

УДК 597.552.1.083.3

ВЛИЯНИЕ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ НА ЛИЗОЦИМ САМЦОВ ЩУКИ *Esox lucius*

© 2023 г. М. Ф. Субботкин^а, *, Т. А. Субботкина^а

^аИнститут биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук,
пос. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., Россия

*e-mail: smif@ibiw.ru

Поступила в редакцию 11.02.2022 г.

После доработки 07.02.2023 г.

Принята к публикации 10.02.2023 г.

Концентрация лизоцима в печени, почках, селезенке и сыворотке крови, а также размеры иммунных органов у самцов щуки *Esox lucius* L. варьируют в разные сезоны года. Концентрации фермента в органах и сыворотке слабо связаны между собой. По абсолютным значениям массы органы демонстрируют сильную взаимосвязь между собой, однако между их соматическими индексами корреляция очень слабая. Размеры органов влияют на концентрацию лизоцима в самих органах и сыворотке. Печень играет главную роль во внутригодовых флуктуациях концентрации лизоцима во всех органах и сыворотке. Почка оказывает противоположное печени, выравнивающее действие на концентрацию фермента в печени и сыворотке. Наиболее глубокие морфофизиологические изменения органов и лизоцима как показателя неспецифического иммунитета совпадают с периодом размножения рыб.

Ключевые слова: концентрация лизоцима, сыворотка, органы, соматические индексы, сезонность, корреляция

DOI: 10.31857/S0320965223040241, EDN: SGDFCB

Изменения внешних факторов и физиологического состояния рыб вызывают сложные преобразования, которые обнаруживаются в организме на биохимическом и морфологическом уровне. Это в равной степени распространяется на иммунную систему. Флуктуации абсолютных и относительных размеров органов под влиянием внутренних физиологических процессов имеют сезонный характер, связаны с экологией и полом рыб (Medford, Mackay, 1978; Kortet et al., 2003; Hansson et al., 2006; Bennett, Janz, 2007; Rohlenova et al., 2011).

Лизоцим как один из компонентов неспецифического иммунитета — очень лабильный показатель, его активность или содержание в тканях и жидкостях рыб находятся под влиянием многих внутренних и внешних причин (Subbotkin, Subbotkina, 2018). Вероятно, при “стабильном” иммунном состоянии у здоровых рыб на показатели иммунитета должны влиять естественные физиологические изменения органов. Возникает вопрос — как могут естественные изменения иммунных органов влиять на лизоцим у самцов щуки *Esox lucius* разного

физиологического состояния и в разные сезоны годового цикла?

Чтобы ответить на этот вопрос, самцов щуки отлавливали в прибрежной зоне Рыбинского водохранилища (около пос. Борок и в р. Сутка около с. Верхне-Никульское) в сентябре–октябре, декабре 2016 г. и в марте–мае 2017 г. Сразу после отлова их обездвигивали резким ударом по голове и брали кровь из хвостовой вены. Рыб помещали в термос со льдом и доставляли в лабораторию, где их взвешивали и измеряли длину до конца чешуйного покрова. Анализировали иммунные органы (печень, почки и селезенку) для определения соматических индексов и концентрации лизоцима в их тканях. Из взятой крови получали сыворотку, в которой определяли концентрации лизоцима. Чтобы исключить влияние возрастных и половых особенностей, исследовали только взрослых самцов или особей, входящих в половую зрелость (размером 31–57.5 см). В разные сезоны годового цикла было проанализировано 36 особей.

Концентрацию лизоцима в органах и сыворотке крови определяли методом “диффузии в агар” и выражали в мкг/г ткани органа и мкг/мл сыворотки в соответствии с ранее опубликованной ра-

Сокращения: И_{печ.}, И_{поч.}, И_с — индексы печени, почек и селезенки соответственно; СИО — сумма индексов органов.

