

ФИЗИОЛОГИЯ
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 597.552-1.05

ВНУТРИГОДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ОРГАНОВ ИММУННОЙ
СИСТЕМЫ И СОДЕРЖАНИЯ ЛИЗОЦИМА У САМЦОВ ЩУКИ *Esox lucius* L.

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

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
Ярославская обл., Некоузский р-н., пос. Борок, 152742 Россия

@E-mail: smif@ibiw.ru

Поступила в редакцию 17.02.2022 г.

После доработки 18.03.2022 г.

Принята к публикации 04.04.2022 г.

Изучали влияние физиологического состояния на концентрацию лизоцима в печени, почках, селезенке и сыворотке крови, а также общее количество фермента в органах, у самцов щуки *Esox lucius* L., 1758 в разных условиях годового цикла. Обнаружена разнонаправленная внутригодовая динамика соматических индексов органов и количественных показателей лизоцима в тканях и органах рыб, зависящая от температурного режима водоема. Несмотря на значительные изменения размеров печени и концентрации лизоцима, общее количество фермента в органе – лизоцимный индекс, оставалось постоянным. Подобный результат обнаружен и для селезенки. При минимизации влияния температурного фактора в условиях низких температур показатели печени сменились на противоположные, а в почках остались без изменений. Такой температурный режим не влиял на показатели селезенки и концентрацию фермента в сыворотке. При существенных различиях по концентрации фермента и размерам между печенью и селезенкой их лизоцимные индексы были показателями одного уровня. Стадии зрелости гонад влияли на индекс печени и количество лизоцима в почках, но корреляция фермента почек со зрелостью не достоверна. Лизоцим почек и показатели селезенки коррелировали с массой рыб без органов, хотя масса и длина рыб не были влияющими факторами. Размер почек, в отличие от селезенки, не влиял на фермент в тканях рыб. Концентрация фермента в печени и почках, и лизоцимный индекс почек были в обратной корреляции с размером печени. Выявлен сложный характер взаимосвязей фермента в органах, при котором количество лизоцима в одном органе могло влиять на количество фермента в другом. Не обнаружено связи концентрации сывороточного лизоцима с морфофизиологическими параметрами рыб в условиях стабильно низких температур водоема.

Ключевые слова: лизоцим, органы, сыворотка, соматические и лизоцимные индексы, физиологическое состояние, температура, сезон

DOI: 10.31857/S1026347023700166, **EDN:** MXSQXX

Изменения условий среды обитания или физиологического состояния вызывают комплексные изменения в организме рыб. Такие изменения обнаруживаются как на биохимическом, так и морфологическом уровнях. Это в равной степени распространяется и на иммунную систему. Арсенал иммунологических исследований богат различными методическими подходами, что позволяет анализировать иммунитет рыб по многим показателям. В экспериментальных работах оценку влияния каких-либо факторов на иммунитет проводят в сравнении с контрольными особями, которые лишены такого воздействия. Однако в длительных экспериментах контрольные рыбы также могут демонстрировать существенные изменения (Subbotkin, Subbotkina, 2018). Поэтому возникает вопрос о влиянии иных воздействий, которые не контролируются в опыте. Такие воздействия мо-

гут быть вызваны естественными физиологическими процессами развития или адаптации рыб, не зависящими от исследователя. Эти нормальные жизненные процессы сопровождаются изменениями внутренних органов, в том числе выполняющих иммунные функции.

В жизненном цикле рыб абсолютные и относительные размеры органов непостоянны и могут зависеть от размеров тела, а также внутренних физиологических процессов в разные сезоны года (Medford, Mackay, 1978; Hansson *et al.*, 2006; Bennett, Janz, 2007; Rohlenova *et al.*, 2011). Морфофизиологические различия органов иммунной системы могут быть связаны с полом рыб (Kortet *et al.*, 2003). В связи с этим возникает вопрос о влиянии изменений размеров органов, которые могут быть обусловлены естественными причи-

нами или иным воздействием на иммунологические показатели.

Фермент лизоцим — один из активно анализируемых неспецифических иммунных параметров у рыб. Он широко распространен в организме рыб и относится к одному из наиболее изученных показателей неспецифической защиты. Лизоцим — очень лабильный показатель, на флуктуации которого оказывают влияние многие внутренние и внешние факторы. В исследованиях реакции органов иммунной системы и лизоцима можно выделить направления: (а) анализ лизоцима в биологических жидкостях (сыворотка или плазма крови) и в органах (Куровская, Стрилько, 2016, Ren *et al.*, 2019; Tarnawska *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020); (б) анализ лизоцима в сыворотке или плазме крови и морфофизиологических индексов органов иммунной системы (Feng *et al.*, 2011; Qiao *et al.*, 2013; Cornet *et al.*, 2021); (в) анализ лизоцима в сыворотке и органах иммунной системы, а также морфофизиологических индексов этих органов (Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2020).

В настоящее время отсутствуют исследования, в которых изучается влияние изменений размеров органов иммунной системы на уровень лизоцима в этих органах и каких-либо биологических жидкостях. Можно предположить, что при стабильном иммунном состоянии рыб естественные физиологические изменения в органах должны влиять на показатели иммунитета. Однако пока неясно как могут быть взаимосвязаны такие процессы.

