

А. С. Потрохов

Снижение антистрессовыми препаратами нервнопаралитического действия высокой концентрации аммония на рыб

(Представлено академиком НАН Украины В. Д. Романенко)

A possibility of weakening the development of fishes reactions by the type of chemical stress on the action of ammonium nitrogen by means of application of different tranquilizers is investigated. It is shown that, in the first hours of the influence of toxin, the neuromuscular effects at fishes are taken off, and their death is considerably slowed due to fenazepam and sodium barbital.

Значительное повышение концентрации аммонийных соединений в воде сопровождается явлениями химического стресса рыб, и в частности нервнопаралитическими проявлениями, которые часто заканчиваются летальным исходом. Наиболее характерными симптомами стресса при действии токсических веществ являются учащение сердцебиения, повышение артериального давления, усиление интенсивности дыхания [1], рост гепатосоматического индекса, а также индекса селезенки [2–5]. На последних стадиях развития стресса наблюдается снижение подвижности рыб, резкое подавление активности дыхания и смерть.

Действие токсических веществ на организм рыб протекает, как правило, в двух фазах развития общего токсикоза. Первая фаза интоксикации развивается достаточно быстро, является суммой реакций химического стресса, определяется концентрацией и дозой соединения, скоростью его поступления в организм рыб и мало зависит от химической природы самого токсиканта. Вторая — это развитие специфической интоксикации и представляет собой сумму процессов нарушения функционирования систем организма и его реакций на субклеточном, клеточном, тканевом и органном уровнях. Вторая фаза токсикоза определяется специфическими, свойственными для данного конкретного вещества путями его воздействия на организм и полностью зависит от его химического строения [2, 6]. Так, известно, что аммиак и ионы аммония по своему физиологическому действию принадлежат к токсикантам локального, гемолитического и нервнопаралитического действия [7, 8].

С целью ослабления нервнопаралитического действия различных веществ, а также проявлений стресса у рыб нами использовались транквилизаторы различного химического строения. Ранее были определены оптимальные физиологические дозы седативных препаратов, не вызывающие отрицательных эффектов, нормально переносимые рыбами и обездвиживающие их [9, 10]. Наиболее действующей была признана концентрация феназепама в воде от 1,0 до 5,0 мг/дм³, барбитала натрия — от 10,0 до 100,0 мг/дм³.

Учитывая нейротоксическое действие высоких концентраций ионов аммония, нами была поставлена задача снизить нервнопаралитическое действие аммония путем применения седативных и транквилизирующих препаратов.

Материал и методы исследований. Эксперименты проведены в Биотехнологическом комплексе и на Белоцерковской станции Института гидробиологии НАН Украины.

В качестве тест-объектов в экспериментах использовали сеголеток амурского чебачка (*Pseudorasbora parva* Schlegel).

Проявление реакции химического стресса у рыб под действием повышенной концентрации ионов аммония оценивали в остром токсическом эксперименте (96 ч). В опытах использовали хлорид аммония в концентрации 1,0–200,0 мг N/дм³. Ежедневно проводили замену растворов препаратов в экспериментальных емкостях. В пятилитровые сосуды помещали по 25 рыб массой особи до 1 г. За состоянием рыб осуществляли круглосуточное наблюдение. Массовое соотношение растворов и биологического материала не превышало 200 : 1 и не могло существенно сказаться на результатах экспериментов. При определении первичной фармакологической активности антистрессовых препаратов и при их действии на рыб в присутствии ионов аммония анализировали следующие характеристики опытных рыб: двигательную активность рыб; частоту дыхательных движений; реакцию на внешние раздражители (прикосновение, постукивание по стенкам сосуда).

Исходя из положений, выдвинутых В. Ю. Урбахом [11], мы учитывали альтернативный эффект, т. е., абстрагируясь от изменения поведения, частоты локомоторных движений и других показателей, учитывали только гибель рыб под действием токсического фактора. Достижение эффекта гибели рыб фиксировали непосредственно в момент прекращения дыхательных движений жаберных крышек. Смертность рыб (эффект токсического действия) рассчитывали в долях рыб, погибших в данный промежуток времени.

Результаты исследований обрабатывали с помощью программы “Statistica 5.5” и пробит-методом [11].

