

УДК 597.5-111
ББК 28.903

Т. Б. Лапирова, Е. А. Флёрова

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
НЕКОТОРЫХ ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КРОВИ
ЩУКИ *ESOX LUCIUS* (L.)
И СУДАКА *STIZOSTEDION LUCIOPERCA* (L.).¹**

T. B. Lapirova, E. A. Flerova

**COMPARATIVE ANALYSIS
OF SOME IMMUNOPHYSIOLOGICAL PARAMETERS
OF THE PIKE *ESOX LUCIUS* (L.)
AND PIKE-PERCH *STIZOSTEDION LUCIOPERCA* (L.) BLOOD**

Представлены данные по ряду иммунофизиологических показателей щуки и судака из Рыбинского водохранилища. Морфофизиологические и некоторые биохимические характеристики крови судака достоверно превышали таковые щуки. Анализ полученных результатов позволяет заключить, что физиологические параметры в большей степени обуславливаются систематическим положением рыб, в то время как показатели врожденного иммунитета, причем как клеточного, так и гуморального его звена, в большей степени зависят от физиологического состояния и условий обитания рыб.

Ключевые слова: щука, судак, физиологический статус, клеточное и гуморальное звено неспецифического иммунитета.

The data on a number of immunophysiological indicators of pike and pike-perch from the Rybinsk Reservoir are presented. Morphophysiological and some biochemical characteristics of the blood were significantly higher in the pike-perch, than in the pike. The analysis of the results suggests that the physiological parameters are more conditioned by the taxonomic position of fish, while the indicators of innate immunity – both cellular and humoral links – are more dependent on physiological state and conditions of fish habitats.

Key words: pike, pike-perch, physiological state, cell-mediated and humoral link of non-specific immunity.

Введение

Для более детального понимания развития и становления защитных механизмов у животных большое значение имеет эволюционный аспект иммунологических исследований. Изучение различных систематических групп позволяет составить представление о развитии иммунной системы в филогенезе вплоть до формирования самых сложных ее механизмов у млекопитающих. В сравнительно-эволюционном плане большой интерес представляет исследование структурно-функциональных показателей иммунной системы рыб. Связано это с тем, что, начиная именно с круглоротых и рыб, появляются элементы, необходимые для обеспечения иммунного ответа у высших позвоночных: самостоятельные Т- и В-клеточные популяции лимфоцитов, локализирующиеся в лимфомиелоидных органах, истинные иммуноглобулины, являющиеся основой специфического гуморального иммунитета и т. д. [1].

Помимо эволюционного аспекта, изучение иммунитета рыб представляет большой практический интерес. Это объясняется тем, что рыбы являются объектом мониторинга водных экосистем, поэтому столь важно иметь данные по фоновым значениям показателей иммунной системы, являющейся одной из наиболее чувствительных к действию самых различных факторов. Несмотря на то, что гематологические показатели рыб имеют, как правило, очень широкую норму реакции, некоторые из них являются специфичными для вида. Это делает возможным использование их в качестве маркеров физиологического состояния [2].

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований 11-04-01168-а.

Хотя параметры крови изучаются уже давно, объем накопленного по этой проблеме материала недостаточен и не позволяет представить более или менее полную характеристику наиболее общих гематологических показателей в пределах нормы реакции у рыб разных филогенетических групп. Накопление фактических данных позволит приблизиться к пониманию закономерностей функционирования защитных систем крови у различных по систематическому положению групп низших позвоночных и установить наличие связи с экологическими особенностями вида.

Кровь животных является уникальной системой, выполняющей множество функций: дыхательную, трофическую, регуляторную и т. д. Одной из самых важных является защитная, направленная на поддержание антигенного гомеостаза организма и обеспечение его реактивности. Поэтому исследование гематологических параметров дает ценную информацию о состоянии организма в конкретных условиях обитания.

Целью исследований явился сравнительный анализ ряда иммунофизиологических показателей крови двух типичных представителей ихтиофауны европейской части России, занимающих различное систематическое положение – щуки *Esox lucius* L. (отряд лососеобразные – *Salmoniformes*) и судака *Stizostedion lucioperca* L. (отряд окунеобразные – *Perciformes*).