Целью настоящей работы является изучение естественной физиологической изменчивости органов иммунной системы и ее влияние на количественные показатели лизоцима рыб. Анализ сезонных изменений у диких рыб, включая половую зрелость, является адекватным подходом для таких исследований. Объектом исследований были самцы щуки Рыбинского водохранилища, отловленные в разные сезоны годового цикла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Самцы щуки были отловлены в прибрежной зоне Рыбинского водохранилища в районе пос. Борок и в р. Сутка, в районе с. Верхне-Никульское. В теплые месяцы образцы крови отбирали на месте, сразу же после вылова рыбы. Затем рыб помещали в термос со льдом и доставляли в лабораторию. В зимние месяцы отбор образцов проводился в лаборатории, куда рыба доставлялась в живом виде, сразу после вылова. Перед отбором крови рыбу обездвигивали резким ударом по голове. Кровь брали из хвостовых сосудов и из нее получали сыворотку. Образцы сыворотки, тканей печени, почек и селезенки до анализа хранились замороженными при -18°C в течение нескольких

суток. У рыб измеряли длину до конца чешуйного покрова, взвешивали для определения общей массы, массы тела без внутренностей, а также определяли стадии зрелости гонад (Сакун, Буцкая, 1963). Печень, почки и селезенку взвешивали по отдельности для определения их соматических индексов. Всего были проанализированы 62 самца, время сбора и морфофизиологические показатели, которых представлены в табл. 1.

Концентрацию лизоцима в печени, почках, селезенке и сыворотке крови определяли методом “диффузии в агар”, как описано нами ранее (Субботкина, Субботкин, 2003). Метод основан на способности фермента лизировать клетки *Micrococcus lysodeikticus* (Schroeter 1872), диспергированные в слое агарового геля. С помощью этого метода одинаково успешно анализируются не только прозрачные жидкости, такие как сыворотка крови, но также мутные и интенсивно окрашенные надосадочные жидкости гомогенатов тканей. Диаметр зоны просветления пропорционален логарифму концентрации лизоцима (Osserman, Lawlor, 1966). Концентрацию лизоцима в исследуемых образцах определяли по калибровочной кривой на основе стандартного препарата из белка куриных яиц и выражали в мкг/г ткани органа и мкг/мл сыворотки крови.

Соматические индексы печени (ИПеч), почек (ИПоч) и селезенки (ИСел) рассчитывали как масса органа/масса тела без внутренних органов $\times 100$.

В нашем исследовании был применен новый подход, который основан на синтезе физиологического и иммунологического анализа. Для этого мы использовали новый показатель, который назвали “лизоцимный индекс органа”.

Лизоцимные индексы печени (ЛИПеч), почек (ЛИПоч) и селезенки (ЛИСел) рассчитывали как концентрация лизоцима в мкг/г ткани органа \times индекс соответствующего органа.

Для оценки внутригодовой вариабельности общего количества лизоцима в исследуемых органах суммировали индексы органов (СИО) и лизоцимные индексы органов (СЛИО).

Роль отдельного органа оценивали как его долю от суммы индексов и рассчитывали как индекс органа/сумма индексов органов.

Данные в статье показаны как средняя \pm стандартная ошибка. В связи с небольшим количеством рыб в отдельных группах рассчитывали непараметрические критерии. Статистические различия определяли по критерию Манна–Уитни, а корреляционные связи по критерию Спирмена (r_s). Возможное влияние факторов на анализируемые показатели щуки оценивали по критерию Краскела–Уоллиса (H). Статистическую значимость критериев оценивали при $p < 0.05$.

Таблица 1. Морфофизиологические показатели рыб

Месяцы	Температура воды, °С*	n	Стадия зрелости	Длина** (l), см	Масса рыб**, (г)		Масса органов**, (г)		
					общая	без внутренних	печень	почки	селезенка
VII	19–23	9	I, I–II	28.5–35.8 31.4 ± 1.2	182–393 267.3 ± 34.3	160–371 248.6 ± 32.9	2.0–4.5 2.8 ± 0.3	0.9–3.5 2.0 ± 0.2	0.3–1.8 0.7 ± 0.2
IX–X	6–13	9	II, II–III	34–48.5 40.3 ± 2.3	255–970 593.3 ± 99.5	230–885 534.7 ± 90.3	2.6–10.4 6.1 ± 1.1	2.4–7.9 4.5 ± 0.7	0.4–2.1 1.2 ± 0.2
XII	0	15	II, II–III, III	45–56 51.5 ± 0.9	860–1820 1307.7 ± 75.1	760–1460 1140.5 ± 59.8	13.3–35.1 26.8 ± 2.1	5.2–12.8 9.2 ± 0.6	1.2–3.2 2.1 ± 0.1
III	0	8	II–III, III–IV	41.5–46 44.7 ± 0.8	615–1050 797.5 ± 43.6	560–927 720.0 ± 37.1	12–18.4 16.2 ± 1.4	5.4–6.7 6.2 ± 0.3	0.5–2.0 1.0 ± 0.2
IV	0–3	13	III–IV, IV, IV–V	41.4–56.5 47.3 ± 1.0	780–1675 993.1 ± 70.1	710–1465 872.5 ± 59.0	16–58.6 28.4 ± 3.2	5.7–10.5 7.3 ± 0.4	0.7–2.7 1.4 ± 0.2
V	7	8	I, II, II–III	36.5–57.5 43.2 ± 2.8	415–1575 764.4 ± 158.1	375–1408 688.5 ± 144.5	5.6–16.6 9.5 ± 1.6	2.6–11.3 6.3 ± 1.1	0.4–3.9 1.5 ± 0.4

* – Буторин и др. 1982; ** – в колонках: в верхней строке диапазон варьирования показателя, в нижней строке средняя ± стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наибольшая концентрация лизоцима обнаружена в почках, далее следуют селезенка > сыворотка > печень. Варьирование количества фермента между минимальными и максимальными средними значениями в течение года более всего проявлялось в сыворотке и могло достигать 11-кратных величин (рис. 1). Сезонная динамика показателя проявлялась таким образом, что в марте-апреле, перед нерестом, концентрация фермента в печени и сыворотке была самая низкая, а в почках пониженная после максимальных зимних значений. После нереста, в мае, все значения показателя возросли и максимально в сыворотке – более чем в 8 раз. В осенние месяцы, при похолодании, произошло снижение концентрации лизоцима в печени и сыворотке, которое продолжилось зимой и далее, до весны. В почках, наоборот, осенью наблюдался рост количества фермента, концентрация которого зимой повысилась до максимального уровня. Концентрация лизоцима в селезенке показала стабильный характер и не различалась во все исследованные месяцы ($p > 0.05$).