Результаты исследований и их обсуждение. Как показали исследования, феназепам в концентрации 0,1–0,3 мг/дм³ не вызывал заметного обездвиживания рыб, их поведение практически не изменялось в течение 24 ч. В начале воздействия препарата в первые 1,5 ч повышалась частота жаберных движений рыб на 80–150% по сравнению с контролем, достигая 150–200 дыханий за минуту. У рыб контрольной группы в это время отмечалось 80–85 движений жаберной крышки. По истечении суток количество жаберных движений у опытных рыб достигало границ нормы. Под влиянием концентрации феназепама 1,0 мг/дм³ рыбы были малоподвижны, вялы, находились возле дна или в толще воды, частота жаберных движений снижалась по сравнению с контролем на 52,5–72,4%. Данный факт свидетельствовал о низком уровне потребления рыбами растворенного кислорода. Феназепам в концентрации 10 мг/дм³ обездвиживал рыб уже через несколько минут, однако через 24 ч вызывал гибель 20–30% рыб. Барбитал натрия в концентрации от 2,5 до 250,0 мг/дм³ не оказывал токсического действия на рыб и слабо обездвиживал их.

Как видно на рис. 1, во всех случаях скорость гибели рыб под действием ионов аммония существенно замедлялась при влиянии антистрессовых препаратов. Так, при более высоких концентрациях аммония (40,0 мг N/дм³) смертность рыб достигала 100% за 48 ч. За аналогичный период времени при экспозиции в растворе аммония с содержанием 1,0 мг/дм³ феназепама или 10,0 мг/дм³ барбитала натрия их гибели не наблюдалось, что достоверно свидетельствовало о противодействии антистрессовых агентов развитию раннего химического стресса у рыб. При этом благодаря седативному действию изученных препаратов продолжительность жизни чебачков увеличилась на 120–140 ч, а при своевременном переносе рыб в чистую воду смертности от предыдущего поражения ионами аммония не наблюдалось.

При совместном воздействии 30,0 мг N/дм³ аммония и транквилизаторов смертность опытных рыб снижалась по сравнению с токсическим контролем, что особенно характерно для первых 145–160 ч. Концентрация аммонийного азота 20,0 мг N/дм³ не вызывала 100%-й