Объекты и методы исследования

Для того чтобы сравнение показателей было корректным, рыб отбирали в один сезон и в одной и той же точке. Сбор материала проводили в конце нагульного периода (конец августа – начало сентября 2011 г.). Отлов рыбы осуществляли неводом на стандартной станции отбора в части акватории Рыбинского водохранилища, не подверженной антропогенному воздействию. Для анализа отбирали по 20 экземпляров рыб каждого вида, средние размерно-весовые показатели которых составили: масса 257 ± 77 и 351 ± 75 г; длина 347 ± 39 и 297 ± 23 мм для щуки и судака соответственно.

После отлова рыбу помещали в каны с водой и сразу доставляли в лабораторию, где она находилась в проточных аквариумах около суток для восстановления показателей после хэндлинга.

Кровь для получения сыворотки и приготовления мазков получали после каудэктомии, затем проводили необходимые для биоанализа измерения. Анализ содержания белка в сыворотке проводили по Бредфорду [3]. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом, используя стандартный набор реактивов фирмы «Импакт», уровень содержания лизоцима – турбидиметрическим методом [4]. Состав и соотношение лейкоцитов изучали на мазках крови, которые фиксировали этиловым спиртом и окрашивали по Романовскому-Гимза. Для расчета лейкоцитарной формулы на мазке подсчитывали не менее 200 клеток.

Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel при уровне значимости $p \leq 0,05$ с использованием *t*-критерия Стьюдента для оценки достоверности различий. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ($M \pm m$).

Результаты исследований и их обсуждение

При вскрытии рыб была заметна значительная разница в жирности: у судака пределы колебаний показателя составили от 2 до 4, в то время как у щуки – от 0 до 1 балла. На основе данных биоанализа были рассчитаны коэффициенты упитанности рыб по Кларк, превышение показателя у судака также оказалось статистически значимым (табл. 1). Интенсивность питания рыб зависит от многих факторов, в том числе имеются и видовые особенности [5], видимо именно они и являются причиной столь выраженной разницы в показателях при общей кормовой базе.

Таблица 1

Морфофизиологические и гематологические показатели рыб

Показатель	Щука	Судак
Коэффициент упитанности	$0,71 \pm 0,11^*$	$1,20 \pm 0,05$
Жирность, баллы	$1,06 \pm 0,11^*$	$2,89 \pm 0,80$
Общий белок, г/л	$15,10 \pm 1,25^*$	$23,35 \pm 2,04$
Глюкоза, ммоль/л	$7,43 \pm 3,81$	$9,89 \pm 1,80$
Лизоцим, мкг/мл	$7,36 \pm 2,91$	$13,82 \pm 5,73$
ЦИК, усл. ед.**	$32,0 \pm 12,86$	$27,8 \pm 12,72$

*Здесь и далее – значения, достоверно отличающиеся у исследованных видов.

**ЦИК – циркулирующий иммунный комплекс.

Концентрацию сывороточных белков относят к основным параметрам физиологического состояния, что связано с их разносторонними функциями в организме. Они принимают непосредственное участие в метаболических процессах, имеются сведения о возможном использовании их в качестве энергетического субстрата. Это было доказано экспериментально, и даже появились рекомендации использовать уровень белка крови в качестве одного из критериев упитанности рыб [6].

Содержание общего белка сыворотки у судака также оказалось достоверно выше, чем у щуки (табл. 1). Учитывая полученные нами данные по жирности и коэффициенту упитанности, можно заключить, что наши результаты согласуются с приведенным выше положением о наличии связи между этими показателями.

Помимо концентрации общего белка, при анализе биохимических показателей крови обязательно учитывается и уровень глюкозы. В клинических исследованиях этот показатель, как правило, используется как индикатор стрессового состояния. Но нельзя не принимать во внимание тот факт, что глюкоза в то же время является легко мобилизуемым субстратом, одним из основных источников энергии, необходимой организму для протекания многих физиологических процессов. Важно отметить: рыбам, в отличие от высших животных, свойственна большая амплитуда не только видовых, но и, особенно, индивидуальных колебаний уровня гликемии, что связано с менее совершенным механизмом регуляции. Предполагается, что рыбы и круглоротые обладают способностью к легким и, главное, более длительным по сравнению с высшими животными смещениями концентрации глюкозы в крови. К факторам, вызывающим эти смещения, относятся способы поимки и транспортировки рыбы, температура окружающей среды, состояние кормовой базы и др. [7]. Нет единого мнения о наличии зависимости между подвижностью и уровнем гликемии у костистых рыб, но в литературе имеются данные, подтверждающие более высокую концентрацию сывороточной глюкозы у рыб, ведущих более подвижный образ жизни.