Печень, при сравнении с другими органами щуки, обладает наиболее высоким соматическим индексом, который показал самый широкий, почти 3-кратный, диапазон варибельности. Для селезенки характерен самый маленький индекс – в 3–5 раз меньше ИПоч и в 8–11 раз меньше ИПеч. У ИСел, в отличие от ИПеч, наблюдалась противоположная годовая динамика. ИПоч показал стабильность независимо от сезона ($p > 0.05$) и в отдельные периоды был сопоставим с ИПеч

(табл. 2). Следует отметить, что самые высокие соматические индексы селезенки были обнаружены у молоди.

В почках обнаружены самые высокие лизоцимные индексы, которые были в 8–12 раз выше, чем в печени, и в 7–10 раз выше, чем в селезенке. Внутригодовая динамика ЛИПоч и концентрации фермента в почках были сходными, поскольку изменения соматического индекса органа были несущественны. Неожиданным оказался сходный уровень общего количества фермента в печени и селезенке, не смотря на очень большие различия по размерам органов и концентрации лизоцима в них. У ЛИПеч и ЛИСел, напротив, внутригодовая динамика отсутствовала при наличии значительных изменений, как концентрации фермента в органах, так и соматических индексов (табл. 2).

Внутригодовая направленность суммы соматических и лизоцимных индексов органов отражает сходство изменения массы органов и общего количества фермента в некоторые периоды, но только до приближения нерестового сезона (рис. 2).

Роль отдельного органа оценивали как долю от совокупной изменчивости всех трех исследованных. Доля печени, как самого крупного органа, была преобладающей, а ее динамика совпадала с таковой ИПеч. В почках при стабильном характере соматического индекса, доля органа снижалась при увеличении доли печени. Доля селезенки повторяла динамику ИСел, но при большем диапазоне различий максимальных и минимальных значений (табл. 3).

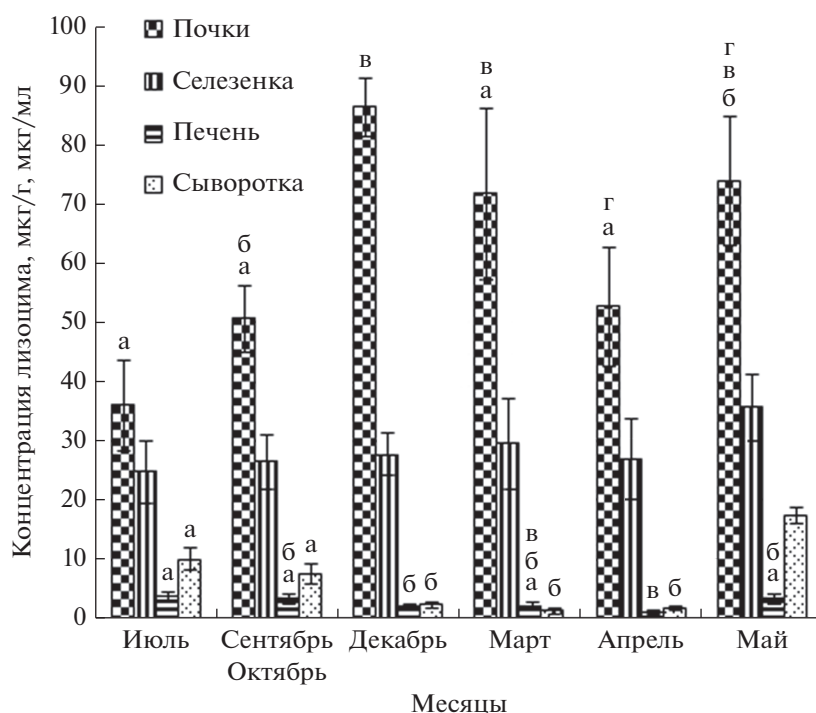


Рис. 1. Концентрация лизоцима в тканях органов и сыворотке самцов шуки. Разные буквы над столбцами обозначают достоверные различия для одного источника фермента в разные месяцы при $p < 0.05$.

Было обнаружено, что почки имеют наиболее высокую долю лизоцима, которая существенно доминирует над долями фермента в печени и селезенке. Внутригодовая динамика долей лизоцима и лизоцимных индексов соответствующих органов были сходными. Доли лизоцима в печени и селезенке, так же как лизоцимные индексы этих органов, были показателями одного уровня (табл. 3).

Прежде чем выяснить взаимосвязь количественных изменений лизоцима и внутренних органов, была выполнена оценка влияния температуры воды на анализируемые показатели. Однофакторный анализ Краскала–Уоллиса показал зависимость концентрации лизоцима в печени, почках, сыворотке и ЛИПоч от температуры воды

в водоеме при анализе всего периода наблюдений. Была обнаружена положительная корреляция концентрации фермента в печени и сыворотке с сезонной динамикой температуры воды ($r_s = 0.26$ и $r_s = 0.66$ соответственно) и отрицательная – концентрации лизоцима в почках и ЛИПоч ($r_s = -0.46$ и $r_s = -0.40$ соответственно). Температурный режим водоема не влиял на концентрацию и общее количество фермента в селезенке. ИПеч оказался в обратной зависимости от этого внешнего фактора ($r_s = -0.6$), а ИСел – в прямой ($r_s = 0.39$). Температура водоема за весь период наблюдений не влияла на ИПоч.