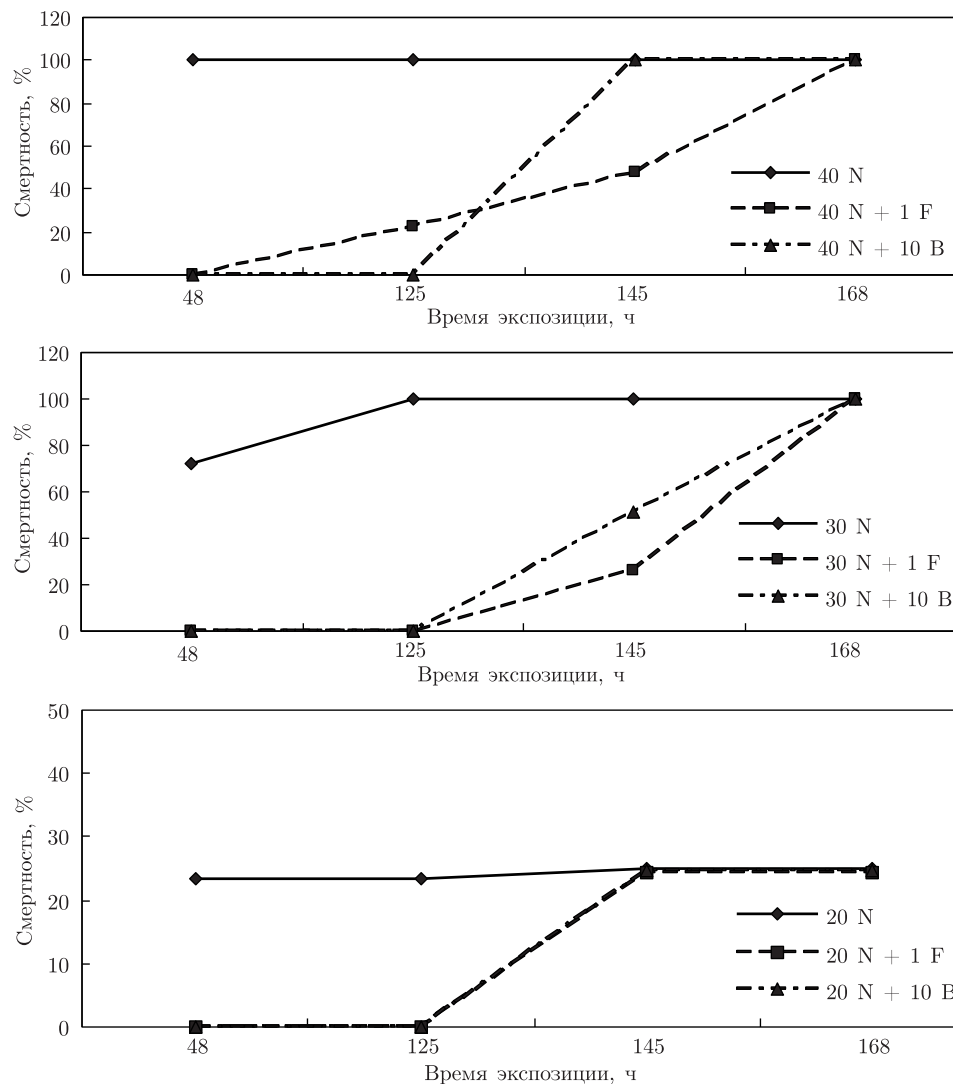


Рис. 1. Совместное влияние аммонийного азота (NH_4^+ , мг N/дм³) и транквилизаторов (феназепам (F) и барбитала натрия (B), мг/дм³) на смертность амурского чебачка

смертности сеголеток чебачка. Также отмечено позитивное действие транквилизаторов на рыб, благодаря которому отсутствовало отрицательное влияние ионов аммония на выживаемость рыб в первые 125 ч.

Эксперименты по острой токсичности хлорида аммония на рыб показали следующий симптомокомплекс процесса интоксикации:

в начале его воздействия рыбы проявляли высокую возбудимость, совершали резкие, без нормальной ориентации движения, частота дыхательных движений повышалась более чем в 2 раза;

в концентрации аммония выше 100,0 мг N/дм³ наблюдалась значительная до 20% смертность рыб на 10–30-й минуте экспозиции;

рыбы при концентрации менее 40,0 мг N/дм³ часто поднимались в поверхностные слои воды, заглатывали воздух, затем полностью слабели;

при более длительном воздействии движения рыб слабели, приходили в состояние угнетения, количество дыхательных движений резко уменьшалось, затем чебачки ложились на дно.

В присутствии транквилизаторов в водных растворах на 145-м часу проведения экспериментов отмечалось резкое снижение выживаемости рыб при концентрации аммония 20–40 мг N/дм³. Вероятно, за этот период экспозиции накопление аммония в организме достигало своего максимума и начиналось проявление специфического токсикоза рыб, что неминуемо вело к повышению смертности амурских чебачков.

Поскольку феназепам и барбитал натрия являются седативными (угнетающими активность нервной системы) и анестезирующими препаратами, то исходя из их свойств и выявленного эффекта, мы можем предположить, что они препятствуют развитию быстрой фазы химического стресса, связанной раздражающим и возбуждающим действием ионов аммония на центральную и вегетативную нервную систему рыб. Тем более что аммоний имеет достаточно выраженный нервнопаралитический эффект [7].

При более высокой концентрации ионов аммония (50,0–200,0 мг N/дм³) и транквилизаторов (10,0 мг/дм³ феназепама или 100,0 мг/дм³ барбитала натрия) общие закономерности по снижению проявлений химического стресса на рыб повторялись (табл. 1). Причем, если при меньших концентрациях аммония (50,0–100,0 мг N/дм³) более действенным протектором для рыб был барбитал натрия, то при максимальном его содержании (200,0 мг N/дм³) — феназепам. Однако во всех сериях экспериментов амурские чебачки погибали на 48-м часу экспозиции.

Таким образом, результаты исследований позволяют допустить, что при действии ионов аммония феназепам оказывает позитивное влияние на жизнестойкость рыб, замедляя развитие токсичного эффекта, вызванного избыточным содержанием соединений азота. С целью уточнения характера этого влияния и эффективности действия феназепама во времени нами проведены исследования с привлечением большего количества экспериментальных особей (50 экз. в серии массой по 300–500 мг) и непрерывной, точной во времени фиксации гибели рыб. Поскольку экспозиция рыб была достаточно длительной, а в экспериментах использовалась прудовая вода, богатая органическими соединениями, в частности гуминовыми кислотами и фульвокислотами, то концентрацию феназепама доводили до 5,0 мг/дм³.