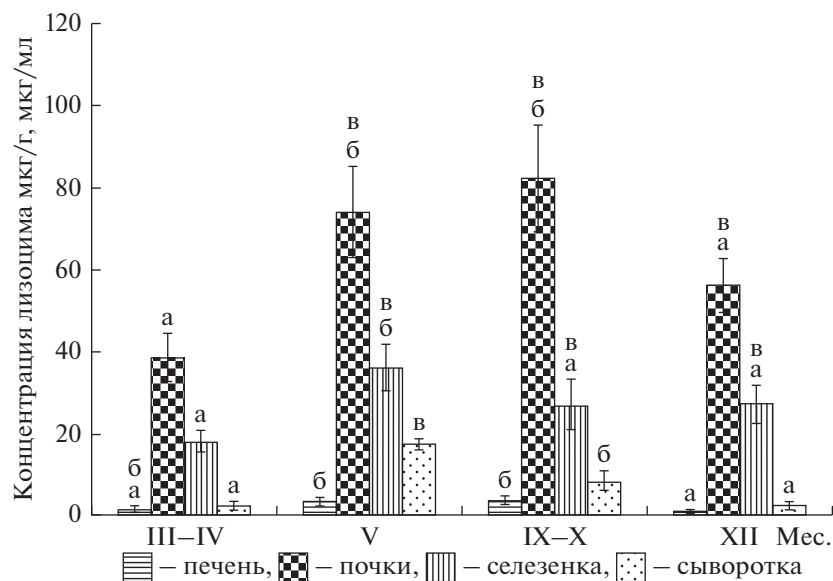


Рис. 1. Концентрация лизоцима в иммунных органах и сыворотке самцов шуки. а, б, в над столбцами — достоверные различия для одних и тех же органов и тканей ($p < 0.05$).

ботой (Subbotkina, Subbotkin, 2003). Размеры органов оценивали посредством соматических индексов, использующихся в эколого-физиологических исследованиях рыб (Смирнов и др., 1972). Соматические индексы органов ($I_{\text{печ}}$, $I_{\text{поч}}$ и $I_{\text{с}}$) рассчитывали по формуле:

$$IO = \frac{m_o, \text{ г}}{m, \text{ г}} \times 100,$$

где m_o — масса органа, m — масса тела без внутренних органов.

Для оценки внутригодовых вариаций относительных значений иммунных органов их соматические индексы суммировали и определяли долю каждого органа от суммы индексов трех органов (СИО):

$$\text{Доля органа} = \frac{IO}{\text{СИО}}.$$

Этот показатель позволяет оценить изменение относительной массы органа на фоне других исследуемых органов.

Результаты представлены как средняя $\pm$ стандартная ошибка. Статистические значения различий определяли по критерию Стьюдента при $p < 0.05$. Для определения взаимосвязи показателей рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона (r). Достоверность коэффициента корреляции оценивали при $p < 0.05$.

Наибольшая концентрация лизоцима обнаружена в почках, где фермента было в 2–3 раза больше, чем в селезенке, и в 21–50 раз больше, чем в печени. Самый широкий диапазон варьирования количества фермента в исследованные сезоны, достигавший почти семикратных значе-

ний, обнаружен в сыворотке, в печени он вдвое меньше, наименьший — в почках и селезенке (рис. 1).

Сезонные флуктуации проявлялись следующим образом: в марте–апреле перед нерестом концентрация фермента была низкая или самая низкая во всех источниках: в органах и сыворотке. После нереста, в мае, все значения существенно возросли, максимально — в сыворотке. Осенью концентрация лизоцима была значительно снижена только в сыворотке ($p < 0.05$). Зимой, в декабре, концентрация фермента понизилась до уровня, сопоставимого с весенними значениями в марте–апреле и в органах, и в сыворотке. Следовательно, сезонные колебания концентрации лизоцима в органах и сыворотке несинхронные и различаются диапазоном.

Концентрации лизоцима в сыворотке и органах слабо коррелировали между собой ($r = 0.34$ – 0.42). Корреляция такого же уровня обнаружена между концентрацией фермента в селезенке и почках, а также в селезенке и печени. Концентрация лизоцима в печени и сыворотке имела обратную связь средней силы с массой печени ($r = -0.55$ и $r = -0.51$ соответственно, $p < 0.05$) (рис. 2).

Масса почек у самцов шуки показала высокую корреляцию с массой селезенки ($r = 0.87$), с массой печени связь была слабее ($r = 0.69$), еще ниже — между массой печени и селезенки ($r = 0.48$) ($p < 0.05$). Однако соматические индексы органов коррелировали между собой слабо (от $r = 0.22$ до $r = -0.38$, $p > 0.05$).