С целью уменьшения влияния фактора температуры, анализируемый период был ограничен

Таблица 2. Соматические и лизоцимные индексы органов

Месяцы	n	Соматические индексы			Лизоцимные индексы		
		печень*	почки	селезенка*	печень	почки*	селезенка
VII	9	1.20 ± 0.11а, б	0.84 ± 0.07	0.29 ± 0.04а	4.48 ± 0.89	30.23 ± 7.24а	6.77 ± 1.05
IX–X	9	1.14 ± 0.09а	0.85 ± 0.02	0.22 ± 0.01а	3.79 ± 0.81	44.23 ± 5.62б	5.58 ± 0.69
XII	15	2.40 ± 0.13в	0.80 ± 0.03	0.18 ± 0.01б	5.65 ± 0.83	69.34 ± 4.28в	5.37 ± 0.89
III	8	2.27 ± 0.14в	0.86 ± 0.03	0.14 ± 0.02в	4.86 ± 1.28	61.38 ± 12.30а, б, в	4.29 ± 1.32
IV	13	3.19 ± 0.19	0.84 ± 0.02	0.17 ± 0.01б, в	3.90 ± 0.93	44.53 ± 8.22а, б	5.10 ± 1.71
V	8	1.48 ± 0.14б	0.94 ± 0.06	0.20 ± 0.03а, б, в	4.75 ± 1.24	71.60 ± 12.94б, в	7.21 ± 1.38

* – разные буквы в колонках обозначают достоверные различия одного органа в разные месяцы при $p < 0.05$.

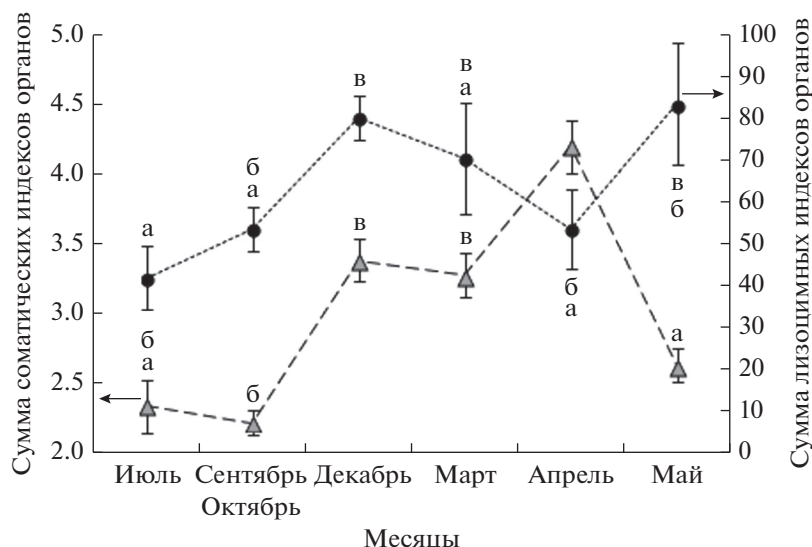


Рис. 2. Внутригодовая динамика суммы соматических и лизосомных индексов органов самцов щуки. Разные буквы в точках линии обозначают достоверные различия в разные месяцы при $p < 0.05$.

декабрем, мартом и апрелем, когда диапазон температурных колебаний минимальный (табл. 1). В это время концентрация лизоцима в почках и ЛИ-Поч также оказались зависимыми от температуры воды в водоеме, сохраняя обратную корреляцию ($r_s = -0.47$ и $r_s = -0.44$ соответственно). В связи с тем, что почки доминировали в общем количестве фермента трех органов с долей 0.61–0.86, сумма ЛИО также показала обратную связь с температурой воды ($r_s = -0.42$). Была обнаружена отрицательная корреляция концентрации лизоцима в печени с температурой воды ($r_s = -0.36$), однако критерий H не выявил непосредственного влияния температуры на иммунный показатель ($p = 0.10$).

Среди морфофизиологических индексов только ИПеч показал зависимость от температуры воды в водоеме, которая теперь была прямая ($r_s = 0.48$). В результате такого изменения СИО и доля печени также получили прямую зависимость ($r_s = 0.44$ и $r_s = 0.40$ соответственно), а доли

селезенки и почек обратную, от этого внешнего фактора ($r_s = -0.43$, $p < 0.05$, и $r_s = -0.32$, $p > 0.05$ соответственно). Доля почек в совокупной массе трех органов, не зависела от размера органа, тогда как изменение размеров печени и селезенки соответствующим образом отражалось на долях этих органов ($r_s = 0.75$ и 0.76). Изменение размера печени также оказывало существенное обратное направленное влияние на долю почек ($r_s = -0.76$).