Полученные нами результаты показывают, что концентрация глюкозы у судака оказалась значительно выше, чем у щуки (табл. 1). Можно предположить, что это обусловлено, с одной стороны, более высоким уровнем обеспеченности судака пищей (на что указывает много более высокая жирность рыбы), а с другой – некоторыми различиями в образе жизни. Как уже указывалось выше, судак является пелагическим хищником и может быть более подвижным по сравнению с хищником-засадчиком, к которым относится щука [8]. Относительно невысокий размах показателя у судака не позволяет считать это превышение следствием более сильного ответа на стрессовое воздействие, связанное с отловом рыбы, т. к. при этом, помимо роста самого показателя, значительно возрастают и пределы его колебаний. Это, скорее, подтверждение положения о более высоком уровне гликемии у более подвижных рыб.

Лейкоцитарная формула периферической крови является чутким индикатором физиологического состояния организма и быстро реагирует на изменения окружающей среды. Состав и соотношение лейкоцитов характеризуют состояние клеточного звена неспецифического иммунитета.

В периферической крови всех исследованных нами особей щуки и судака были обнаружены следующие типы лейкоцитов: лимфоциты, моноциты и гранулоциты, находящиеся на различной стадии зрелости. Среди зрелых форм гранулоцитов нам удалось выделить палочко- и сегментоядерные нейтрофилы и эозинофилы. Подсчет юных форм гранулоцитов (промиелоциты, миелоциты и метамиелоциты) производили без разделения их на нейтрофильные и эозинофильные формы.

Кровь щуки и судака, как и большинства других пресноводных и морских костистых рыб, имеет лимфоидный профиль. Процентное содержание лимфоцитов у исследованных видов рыб практически не отличалось (табл. 2). Доля моноцитов у щуки оказалась несколько выше, чем у судака, однако это превышение статистически незначимо.

Таблица 2

Состав и соотношение лейкоцитов крови рыб

Тип клеток, %	Щука	Судак
Лимфоциты	87 ± 2,19	89 ± 2,30
Моноциты	2,72 ± 0,96	2,06 ± 0,73
Промиеоциты	0	0,43 ± 0,15
Миелоциты	1,00 ± 0,36	1,29 ± 0,46
Метамиелоциты	1,00 ± 0,23	0,74 ± 0,26
Палочкоядерные нейтрофилы	2,00 ± 0,62	1,65 ± 0,58
Сегментоядерные нейтрофилы	5,00 ± 0,63	2,56 ± 0,91
Эозинофилы	1,00 ± 0,80	0,75 ± 0,26

Среди зрелых нейтрофилов у обоих видов рыб преобладали сегментоядерные формы, при этом их доля у щуки достоверно превышала таковую у судака. Процентное содержание юных форм гранулоцитов оказалось невысоким, различия между видами минимальны, то же относится и к палочкоядерным нейтрофилам и эозинофилам.

Ранее, при изучении лейкоцитарной формулы морских костистых рыб, Л. В. Точиной (1994) было показано различие в соотношении лейкоцитов периферической крови в зависимости от образа жизни. У пелагических стайных рыб по сравнению с придонными, малоактивными, вне зависимости от систематического положения, уменьшается относительное количество лимфоцитов и увеличивается доля нейтрофилов [9].

Итак, несмотря на то, что принципиальных различий у исследованных нами видов рыб анализ лейкоцитарной формулы не выявил, тем не менее при сравнении данных у пелагического хищника – судака, ведущего подвижный образ жизни, и щуки, которая большую часть времени проводит в растительных зарослях, затаившись в ожидании добычи, выявлено различие в относительном количестве зрелых нейтрофилов, характерное для морских костистых рыб.

Как известно, механизмы специфического иммунитета у рыб менее совершенны, температура тела ниже, чем у высших позвоночных, что обуславливает преобладание у них неспецифических факторов защиты. Последние характеризуются большим разнообразием и быстротой активации. Уже в течение первых часов после воздействия активируется как клеточное звено врожденного иммунитета (происходит сдвиг в процентном содержании лейкоцитов, повышается их фагоцитарная активность), так и гуморальное (возрастает содержание факторов неспецифической защиты – лизоцима, комплемента и т. д. в сыворотке крови) [10]. Поэтому неотъемлемым элементом характеристики состояния врожденного иммунитета является определение гуморальных факторов неспецифической защиты.