При сравнении с другими органами, печень обладает самыми высокими соматическим ин-

дексом. Его максимальное значение было зарегистрировано в марте–апреле (табл. 1). $I_{\text{печ}}$ в этот период более чем в 3 раза превышал $I_{\text{поч}}$, в другие сезоны года эти показатели были сопоставимы. Селезенка у щуки во все сезоны имела наиболее низкий индекс — в 4–5 раз меньше $I_{\text{поч}}$ и в 5–15 раз меньше $I_{\text{печ}}$. Внутригодовая изменчивость иммунных органов неодинакова. $I_{\text{поч}}$ показал несущественные изменения ($p > 0.05$), тогда как различия $I_{\text{печ}}$ достигали почти трехкратных величин. I_c также варьировал, но в меньшей степени, чем $I_{\text{печ}}$.

Концентрация лизоцима в органах отрицательно коррелировала с $I_{\text{печ}}$, что в наибольшей степени проявилось у самой печени ($r = -0.54$) ($p < 0.05$). В почках и селезенке связь концентрации фермента с соматическими индексами была слабая или отсутствовала.

Лизоцим сыворотки также показал обратную связь среднего уровня с $I_{\text{печ}}$ ($p < 0.05$) и низкую с $I_{\text{поч}}$ и I_c ($p > 0.05$).

Абсолютные значения органов и их соматические индексы существенно изменяются в разные сезоны годового цикла. Масштаб таких изменений неодинаков, что приводит к варьированию массовой доли органов в организме как в целом, так и относительно друг друга. Для оценки роли отдельных органов проанализированы изменения СИО и долей органов (табл. 1). Внутригодовая вариация СИО оказалась менее двухкратного диапазона, это меньше, чем у печени, доминирующей по массе среди иммунных органов. Тем не менее, направленность изменения СИО совпадала с таковой $I_{\text{печ}}$ ($r = 0.99$), однако связь с $I_{\text{печ}}$ и I_c отсутствовала. Также высокая корреляция обнаружена между СИО и массой печени ($r = 0.84$). СИО показала отрицательную корреляцию среднего уровня с концентрацией лизоцима в сыворотке ($p < 0.05$) и почти одинаковые, но более сла-

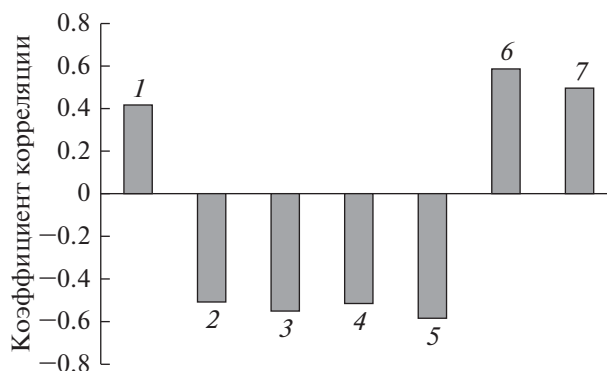


Рис. 2. Корреляция концентрации лизоцима сыворотки самцов щуки ($p < 0.05$) с концентрацией лизоцима в селезенке (1), массой печени (2), с $I_{\text{печ}}$ (3), СИО (4), с долей печени (5), долей почек (6), долей селезенки (7).

бые связи с концентрацией фермента в органах: от $r = -0.42$, $p > 0.05$ в печени до $r = -0.38$, $p > 0.05$ в почках.

Доли органов в разные периоды годового цикла оказались неодинаковыми. Следует отметить, что $I_{\text{поч}}$ в разные сезоны был наиболее стабильным показателем, однако доля почек среди иммунных органов значительно варьировала ($p < 0.05$) (табл. 1). Доля органа была наиболее высокая у печени, самая низкая — у селезенки. Доля печени, доминирующего по массе органа, варьировала меньше, чем доли почек и селезенки. Внутригодовые изменения доли печени имели очень высокую положительную корреляцию с $I_{\text{печ}}$ ($r = 0.94$). Также тесная связь обнаружена между долей селезенки и I_c ($r = 0.79$). Доля печени демонстрировала высокую положительную корреляцию с СИО ($r = 0.89$), у долей почек и селезенки такая связь, наоборот, была отрицательная ($r = -0.89$ и $r = -0.78$ соответственно). Концентрация лизоцима в печени оказалась в обратной зависимости от доли печени