Анализ влияния физиологического состояния рыб выявил связь количества лизоцима в почках со стадиями зрелости гонад по критерию H , однако корреляция концентрации фермента в органе и ЛИПоч с этим фактором не проявлялась. Среди соматических индексов только размер печени зависел от зрелости гонад ($r_s = 0.61$), что влияло на СИО, доли печени и почек, но не влияло на долю селезенки. Была обнаружена корреляция количественных показателей лизоцима в почках и селезенке, а также ИСел, с массой тела без внутренне-

Таблица 3. Доли соматических и лизосомных индексов органов

Месяцы	n	Доли соматических индексов			Доли лизосомных индексов		
		печень*	почки*	селезенка*	печень	почки*	селезенка*
VII	9	0.51 ± 0.02a	0.36 ± 0.01a	0.12 ± 0.01a	0.13 ± 0.02	0.69 ± 0.05a	0.18 ± 0.03a
IX–X	9	0.51 ± 0.02a	0.39 ± 0.01б	0.10 ± 0.01a, б	0.08 ± 0.02	0.81 ± 0.03a, б	0.11 ± 0.02a, б
XII	15	0.70 ± 0.01б	0.24 ± 0.01в	0.05 ± 0.01в	0.07 ± 0.01	0.86 ± 0.01б	0.07 ± 0.01в
III	8	0.69 ± 0.01б	0.27 ± 0.01в	0.04 ± 0.01г	0.08 ± 0.02	0.86 ± 0.03б	0.07 ± 0.02в
IV	13	0.75 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.04 ± 0.004г	0.09 ± 0.03	0.82 ± 0.04б	0.09 ± 0.02б, в
V	8	0.56 ± 0.03a	0.36 ± 0.02a, б	0.08 ± 0.01б, в	0.06 ± 0.01	0.85 ± 0.03б	0.09 ± 0.02б, в

* – разные буквы в колонках обозначают достоверные различия одного органа в разные месяцы при $p < 0.05$.

стей ($r_s = 0.33-0.39$), но однофакторный анализ не выявил влияния массы тела на эти показатели. Количество фермента в тканях особей и соматические индексы органов не зависели от длины рыб.

Размеры печени и почек не оказывали влияния на лизоцим в органах по критерию H , хотя концентрация фермента в тканях, а также ЛИПоч, показали отрицательную корреляцию с размером печени ($r_s = -0.40...-0.49$). Обнаружено влияние размера печени на физиологические показатели, такие как СИО ($r_s = 0.92$), а также доли печени и почек ($r_s = 0.76$ и $r_s = -0.76$ соответственно). Анализ по критерию H выявил значительное влияние размера селезенки на ЛИСел ($r_s = 0.76$) и долю лизоцима в органе ($r_s = 0.68$). Была обнаружена корреляция концентрации лизоцима в органе ($r_s = 0.51$) и доли лизоцима в почках ($r_s = -0.40$), с ИСел, но по критерию H непосредственное влияние размера селезенки не подтвердилось. Размер селезенки оказывал влияние на физиологические параметры, такие как ИПеч, СИО, доля печени и доля селезенки, но только в последнем случае это имело корреляционную зависимость ($r_s = 0.75$).

В период низких температур и незначительных изменений температурного режима водоема (декабрь–март) обнаружена сильная связь концентрации лизоцима в печени с его общим количеством в органе ($r_s = 0.85-0.87$). Концентрации фермента в почках и селезенке, а также лизоцимные индексы этих органов показали прямую корреляцию с концентрацией фермента в печени ($r_s = 0.39-0.45$), однако однофакторный анализ не выявил зависимость этих показателей от лизоцима печени ($p > 0.05$).

Концентрация лизоцима в почках демонстрировала максимальную связь с лизоцимным индексом органа и общим количеством фермента в трех органах ($r_s = 0.95$). Концентрации лизоцима в печени и селезенке также показали связь с концентрацией фермента в почках ($r_s = 0.48$ и $r_s = 0.53$ соответственно), однако корреляция ЛИСел с концентрацией лизоцима в почках ($r_s = 0.43$) по критерию H оказалась случайной ($p > 0.05$).

Концентрация лизоцима в селезенке показала связь с большинством иммунных параметров, которая в максимальной степени проявлялась с ЛИСел ($r_s = 0.85$). Концентрация фермента в почках и ЛИПоч в меньшей степени коррелировали с селезеночным ферментом ($r_s = 0.54$ и $r_s = 0.57$ соответственно). Концентрация лизоцима печени и ЛИПеч также коррелировали с концентрацией фермента в селезенке ($r_s = 0.48$ и $r_s = 0.41$ соответственно), хотя однофакторный анализ выявил связь только концентрации печеночного лизоцима с ферментом в селезенке. Между концентрацией лизоцима в селезенке и долей фермента в органе выявлена положительная корреляция ($r_s = 0.50$), но по критерию H такая связь не подтверждена ($p > 0.05$). В тоже

время общее количество фермента в трех органах (СЛИО) было связано с концентрацией лизоцима в селезенке ($r_s = 0.65$).

Концентрация лизоцима в печени и почках показала одинаковую корреляцию с ЛИСел ($r_s = 0.48$), однако по критерию H только фермент почек был непосредственно связан с общим количеством лизоцима в селезенке. Концентрация лизоцима в печени ($r_s = 0.43$) и в сыворотке оказались связанными с ЛИПоч, но в последнем случае какой-либо корреляции не обнаружено. Общее количество лизоцима в печени не влияло на концентрацию, не на лизоцимные индексы почек и селезенки. ЛИПеч и ЛИПоч показали корреляцию с ЛИСел ($r_s = 0.42$ и $r_s = 0.50$ соответственно), но если ЛИПоч был прямо связан с ЛИСел, то у печени такой связи по критерию H не выявлено. Общее количество лизоцима в печени и селезенке оказывало влияние на доли фермента в этих органах ($r_s = 0.71$ и $r_s = 0.67$ соответственно). Доля лизоцима в почках не зависела от общего количества фермента в органе, но показала обратную зависимость от количества лизоцима в печени ($r_s = -0.54$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время многочисленные работы по количественному анализу лизоцима отражают конечный результат в фиксированной размерности: г ткани органа, г белка жидкости, мл, л и т.п. (Субботкин, Субботкина, 2020). Фиксированная размерность не учитывает морфофизиологические различия органов в качестве целых структур, их размеры, массу, как внутри одной особи, так и у сравниваемых рыб разных размеров. В практике физиологических исследований для нивелирования размерно-массовых различий органов оценивают их морфофизиологические или соматические индексы. В целях изучения возможного влияния размеров органов иммунной системы на концентрацию лизоцима был использован новый показатель – лизоцимный индекс органа, который: (а) отражает количество лизоцима во всем органе, (б) нивелирует морфофизиологические различия органов и особей, и с этих позиций может быть более объективным количественным критерием.