К одним из таких важнейших факторов относится лизоцим. Этот протеолитический фермент присутствует в тканях животных почти всех систематических групп, у рыб он обнаруживается в слизи, лимфоидной ткани, плазме и других жидкостях. Его активность зависит от вида, возраста, пола рыб, сезона года, гидрохимических условий и других факторов [11]. Показатель, как правило, обладает очень высокой индивидуальной изменчивостью, что было подтверждено и нашими данными (табл. 1). Именно из-за высокого размаха показателя почти двукратное превышение его у судака по сравнению со щукой оказалось статистически незначимо.

Поскольку защитные соединения, присутствующие в сыворотке, как правило, имеют белковую природу, активность гуморальных неспецифических факторов тесно связана с уровнем содержания сывороточных белков. Сопоставляя полученные данные, можно предположить, что более высокий уровень общего белка в сыворотке крови у судака, вполне возможно, обеспечивает и большее содержание в ней фермента.

Анализируя состояние гуморальных факторов неспецифического иммунитета, нельзя не остановиться на такой важной составляющей поддержания антигенного гомеостаза организма, как процесс образования неспецифических иммунных комплексов, представляющих собой комплексы антиген-антитело. Формируются они в кровяном русле, какое-то время циркулируют там и далее поступают в иммунокомпетентные органы, где уничтожаются клетками ретикулоэндотелиальной системы [12]. Иммунные комплексы, находящиеся в кровяном русле, называются циркулирующими иммунными комплексами (ЦИК).

Полученные нами результаты по этому показателю для обоих видов укладываются в норму для популяции рыб из природных водоемов с низким уровнем загрязнения, при этом различия между ними незначительны (см. табл. 1). Помимо качества воды, подъем уровня ЦИК может быть вызван усиленным поступлением ксенобиотиков с пищей. Исследованные нами рыбы находились в одинаково благополучных по качеству воды условиях, кормовая база также была практически одинаковой. Помимо этого, отсутствие принципиальных различий в лейкоцитарной формуле периферической крови обоих видов позволяет предположить сходство в составе и соотношении лейкоцитов, в том числе антителопродуцирующих, и в иммунокомпетентных органах. Все вышеперечисленные обстоятельства могли обусловить сходство процессов комплексообразования в периферической крови.

Заключение

Обобщая полученные данные, следует заметить, что при изучении естественных популяций рыб выявление достоверных различий по многим показателям затруднено из-за высокой неоднородности особей, являющейся причиной большого размаха вариации. Тем не менее, анализируя полученные нами результаты, можно сказать, что показатели физиологического статуса у судака несколько выше, чем у щуки. Видовыми особенностями пищевого поведения и метаболизма в целом, видимо, можно объяснить столь выраженную разницу в упитанности двух видов рыб-хищников из одного места обитания. Превышение уровня гликемии у судака по сравнению со щукой, скорее всего, объясняется его большей подвижностью, т. е. разницей в образе жизни и в конечном счете также систематическим положением.

Лучшим физиологическим состоянием, а вследствие этого и более высоким содержанием сывороточного белка у судака может объясняться и более высокая активность лизоцима, обеспечивающего, наряду с другими соединениями, протективные свойства сыворотки крови.

Таким образом, в целом можно заключить, что показатели физиологического статуса могут определяться видовой спецификой, в то время как параметры неспецифического иммунитета в большей степени зависят от физиологического состояния и условий обитания рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захарова Л. А. Эволюция адаптивного иммунитета // Изв. РАН. Сер.: Биол. – 2009. – № 2. – С. 143–154.
2. Пустовит Н. С., Пустовит О. П. Некоторые гематологические показатели молоди камчатской микижи *Parasalmo mykiss* // Вопросы ихтиологии. – 2005. – Т. 45, № 5. – С. 680–688.
3. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein - dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
4. Практикум по иммунологии: учеб. пособие / ред. И. А. Кондратьева, В. Д. Самуилов. – М.: Изд-во МГУ, 2002. – 224 с.
5. Анисимова И. М., Лавровский В. В. Ихтиология: учеб. для вузов. – М.: Агропромиздат, 1991. – 288 с.
6. Берестовский Е. Г., Ерохина И. А. Физиолого-биохимические особенности щук тундровых и лесотундровых озер Кольского полуострова // Материалы XXVIII Междунар. конф. «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера». – Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2009. – С. 84–89.
7. Плисецкая Э. М. Гормональная регуляция углеводного обмена у низших позвоночных. – Ленинград: Наука, 1975. – 214 с.
8. Никольский Г. В. Частная ихтиология: учеб. для вузов. – М.: Высш. шк., 1971. – 471 с.
9. Точилина Л. В. Лейкоцитарная формула морских рыб // Гидробиологический журнал. – 1994. – Т. 30, № 3. – С. 50–57.
10. Кондратьева И. А., Китаишова А. А. Функционирование и регуляция иммунной системы рыб // Иммунология. – 2002. – № 2. – С. 97–101.
11. Saurabh Shailesh, Sahoo P. K. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system // Aquacult. Res. – 2008. – Vol. 39, N 3. – P. 223–239.
12. Levinsky R. J. Role of circulating immune diseases // J. Clin. Pathol. – 1981. – Vol. 34. – P. 1214–1222.