Таблица 1. Морфофизиологические показатели органов самцов щуки

Месяцы	n	Соматический индекс			СИО	Доля индекса		
		$I_{\text{печ}}$	$I_{\text{поч}}$	I_c		$I_{\text{печ}}$	$I_{\text{поч}}$	I_c
IX–X	6	1.07 ± 0.05^a	0.83 ± 0.03	0.21 ± 0.02^b	2.11 ± 0.06^a	0.51 ± 0.02^a	0.40 ± 0.01^a	0.10 ± 0.01^b
XII	8	2.40 ± 0.21^b	0.86 ± 0.04	0.20 ± 0.01^b	3.46 ± 0.24^b	0.69 ± 0.02^b	0.26 ± 0.02^b	$0.06 \pm 0.01^{a, b}$
III–IV	14	3.01 ± 0.19^g	0.88 ± 0.04	0.15 ± 0.01^a	4.05 ± 0.18^b	0.74 ± 0.02^b	0.22 ± 0.02^b	0.04 ± 0.002^a
V	8	1.48 ± 0.14^b	0.94 ± 0.06	$0.20 \pm 0.03^{a, b}$	2.62 ± 0.12^b	0.56 ± 0.03^a	0.36 ± 0.02^a	$0.08 \pm 0.01^{b, b}$

Примечание. СИО — сумма индексов органов; n — число исследованных рыб. В столбцах различными надстрочными индексами обозначены достоверные различия для одного и того же показателя.

($r = -0.65$). У почек и селезенки эти показатели связаны слабо ($p > 0.05$). Концентрации фермента в почках и селезенке также имели слабую отрицательную связь и с долей печени ($p > 0.05$), однако доли почек и селезенки положительно коррелировали с концентрацией лизоцима в печени ($r = 0.63$ и $r = 0.55$ соответственно, $p < 0.05$). Концентрация сывороточного лизоцима имела средний уровень связи с долей почек, и такой же уровень, но отрицательную связь, с долей печени (рис. 2). Это может указывать на разнонаправленное, но одинаковое (возможно, нивелирующее) влияние размеров почек и печени на концентрацию лизоцима в сыворотке крови у самцов щуки.

Изучение влияния сезонности на иммунитет актуально и для рыб в природе, и для объектов аквакультуры. Несмотря на большое количество исследований, относящихся к этой области, отсутствие общей закономерности иммунного ответа показывает, что у каждого вида рыб или группы родственных видов может быть свой уникальный сезонный иммунный ответ (Papezikova et al., 2016; Subbotkin, Subbotkina, 2016). Щука *E. lucius* относится к видам, которые непрерывно питаются в течение года, хотя и с разной интенсивностью. Она почти не питается только во время нереста, летом интенсивность питания снижается из-за смены зубов (Никольский, 1971). Поскольку нерест рыб происходит в году однократно, питание можно считать постоянно действующим фактором. Настоящее исследование охватывают три разных периода годового цикла щуки: март–апрель (завершение развития гонад в преднерестовый период); май (период после нереста, когда происходит восстановление гонад, освободившихся от половых продуктов); сентябрь–октябрь и декабрь (периоды активного питания, накопления резервных веществ и начала роста гонад).

Среди физиологических показателей наиболее глубокие флуктуации, диапазон которых составляет трехкратную величину и достигает максимальных значений весной перед нерестом, были обнаружены в печени. Сезонные различия в $I_{\text{печ}}$ наблюдали и у молоди щуки, с увеличением индексов весной по сравнению с предыдущей осенью (Bennett, Janz, 2007). Такое изменение печени свойственно и другим рыбам (Смирнов и др., 1971; Фунг и др., 2013). Многие виды рыб размножаются при повышении температуры в водоеме, но имеются данные, свидетельствующие, что $I_{\text{печ}}$ не чувствителен к действию температуры воды (Suja et al., 2009). По мнению Ханссон и др. (Hansson et al., 2006), на $I_{\text{печ}}$ влияют такие факторы, как пищевое поведение, температура, продолжительность дня и время года. Однако Медфорд и Маккей (Medford, Mackay, 1978) доказывали, что у щуки масса печени и содержание питательных веществ

более тесно связаны с ростом гонад, чем с интенсивностью питания.

Соматический индекс почек у самцов щуки оказался стабильным в исследованные сезоны года при разном физиологическом состоянии. Экспериментально показано, что у объектов аквакультуры $I_{\text{поч}}$ может меняться в зависимости от корма и кормовых добавок (Feng et al., 2011; Qiao et al., 2013).