Исследование показало, что в естественных условиях обитания концентрация лизоцима в органах и сыворотке, а также соматические индексы органов самцов щуки были связаны с термическим режимом водоема. В годовом цикле с диапазоном средних температур более 20°C (Буторин и др., 1982) такая связь в разных органах и тканях была различной. Концентрация лизоцима в печени и сыворотке, а также ИСел, показали прямую

зависимость от температуры, а концентрация лизоцима в почках и ИПеч обратную.

Анализ рыб при отсутствии существенных изменений низкого температурного режима показал, что почки являются наиболее стабильным органом. Соматические индексы органа не зависели от температуры в широком диапазоне варьирования в годовом цикле и более узком зимне-весеннем периоде, а количественные показатели лизоцима всегда демонстрировали обратную зависимость от этого внешнего фактора. Соматический индекс селезенки не зависел от температуры в условиях ее минимальных изменений, а концентрация фермента и его общее количество – ни в годовом цикле, ни в условиях постоянных температур. Общее количество лизоцима в печени, также оказалось несвязанным ни с каким с температурным режимом водоема. Корреляционные связи концентрации фермента и соматического индекса печени при постоянно низкой температуре сменились на противоположные, в сравнении со всем годовым периодом. Соматический индекс органа всегда оставался связанным с температурой водоема. Хуанг с соавт. (Huang *et al.*, 2016) наблюдали двукратное снижение индекса печени у молоди зеркального карпа (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) при более высоких температурах, независимо от рациона, а двухфакторный анализ показал значительное влияние температуры на размер печени рыб. Нгуен с соавт. (Nguyen *et al.*, 2019) обнаружили рост индекса печени у кобии (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) при повышении температуры воды с 30 до 34°C при совместном действии с метионином в корме. Однако повышение температуры с 28.5 до 31.5°C не влияло на индекс печени анемоновой рыбки (*Amphiprion melanopus* Bleeker, 1852) (Miller *et al.*, 2015). В условиях летних температур $21.5 \pm 1.1^\circ\text{C}$ индекс печени *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) увеличивался только под влиянием высокоэнергетического корма (Crowe *et al.*, 2021).

Обратная корреляция концентрации фермента в печени с температурой воды в зимне-весенний период не была связана с этим фактором, а вероятно обусловлена иным влиянием, таким как прямая зависимость этого показателя от общего количества лизоцима в почках. Поэтому, концентрация лизоцима в печени может быть в косвенной зависимости от термического режима водоема. Лизоцим сыворотки не был связан с температурным фактором в условиях постоянных низких температур. Концентрация сывороточного лизоцима хотя и показала зависимость от общего количества фермента в почках, но корреляция между этими показателями отсутствовала, а какая-либо связь с лизоцимом печени и селезенки не выявлена вовсе. Сан с соавт. (Sun *et al.*, 2020) показали отсутствие связи активности лизоцима в плазме и печени

при гипоксии у большеротого окуня (*Micropterus salmoides* Lacepede, 1802).

Морфофизиологические показатели, такие как абсолютные размеры особей, зрелость гонад, а также размеры органов, выраженные через соматические индексы, обычно не были факторами, влияющими на концентрацию лизоцима в органах и сыворотке самцов щуки, но концентрация лизоцима могла проявлять корреляцию с этими показателями. Это относится к обратной корреляции концентрации фермента в печени и почках с индексом печени, а также прямой корреляции лизоцима селезенки с индексом органа. Напротив, лизоцим почек и общее количество лизоцима в трех органах, как следствие доминирующей роли почек, показали связь со зрелостью гонад, однако корреляции количественных показателей фермента почек с гонадами в этих случаях не наблюдалось. Ванг с соавт. (Wang *et al.*, 2020) обнаружили повышение активности лизоцима в печени без изменений индекса органа у молоди гибрида группера (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂), когда изучали влияние замены рыбной муки на концентрат соевого белка в корме. Также было обнаружено значительное увеличение активности лизоцима плазмы у форели *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) под влиянием β-глюканов без изменения индекса селезенки (Cognet *et al.*, 2021). Однако при добавлении тиамин в корм молоди китайского карпа *Cyprinus carpio* var. Jian активность сывороточного лизоцима повысилась и увеличился индекс селезенки, но уменьшился индекс почек (Feng *et al.*, 2011). Повышение активности фермента в сыворотке и увеличение индекса печени наблюдали у японского морского окуня *Lateolabrax japonicus* (Cuvier, 1828) под влиянием асафетиды (Xu *et al.*, 2020).

Размеры печени и почек не оказывали никакого влияния на общее количество фермента в них, тогда как ЛИСел показал существенную зависимость от размера селезенки. Размер селезенки оказывал прямое влияние на концентрацию и общее количество лизоцима в почках. С другой стороны ЛИСел и концентрация селезеночного лизоцима коррелировали с общим количеством и концентрацией фермента в почках, но при этом почки непосредственно не влияли на показатели селезенки. Общее количество лизоцима в почках и селезенке не зависело от количества фермента в печени. Изменение общего количества лизоцима в печени и селезенке отражалось на долях фермента в органах, а доля лизоцима в почках показала обратную зависимость от количества фермента в печени. Аналогичная взаимосвязь была обнаружена и при анализе размеров органов.

