изменением уровня защитных функций с возрастом, изменением состояния иммунной системы у взрослых особей по сравнению с молодыми (Микряков, 1984; Леутская, 1990). Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов, показавших изменение липидного обмена в организме рыб, пораженных другими видами паразитов, а также при токсических воздействиях разной природы и других стрессирующих факторах биотической и абиотической природы (Гурьянова, 1980; Winston, 1991; Fiho, 1996; Микряков и др., 2001). Выявленные различия липидных показателей у пораженных гельминтами рыб отражают нарушения липидного обмена, сопровождающегося перераспределением липидных компонентов, интенсификацией свободнорадикальных и перекисных процессов, снижением содержания структур антиоксидантной защиты. Подобные

изменения являются характерными для рыб, подвергающихся воздействию стресс-факторов разной природы (Барабой, 1995; Грубинко, Леус, 2001; Микряков и др., 2001).

Таким образом, анализ полученных результатов и сравнение их с литературными источниками свидетельствует, что отклонения, выявленные в липидном обмене селезенки инвазированных рыб, соответствуют реакции на воздействие стресс-факторов. Негативное воздействие плероцеркоида на организм рыбы проявляется в сдвиге интенсивности обмена липидов, а также в поддержании равновесного состояния окислительно-восстановительных процессов, связанных с реализацией защитной функции липидов, что может иметь место при ответе организма на дефицит антиоксидантов. Описанные выше изменения оказывают отрицательное влияние на жизненно важные функции тканей хозяина и его организм в целом. Анализ полученных данных у зараженных и незараженных рыб разного возраста позволяет сделать вывод, что инвазия лещей плероцеркоидами *L. intestinalis* вызывает изменения в липидном обмене их тканей, а также в поддержании равновесного состояния окислительно-восстановительных процессов. У зараженных рыб снижается адаптационный потенциал, и в тканях развиваются деструктивные процессы, характеризующиеся как состояние окислительного стресса.

#### Список литературы

- Андреева Л. И., Кожемякин Н. А., Кишкун А. А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. 1988. № 11. С. 41—43.
- Барабой В. А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов в сыворотке крови хрящевых и костистых рыб Черного моря // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 1995. Т. 31. № 1. С. 14—20.
- Владимиров Ю. А., Арчаков А. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 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.
- Грубинко В. В., Леус Ю. В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у рыб (обзор) // Гидробиол. журн. 2001. Т. 37, № 1. С. 64—78.
- Гурьянова С. Д. Липидный состав отдельных тканей налима при заражении их гельминтами // Биохимия пресноводных рыб Карелии. Петрозаводск: Наука, 1980. С. 36—40.
- Извекова Г. И. Особенности влияния плероцеркоидов *Ligula intestinalis* на пищеварительную активность леща разных возрастных групп // Паразитология. 1999. Т. 33, вып. 4. С. 330—334.
- Куперман Б. И., Жохов А. Е., Извекова Г. И., Таликина М. Г. Динамика зараженности лигулидами лещей волжских водохранилищ и паразитохозяйинные отношения при лигулезе // Биология внутренних вод. 1997. № 2. С. 41—49.
- Леутская З. К. Некоторые аспекты иммунитета рыб при гельминтозах. М.: Наука, 1990. 210 с.
- Микряков В. Р. Закономерности функционирования иммунной системы пресноводных рыб: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1984. 38 с.
- Микряков В. Р., Балабанова Л. В., Заботкина Т. Б., Лапирова Т. Б., Попов А. В., Силкина Н. И. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука, 2001. 126 с.
- Микряков В. Р., Силкина Н. И. Иммуно-физиологическое состояние леща Рыбинского водохранилища при лигулезе // Итоги научно-практических работ в ихтиопатологии. Информ. бюл. МИК. М., 1997. С. 79—80.
- Прайор У. Роль свободнорадикальных реакций в биологических системах // Свободные радикалы в биологии. М.: Наука, 1979. Т. 1. С. 13—67.

- Семенов В. Л., Ярош А. М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Укр. биохим. журн. 1985. Т. 57, № 3. С. 50—52.
- Силкина Н. И. Сезонная динамика липидов сыворотки крови и ее связь с иммунологической реактивностью рыб: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1988. 17 с.
- Силкина Н. И., Жарикова А. Н. Влияние *Ligula intestinalis* на характер липидного обмена крови хозяина *Abramis brama* // Паразитология. 2003. Т. 37, вып. 3. С. 201—206.
- Силкина Н. И., Микряков В. Р. Характеристика перекисного окисления липидов и перекисного гемолиза эритроцитов у леща *Abramis brama* (L.) Рыбинского водохранилища, зараженного *Ligula intestinalis* и карпа под влиянием кадмия // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре. М.: Наука, 2000. С. 112—113.
- Силкина Н. И., Микряков В. Р. Влияние *Ligula intestinalis* (Cestoda, Pseudophyllidea) на некоторые показатели липидного обмена у промежуточного хозяина *Abramis brama* (L.) // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. Тез. док. Всерос. науч.-практич. конф. Борок, 2003. С. 116—117.
- Силкина Н. И., Микряков В. Р. Некоторые особенности перекисного окисления липидов в системе паразит—хозяин на примере *Ligula intestinalis* (Cestoda, Pseudophyllidea) — *Abramis brama* (L.) // Сб. «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб». Расширенные материалы Всерос. науч.-практич. конф. М., 2004. С. 356—366.
- Чмутов В. К. Хроматография. М.: Химия, 1978. 127 с.
- Шатуновский М. И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 1980. 238 с.
- Barus V., Prokes M. Parasite load of *Ligula intestinalis* plerocercoids in adult bream, *Abramis brama* // Acta Univ. Carol. Biol. 1995. Vol. 39. P. 127—134.
- Fiho W. D. Fish antioxidant defences — A comparative approach // Braz. Journ. Med. Biol. Res. 1996. Vol. 29, N 12. P. 1735—1742.
- Folch J., Lees M., Stanley G. N. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues // Journ. Biol. Chem. 1957. Vol. 226, N 3. P. 497—509.
- Taylor M., Hoole D. *Ligula intestinalis* (L.) (Cestoda: Pseudophyllidea) plerocercoid induced changes in the spleen and pronephros of roach, *Rutilus rutilus* (L.) and gudgeon, *Gobio gobio* (L.) // Journ. Fish Biol. 1989. Vol. 34, N 4. P. 538—596.
- Winston G. W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Compar. Biochem. Physiol. 1991. Vol. 100, N 1—2. P. 173—176.

Институт биологии внутренних вод РАН,  
пос. Борок, Ярославская обл.

Поступила 18 I 2005

## THE EFFECT OF *LIGULA INTESTINALIS* ON SOME LIPID EXCHANGE INDEXES OF THE SPLEEN OF THE HOST, BREAM *ABRAMIS BRAMA* OF DIFFERENT AGE

N. I. Silkina, V. R. Mikrjakov

*Key words:* *Ligula intestinalis*, plerocercoids infection, bream, lipid exchange.

### SUMMARY

The results of the comparative analysis of the spleen in healthy individuals of bream *Abramis brama* and those infected by the *Ligula intestinalis* plerocercoids are given. Two age groups of bream were studied. The comparison was carried out by the index of common lipids (CL), the content of common lipids, the intensity of lipid peroxidation (POL), and the common antioxidant activity (CAA). The dependence of the lipid exchange character in the fishes infected by *Ligula* on age, as well as on different levels of the infestation is demonstrated.