Селезенка считается другим важным кроветворным и иммунным органом. В исследованные сезоны года у самцов щуки обнаружена относительно невысокая изменчивость $I_{\text{с}}$. Подобно щуке, у самцов плотвы *Rutilus rutilus* L. минимальные размеры селезенки наблюдали во время нереста, после чего быстро шло ее восстановление (Kortet et al., 2003). У карпа *Cyprinus carpio* L. также была обнаружена сезонная изменчивость $I_{\text{с}}$, самые высокие значения отмечали в начале лета и последующее их снижение — в конце сезона (Rohlenova et al., 2011).

В период максимально высокого $I_{\text{печ}}$ у самцов щуки концентрация лизоцима в почках, селезенке и сыворотке была самая низкая. Такое снижение может быть обусловлено компромиссным перераспределением энергетических затрат между иммунитетом и размножением (Viney et al., 2005). Самая низкая активность фермента весной обнаружена в сыворотке у радужной форели *Oncorhynchus mykiss* L. (Morgan et al., 2008). У самок каспийского кутума *Rutilus frisii kutum* Kamensky, перед нерестом также наблюдали наиболее низкие концентрации сывороточного лизоцима, однако у самцов с осени и до нереста в мае таких различий не обнаружено (Ghafoori et al., 2014). В тканях печени, селезенке и почек кутума значительное снижение уровня фермента с октября по март отмечено у обоих полов. В дальнейшем, в процессе завершения развития половых продуктов в апреле–мае было зарегистрировано резкое увеличение количества лизоцима в органах (Heidari, Farzadfar, 2015). Сезонные изменения концентрации или активности лизоцима у рыб имеют видовые и половые особенности, которые обусловлены физиологическими процессами в организме, как связанными с температурой окружающей среды, так и независимыми от нее (Subbotkin, Subbotkina, 2016).

Выводы. Выявлено, что у самцов щуки внутригодовые вариации концентрации лизоцима в органах и сыворотке имеют слабую положительную корреляционную связь. Соматические индексы органов также демонстрируют слабую взаимосвязь друг с другом, но более сильную с концентрацией лизоцима в самих органах и сыворотке. Характер взаимозависимости между органами и ферментом сложный, однако становится понятной доминирующая при этом роль печени. Наиболее глубокие изменения органов в морфофизиологическом плане и лизоцима как иммунного пока-