Активность лизоцима в печени, почках и сыворотке показала зависимость от температуры воды в водоеме в годовой динамике и изменение ха-

рактера зависимости при минимизации действия температуры. Поэтому при оценке влияния физиологических факторов необходимо нивелировать такое воздействие внешней среды. Этот результат также указывает, что при разных условиях внешней среды ответные реакции иммунной системы у одного вида рыб могут быть неодинаковыми или противоположными (Субботкин, Субботкина, 2020). Вместе с тем корреляция концентрации лизоцима с каким-либо фактором или показателем всего организма не всегда имела непосредственную зависимость от него при однофакторном анализе, как в случае концентрации лизоцима печени с температурой в годовом цикле или почек и селезенки с массой рыб, почек с размером печени и некоторые другие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Концентрация лизоцима как параметр, определяемый в фиксированном объеме, прямо зависит от общего количества фермента в органе, которое, в свою очередь, находилось в зависимости от его размеров. При значительных различиях концентрации лизоцима в печени и размеров органа в разные периоды годового цикла общее количество фермента, т.е. лизоцимный индекс органа, оставалось постоянным. Подобная особенность выявлена и у селезенки. Также показано, что при существенных различиях между печенью и селезенкой по концентрации лизоцима и размерам органов, общее количество фермента в них оказалось на одном уровне. В почках, напротив, обнаружена вариабельность общего количества лизоцима и обратная зависимость этого показателя от температуры воды при неизменном соматическом индексе органа. Таким образом, было обнаружено, что изменение размеров отдельного органа может не влиять на количественные показатели лизоцима в самом органе, но изменяет роль этого и других органов при совокупной оценке иммунных реакций. С другой стороны, концентрация лизоцима в разных органах оказывается зависимой от размеров этих органов. Кроме того, в результате сложных взаимосвязей, концентрация фермента в отдельном органе оказывается не только в зависимости от общего количества лизоцима в нем, но также находится под влиянием фермента других органов.

Проведенные исследования — это первая попытка оценить влияние физиологического состояния рыб, связанного с изменением размеров органов, на динамику иммунологического показателя — концентрацию лизоцима в различных тканях. Полученные результаты позволили приблизиться к пониманию сложной взаимосвязи концентрации лизоцима в органах и тканях щуки с некоторыми факторами разной природы, которые присутствуют в жизненном цикле рыб.

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема: 121051100104-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Буторин Н.В., Курдина Т.Н., Бакастов С.С. Температура воды и грунтов Рыбинского водохранилища. Л.: Наука, 1982. 224 с.
- Куровская Л.Я., Стрилько Г.А. Влияние pH водной среды на уровень заражения эктопаразитами, содержание белка и лизоцима у некоторых видов карповых рыб (Cyprinidae) // Рыбогосподарська наука України. 2016. Т. 35. № 1. С. 88–101.
- Сакун О.Ф., Буцкая Н.А. Определение стадий зрелости и изучение половых циклов рыб // Рыбное хоз-во. 1963. 36 с.
- Субботкин М.Ф., Субботкина Т.А. Влияние заражения и инъекций субстанций различной природы на лизоцим карповых рыб (Cyprinidae) (Обзор) // Биол. внутр. вод. 2020. № 2. С. 180–191.
- Субботкина Т.А., Субботкин М.Ф. Содержание лизоцима в органах и сыворотке крови у различных видов рыб р. Волги // Журн. эволюционной биохимии и физиол. 2003. Т. 39. № 5. С. 430–437.
- Bennett P.M., Janz D.M. Seasonal changes in morphometric and biochemical endpoints in northern pike (*Esox lucius*), burbot (*Lota lota*) and slimy sculpin (*Cottus cognatus*) // Freshwat. Biol. 2007. V. 52. P. 2056–2072.
- Cornet V., Khuyen T.D., Mandiki S.N.M., Betoulle S., Bossier P., Reyes-Lopez F.E., Tort L., Kestemont P. GAS1: A new β -glucan immunostimulant candidate to increase rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) resistance to bacterial infections with *Aeromonas salmonicida achromogenes* // Front. Immunol. 2021. V. 12. 693613.
- Crowe B.H., Harris J.O., Bansemmer M.S., Stone D.A.J. Restricted feeding and dietary energy levels affect liver structure in cultured Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*, Valenciennes) at summer water temperatures // Aquacult. Res. 2021. V. 52. P. 6074–6086.
- Feng L., Huang H.-H., Liu Y., Jiang J., Jiang W.-D., Hu K., Li S.-H., Zhou X.-Q. Effect of dietary thiamin supplement on immune responses and intestinal microflora in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) // Aquac. Nutr. 2011. V. 17. P. 557–569.
- Hansson T., Lindesjö E., Forlin L., Balk L., Bignert A., Larsson A. 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. 2006. V. 79. P. 341–355.
- Huang J.F., Xu Q.Y., Chang Y.M. Effects of temperature and dietary protein on the growth performance and IGF-1 mRNA expression of juvenile mirror carp (*Cyprinus carpio*) // Aquac. Nutr. 2016. V. 22. № 2. P. 283–292.
- Kortet T.R., Taskinen J., Sinisalo T., Jkinen I. Breeding-related seasonal changes in immunocompetence, health state and condition of the cyprinid fish, *Rutilus rutilus* L. // Biol. J. Linn. Soc. 2003. V. 78. P. 117–127.
- Li X., Liu L., Zhang Y., Fang Q., Li Y., Li Y. Toxic effects of chlorpyrifos on lysozyme activities, the contents of complement C3 and IgM, and IgM and complement C3 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.) // Chemosphere. 2013. V. 93. P. 428–433.