Содержание аммония было подобрано с таким расчетом, чтобы в одной серии рыбы могли прожить около 2 ч (200,0 мг N/дм³), более 1,5 сут (100,0 мг N/дм³) и наступала

Таблица 1. Влияние повышенных концентраций ионов аммония (50,0, 100,0, 200,0 мг N/дм³) в присутствии антистрессовых препаратов феназепама (F, 10,0 мг/дм³) и барбитала натрия (B, мг/дм³) и без них на выживаемость амурского чебачка, %

Вариант	Время экспозиции, ч			
	1	2	24	48
50,0 N	100	83,2 ± 4,9	37,5 ± 8,2	0
50,0 N + 10,0 F	100	87,2 ± 3,5	48,2 ± 5,2	0
50,0 N + 100,0 B	100	92,1 ± 5,2	57,2 ± 7,2	0
100,0 N	72,4 ± 6,8	61,4 ± 7,2	27,4 ± 8,3	0
100,0 N + 10,0 F	73,5 ± 7,9	70,7 ± 8,2	31,4 ± 4,1	0
100,0 N + 100,0 B	100	72,4 ± 5,8	41,1 ± 5,2	0
200,0 N	25,2 ± 6,9	0	0	0
200,0 N + 10,0 F	63,5 ± 7,2	0	0	0
200,0 N + 100,0 B	47,5 ± 5,9	0	0	0

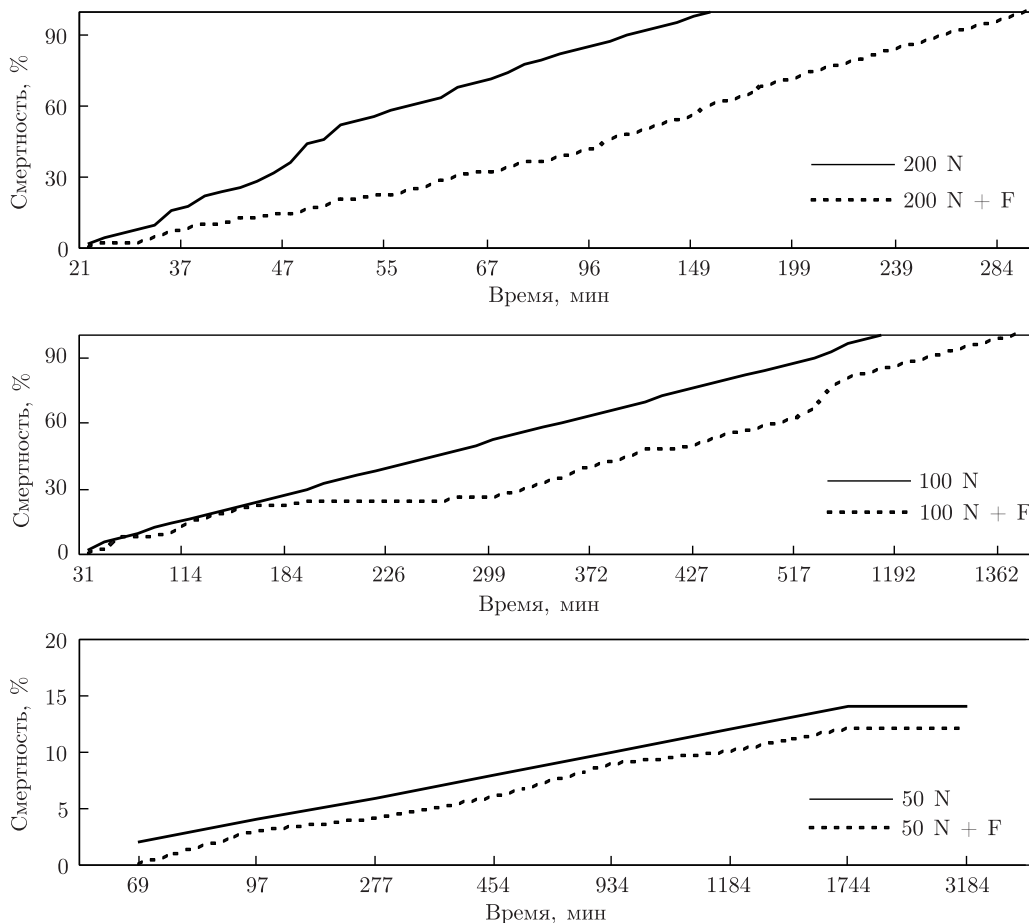


Рис. 2. Влияние высокой концентрации ионов аммония (NH_4^+ , мг N/дм³) в присутствии 5 мг/дм³ феназепам (F) и без него на выживаемость амурских чебачков

незначительная гибель наиболее чувствительных особей к действующему фактору (50,0 мг N/дм³). Такая постановка эксперимента позволила установить достоверную разницу между смертностью рыб, подвергнутых действию заданной концентрации аммонийного азота, и снижением их смертности при транквилизирующем действии феназепам, т. е. определить, в какой мере применение феназепам снижает или замедляет гибель рыб при токсической нагрузке аммонийным азотом.