зателя в них и в сыворотке крови, обнаружены в преднерестовый и после нерестовый периоды. Это может свидетельствовать о непосредственном влиянии процесса размножения на такие изменения. Показано, что при анализе результатов воздействий каких-либо факторов, вызывающих изменение концентрации или активности лизоцима в организме рыб, необходима адекватная морфофизиологическая оценка иммунной системы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема АААА-А18-118012690222-4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Никольский Г.В. 1971. Частная ихтиология. М.: Высш. школа.
- Смирнов В.С., Божко А.М., Рыжков Л.П., Добринская Л.А. 1972. Применение метода морфофизиологических индикаторов в экологии рыб // Тр. СевНИОРХ. Т. 7. Петрозаводск, Карелия.
- Фунг Н.Д., Распопов В.М., Барабанов В.В., Мищенко А.В. 2013. Гепатосоматический индекс осетра, белуги и севрюги в речной период жизни // Вест. Астрахан. гос.-техн. ун-та. Сер.: Рыбн. хоз-во. № 1. С. 154.
- Bennett P.M., Janz D.M. 2007. Seasonal changes in morphometric and biochemical endpoints in northern pike (*Esox lucius*), burbot (*Lota lota*) and slimy sculpin (*Cottus cognatus*) // Freshwater Biol. V. 52. № 10. P. 2056. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01819.xno>
- Feng L., Huang H.-H., Liu Y. et al. 2011. Effect of dietary thiamin supplement on immune responses and intestinal microflora in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) // Aquacult. Nutr. V. 17. № 5. P. 557. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00851.x>
- Ghafoori Z., Heidari B., Farzadfar F. et al. 2014. Variations of serum and mucus lysozyme activity and total protein content in the male and female Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky 1901) during reproductive period // Fish Shellfish Immunol. V. 37. № 1. P. 139. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.01.016>
- Hansson T., Lindesjoo E., Forlin L. et al. 2006. Long-term monitoring of the health status of female perch (*Perca fluviatilis*) in the Baltic Sea shows decreased gonad weight and increased hepatic EROD activity // Aquat. Toxicol. V. 79. № 4. P. 341. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.07.001>
- Heidari B., Farzadfar F. 2015. Effects of temperature and gonadal growth on the lysozyme level of immune tissues in the male and female Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*) // Aquacult. Res. V. 48. № 2. P. 1. <https://doi.org/10.1111/are.12886>
- Kortet T.R., Taskinen J., Sinisalo T. et al. 2003. Breeding-related seasonal changes in immunocompetence, health state and condition of the cyprinid fish, *Rutilus rutilus* L. // Biol. J. Linnean Soc. V. 78. № 1. P. 117. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2003.00136.x>
- Medford B.A., Mackay W.C. 1978. Protein and lipid content of gonads, liver, and muscle of northern pike (*Esox lucius*) in relation to gonad growth // J. Fish Res. Board Canada. V. 35. № 2. P. 213. <https://doi.org/10.1139/f78-035>
- Morgan A.L., Thompson K.D., Auchinachie N.A. et al. 2008. The effect of seasonality on normal haematological and innate immune parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* L. // Fish Shellfish Immunol. V. 25. № 6. P. 791. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.05.011>
- Papezikova I., Mares J., Vojtek L. et al. 2016. Seasonal changes in immune parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and brook trout × Arctic charr hybrids (*Salvelinus fontinalis* × *Salvelinus alpinus*) // Fish Shellfish Immunol. V. 57. P. 400. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.048>
- Qiao Q., Liang H., Zhang X. 2013. Effect of cyanobacteria on immune function of crucian carp (*Carassius auratus*) via chronic exposure in diet // Chemosphere. V. 90. № 3. P. 1167. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere>
- Rohlenova K., Morand S., Hyršl P. et al. 2011. Are fish immune systems really affected by parasites? An immunoeological study of common carp (*Cyprinus carpio*) // Parasite Vector. V. 4. P. 120. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-120>
- Subbotkin M.F., Subbotkina T.A. 2016. Variability of the lysozyme content in bream from the Rybinsk Reservoir in different seasons of the annual cycle // Biol. Bull. V. 43. № 3. P. 257. <https://doi.org/10.1134/S1062359016020096>
- Subbotkin M.F., Subbotkina T.A. 2018. Effects of environment and physiological state of an organism on the activity and content of lysozyme in fishes of the family Cyprinidae: A Review // Inland Water Biol. V. 11. P. 184. <https://doi.org/10.1134/S1995082918020037>
- Subbotkina T.A., Subbotkin M.F. 2003. Lysozyme content in organs and blood serum in various species in the Volga River // J. Evol. Biochem. Physiol. V. 39. № 5. P. 537. <https://doi.org/10.1023/B:JOEY.0000015961.99374.62>
- Suja B., Phillips H., Lochmann R. et al. 2009. Effect of temperature on growth, feed utilization, and immune status of channel catfish in a recirculating system // N. Am. J. Aquac. V. 71. № 1. P. 64. <https://doi.org/10.1577/A07-101.1>
- Viney M.E., Riley E.M., Buchanan K.L. 2005. Optimal immune responses: immunocompetence revisited // TRENDS in Ecology and Evolution. V. 20. № 12. P. 665. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.10.003>

The Effect of Morphophysiological Changes in Immune Organs on Lysozyme in Male Pike *Esox lucius*

M. F. Subbotkin^{1, *} and T. A. Subbotkina¹

¹*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences,
Borok, Nekouzskii raion, Yaroslavl oblast, Russia*

**e-mail: smif@ibiw.ru*

The concentration of lysozyme in liver, kidney, spleen and serum, as well as the size of immune organs in male pike *Esox lucius* L. vary in different seasons of year. The enzyme concentrations in organs and serum are weakly interrelated. The organs by the absolute values of mass show a strong relationship with each other, while the correlation between their somatic indices is very weak. The size of the organs affects the concentration of lysozyme in the organs and serum. The liver plays a major role in annual fluctuations of lysozyme concentration in all the organs and serum. Kidney has a leveling effect on the concentration of the enzyme in liver and serum, whereas liver has the opposite effect. The most profound morphophysiological changes in organs and lysozyme as an indicator of nonspecific immunity coincide with the reproduction period of fish.

Keywords: concentration of lysozyme, serum, organs, somatic indices, seasonality, correlation