- Medford B.A., Mackay W.C. Protein and lipid content of gonads, liver, and muscle of northern pike (*Esox lucius*) in relation to gonad growth // J. Fish. Res. Board Can. 1978. V. 35. P. 213–219.
- Miller G.M., Kroon F.J., Metcalfe S., Munday P.L. Temperature is the evil twin: effects of increased temperature and ocean acidification on reproduction in a reef fish // Ecol. Appl. 2015. V. 25. № 3. P. 603–620.
- Nguyen M.V., Espe M., Conceição L.E.C., H.M., Yúfera M., Engrola S.A.D., Jordal A.O., Rønnestad I. The role of dietary methionine concentrations on growth, metabolism and N-retention in cobia (*Rachycentron canadum*) at elevated water temperatures // Aquac. Nutr. 2019. V. 25. № 2. P. 495–507.
- Osserman E.F., Lawlor D.P. Serum and urinary lysozyme (Muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia // J. Exp. Med. 1966. V. 124. P. 921–952.
- Qiao Q., Liang H., Zhang X. Effect of cyanobacteria on immune function of crucian carp (*Carassius auratus*) via chronic exposure in diet // Chemosphere. 2013. V. 90. № 3. P. 1167–1176.
- Ren X., Wu B., Zhao F., Qi L., Qiu X., Li R., Yang S., Liu F., Yi G., Ding X., Xia L., Sun Y. Antagonistic activity and protective effect of a *Bacillus subtilis* isolate against fish pathogen *Edwardsiella piscicida* // Fisheries Science. 2019. V. 85. P. 1011–1018.
- Rohlenova K., Morand S., Hyršl P., Tolarova S., Flajšhans M., Šimkova A. Are fish immune systems really affected by parasites? An immunocological study of common carp (*Cyprinus carpio*) // Parasit. Vectors. 2011. V. 4. P. 120.
- Subbotkin M.F., Subbotkina T.A. Effect of environment and physiological state of an organism on the activity and content of lysozyme in the fishes of the family Cyprinidae: A review // Inland Water Biol. 2018. V. 11. № 2. P. 184–194.
- Sun J.L., Zhao L.L., Liao L., Tang X.H., Cui C., Liu Q., He K., Ma J.D., Jin L., Yan T., Zhou J., Yang S. Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: Aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis // Fish Shellfish Immunol. 2020. V. 98. P. 923–936.
- Tarnawska M., Augustyniak M., Łaszczyca P., Migula P., Irnazarow I., Krzyżowski M., Babczyńska A. Immune response of juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to a mixture of sewage chemicals // Fish Shellfish Immunol. 2019. V. 88. P. 17–27.
- Wang J., Liang D., Yang Q., Tan B., Dong X., Chi S., Liu H., Zhang S. The effect of partial replacement of fish meal by soy protein concentrate on growth performance, immune responses, gut morphology and intestinal inflammation for juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) // Fish Shellfish Immunol. 2020. V. 98. P. 619–631.
- Xu A., Shang-Guan J., Li Zh., Gao Zh., Huang Y., Chen Q. Effects of dietary asafoetida (*Ferula sinkiangensis* K. M. Shen) levels on feeding attraction activity, growth performance, healthiness, and digestive enzyme activity in juvenile // Fish Physiol. Biochem. 2020. V. 46. P. 1991–2003.

The Intra-Annual Variability of Immune System Organs and Lysozyme Content in Male Pike *Esox lucius* L.

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

¹ Papanin Institute of Inland Water Biology, Russian Academy of Sciences, Borok, Nekouzskii district, Yaroslavl oblast, 152742 Russia

[#]e-mail: smif@ibiw.ru

The effect of the physiological state on the lysozyme concentration in the liver, kidney, spleen and serum, as well as the total amount of the enzyme in the organs, was studied in male pike *Esox lucius* L., 1758 under different conditions of the annual cycle. Multidirectional intra-annual dynamics of organ somatic indices and quantitative parameters of lysozyme in fish tissues and organs, depending on the temperature regime of the water body, was found. Despite significant changes in liver size and lysozyme concentration, the total amount of the enzyme in the organ, the lysozymic index, remained constant. A similar result was found in the spleen. When the influence of the temperature factor at low temperatures was minimized, the liver parameters changed to the opposite ones, while those in the kidney remained unchanged. Such a temperature regime did not affect the spleen parameters and the concentration of the enzyme in the serum. With significant differences between the liver and spleen in the enzyme concentration and size, their lysozymic indices were indicators of the same level. Stages of gonad maturity affected the liver index and the amount of lysozyme in the kidney, but the correlation of the kidney enzyme with maturity was not significant. The kidney lysozyme and the spleen parameters correlated with body mass without organs, although fish weight and length were not influencing factors. The size of the kidney, unlike the spleen, did not affect the enzyme in fish tissues. The liver and kidney enzyme concentrations and kidney lysozymic index were inversely correlated with liver size. A complex nature of the enzyme relationships in organs was revealed, at which the amount of lysozyme in one organ could affect the amount of the enzyme in the other. The relationship between the concentration of serum lysozyme and the morphophysiological parameters of fish under stable low temperature conditions in the water body was not found.

Keywords: lysozyme, organs, serum, somatic and lysozymic indices, physiological state, temperature, season