Как следует из рис. 2, во всех случаях скорость наступления гибели рыб под воздействием ионов аммония существенно замедлялась при действии антистрессового препарата. В то время как при более высоких концентрациях (200,0 мг N/дм³) в чистом растворе токсиканта гибель рыб достигала 100% за 100–110 мин, при экспозиции в растворе с содержанием 5,0 мг/дм³ феназепам за аналогичный период времени смертность рыб составляла 50%. Данный факт свидетельствовал о противодействии препарата развитию раннего химического стресса у рыб и значительном, более чем в 2,5 раза, продлении жизни рыб при избыточной концентрации ионов аммония. Следовательно, гибель рыб под действием ионов аммония во времени наступала в результате проявлений двух составляющих токсикоза: нервнопаралитического воздействия аммонийного азота и специфической интоксикации организма рыб по мере его накопления.

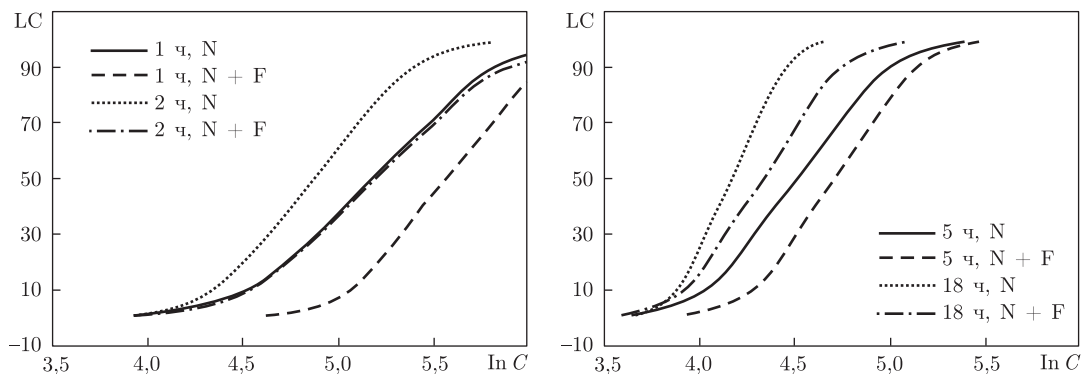


Рис. 3. Зависимость между концентрацией аммония в воде и смертностью рыб (LC — концентрация вещества, действие которой вызывает смертность рыб в соответствующих процентах)

При меньшей концентрации аммонийного азота в экспериментальной среде (50,0–100,0 мг N/дм³) со значительным содержанием органических веществ в воде (бихроматная окисляемость выше 55,0 мг O/дм³) не наблюдалось 100%-й смертности рыб. В связи с этим позитивное воздействие феназепама по снятию проявлений химического стресса у рыб было менее выражено. Однако при концентрации аммония 100,0 мг N/дм³ отмечено снижение скорости наступления гибели чебачков в присутствии транквилизатора в 1,5 раза, а при 50,0 мг N/дм³ и феназепама смертность рыб не достигала уровня токсического контроля. Данный факт свидетельствовал о том, что за 24 ч экспозиции рыбы полностью адаптировались к действию токсических факторов среды.

Сравнивая скорость гибели рыб при различной концентрации аммония, мы можем отметить, что при более высоком содержании токсиканта противодействие феназепама развитию смертности рыб существенно эффективнее, чем при его меньшем содержании. Вероятно, при низкой концентрации токсиканта время экспозиции рыб для достижения 50%-й или 100%-й гибели было достаточно длительным — 2–2,5 суток, в течение которых уже полностью развивается специфическая интоксикация аммонием, проявляющаяся на разных уровнях функционирования организма. На данные этапы развития токсикоза транквилизаторы не влияли. В то же время при избыточных концентрациях аммония (200,0 мг/дм³) основной причиной гибели было быстрое развитие нервнопаралитического действия (стресса), которому и способно противостоять действие феназепама.