REFERENCES

1. Zakharova L. A. Evoliutsiia adaptivnogo immuniteta [Evolution of adaptive immunity]. *Izvestiia RAN. Seriya: Biologicheskaya*, 2009, no. 2, pp. 143–154.
2. Pustovit N. S., Pustovit O. P. Nekotorye gematologicheskie pokazateli molodi kamchatskoi mikizhi *Parasalmo mykiss* [Some hematological indices of Kamchatskaya mykiss *Parasalmo mykiss*]. *Voprosy ikhtiologii*, 2005, vol. 45, no. 5, pp. 680–688.
3. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248–254.
4. *Praktikum po immunologii* [Practical work on immunology]. Redaktery I. A. Kondrat'eva, V. D. Samuilov. Moscow, Izd-vo MGU, 2002. 224 p.
5. Anisimova I. M., Lavrovskii V. V. *Ikhtiologiya* [Ichthyology]. Moscow, Agropromizdat Publ., 1991. 288 p.
6. Berestovskii E. G., Erokhina I. A. Fiziologo-biokhimicheskie osobennosti shchuk tundrovyykh i lesotundrovyykh ozer Kol'skogo poluostrova [Physiological and biochemical features of pike from tundra forest lakes of the Kolskiy peninsula]. *Materialy XXVIII Mezhdunarodnoi konferentsii «Biologicheskie resursy Belogo moria i vnutrennikh vodoemov Evropeiskogo Severa*. Petrozavodsk, Izd-vo KarNTs RAN, 2009, pp. 84–89.
7. Plisetskaya E. M. *Gormonal'naya reguliatsiia uglevodnogo obmena u nizshikh pozvonochnykh* [Hormone regulation of carbon exchange of lower vertebrates]. Leningrad, Nauka Publ., 1975. 241 p.

8. Nikol'skii G. V. *Chastnaia ikhtiologiia* [Private ichthyology]. Moscow, Vysshaia shkola Publ., 1971. 471 p.
9. Tochilina L. V. Leikotsitarnaia formula morskikh ryb [Leukocytic formula of sea fish]. *Gidrobiologicheskii zhurnal*, 1994, vol. 30, no. 3, pp. 50–57.
10. Kondrat'eva I. A., Kitashova A. A. Funktsionirovanie i reguliatsiia immunnoi sistemy ryb [Functioning and regulation of immune system of fish]. *Immunologiia*, 2002, no. 2, pp. 97–101.
11. Saurabh Shailesh, Sahoo P. K. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. *Aquacult. Res.*, 2008, vol. 39, no. 3, pp. 223–239.
12. Levinsky R. J. Role of circulating immune diseases. *J. Clin. Pathol.*, 1981, vol. 34, pp. 1214–1222.

Статья поступила в редакцию 3.12.2012

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Лапирова Татьяна Борисовна – Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанова Российской академии наук, Ярославская область, поселок Борок; канд. биол. наук; старший научный сотрудник лаборатории физиологии и токсикологии водных животных; ltb@ibiw.yaroslavl.ru.

Lapirova Tatyana Borisovna – Institute of Biology of Inland Waters named after I. D. Papanin of Russian Academy of Sciences, Yaroslavl region, Borok; Candidate of Biological Sciences; Senior Research Worker of the Laboratory of Physiology and Toxicology of Aquatic Animals; ltb@ibiw.yaroslavl.ru.

Флёрова Екатерина Александровна – Ярославская государственная сельскохозяйственная академия; канд. биол. наук; зав. химико-аналитическим отделом лаборатории генетического маркирования; katarinum@mail.ru.

Flerova Ekaterina Aleksandrovna – Yaroslavl State Agricultural Academy; Candidate of Biological Sciences; Head of Chemical and Analytical Department of the Laboratory of Genetic Marking; katarinum@mail.ru.