Как показали данные пробит-анализа (рис. 3), в первые часы при совместном воздействии транквилизаторов и аммония гибель рыб под токсической нагрузкой существенно снижалась. Причем кривые зависимости “доза-эффект” аммония за 1-й час полностью совпадали с данными при их совместном влиянии с транквилизаторами на 2-м часу экспозиции рыб. По мере дальнейшего выдерживания чебачков доля их положительных ответов (гибели) на силу воздействия высокого содержания аммония в среде возрастала, но в любом случае отмечалось снижение эффекта химического стресса на организм рыб.

В результате исследований установлено, что аммонийные соединения обладают отчетливо выраженным нейротоксическим действием, достигая высокой концентрации в воде, неизбежно вызывают гибель рыб в первые часы за счет развития проявлений химического стресса у рыб. Частичное снятие нервнопаралитического эффекта аммония у рыб возможно путем применения транквилизаторов. Феназепам и барбитал натрия предотвращают гибель рыб в первые 140 ч воздействия высокой концентрации аммонийного азота (до 40 мг

N/дм³), повышают их устойчивость к действующему фактору. Своевременная замена воды с высоким содержанием ионов аммония на чистую приводит к полному восстановлению нормального состояния рыб, через 1–2 ч они приходят в состояние физиологической нормы, начинают активно питаться, дальнейшей их гибели не наблюдается. Отмечено, что в разнородных выборках рыб встречаются особи, отличающиеся по норме реакции на действие токсиканта, — особо чувствительные (до 10%) и высокотолерантные (3–5%). Таким образом, причинами гибели рыб под влиянием ионов аммония являются две последовательно наступающие во времени фазы токсикоза: нервнопаралитическое действие аммонийного азота и специфическая интоксикация организма. Первая составляющая токсикоза преобладала в начале экспозиции, а вторая (специфическая интоксикация) — в основном проявлялась по мере накопления аммония в органах и тканях рыб.

Снятие проявлений химического стресса антистрессовыми препаратами на ранних этапах воздействия высокой концентрации ионов аммония свидетельствует о возможности практического применения транквилизаторов при работе с рыбами в неблагоприятных условиях.

1. Hill J. V., Forster M. E. Cardiovascular responses of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during rapid anaesthetic induction and recovery // *Comp. Biochem. and Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* – 2004. – **137**, No 2. – P. 167–177.
2. Marking L. L. Procedures for use of freshwater fishes in the development of reproducible toxicological information // *Nat. Cancer. Inst. Monogr.* – 1984. – **65**. – P. 195–199.
3. Lappivaara J. Effects of acute handling stress on whitefish *Coregonus lavaretus* after prolonged exposure to biologically treated and untreated bleached kraft mill effluent // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* – 2001. – **41**, No 1. – P. 55–64.
4. Norton S. B., Cormier S. M., Smith M. et al. Predicting levels of stress from biological assessment data: empirical models from the Eastern Corn Belt Plains, Ohio, USA // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2002. – **21**, No 6. – P. 1168–1175.
5. Лебедева Н. Е., Головкина Т. В. Состав и некоторые свойства слизи растительноядных рыб, как критерий стрессового состояния // *Вестн. Моск. ун-та. Биол.* – 1987. – **4**. – С. 28–33.
6. Метелев В. В., Канаев А. И., Дзасохова Н. Г. Водная токсикология. – Москва: Колос, 1971. – 247 с.
7. Tilak K. S., Lakshmi S. J., Susan T. A. The toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the fish, *Catla catla* (Hamilton) // *J. Environ. Biol.* – 2002. – **23**, No 2. – P. 147–149.
8. Зиньковский О. Г., Потрохов А. С., Евтушенко Н. Ю. Применение антистрессовых и обездвиживающих веществ в промышленном рыбоводстве и при экспериментальной работе с рыбами. – Киев: Ин-т гидробиологии НАН Украины, 2000. – 75 с.
9. Евтушенко Н. Ю., Зиньковский О. Г., Потрохов А. С. Использование антистрессового препарата феназепам в рыбоводстве // *Доп. НАН України.* – 2000. – № 6. – С. 170–175.
10. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – Москва: Медицина, 1975. – 295 с.
11. Лукьяненко В. И. Общая ихтиотоксикология. – Москва: Легк. и пищ. пром-сть, 1983. – 320 с.

Институт гидробиологии НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 14.02.2008