

Г. И. Пронина, Н. Ю. Корягина

РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ФИЗИОЛОГО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГИДРОБИОНТОВ РАЗНЫХ ВИДОВ

Цель исследований – определение референсных значений показателей крови рыб и гемолимфы речных раков – как продолжение исследований по расширению методической составляющей физиолого-иммунологической оценки гидробионтов. Объектами исследования являлись рыбы: карповые (*Cyprinidae*), сомовые (*Siluridae*), осетровые (*Acipenseridae*), щуковые (*Esocidae*); речные раки: длиннопалый (*Pontastacus leptodactylus*) и широкопалый (*Astacus astacus*). Пробы циркулирующих жидкостей отбирали *in vivo* с сохранением жизни и здоровья гидробионтов: кровь – из хвостовой вены рыб; гемолимфу – из вентрального синуса речных раков. Определялись гематологические показатели: гемоцитарная и лейкоцитарная формула. Иммунологические показатели (кислороднезависимые факторы клеточного иммунитета) оценивались по содержанию катионного лизосомального белка в фагоцитах цитохимическим способом, адаптированным для пойкилотермных гидробионтов. Биохимические показатели (содержание общего белка и фракций, глюкозы, креатинина, холестерина), активность ряда ферментов (аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, креатинкиназа) в сыворотке крови рыб определяли на анализаторе Chem Well Awareness Technology с использованием реактивов Vital. Гемолимфу речных раков перед биохимическими исследованиями центрифугировали при 3000 об/мин и температуре +6 °С в течение 5 минут. В результате исследований определены диапазоны изменений показателей для гидробионтов разных видов и представлены референсные значения. Отмечена высокая пластичность большинства показателей. У пойкилотермных гидробионтов синтетические и катаболические реакции активно протекают в широком диапазоне значений температуры.

Ключевые слова: рыбы, речные раки, физиологическое состояние, иммунный статус, гематологические, биохимические, цитохимические показатели.

Введение

Для увеличения выхода товарной продукции в рыбоводных хозяйствах необходим контроль физиологического состояния выращиваемой рыбы или речных раков. С этой целью проводятся различные исследования, результаты которых необходимо рассматривать комплексно. Для оценки результата анализа необходимы определенные сведения об объекте исследования – референсные значения. «Нормальный» результат должен попадать в диапазон референсных значений, определенных для соответствующей группы организмов, которые выделены по таким показателям, как пол, возраст и др. При оценке всех клинико-лабораторных показателей результаты, полученные для данного организма, сравнивают с так называемым «референсным диапазоном» (или «нормой»), полученным в результате обследования большого количества здоровых особей. Безусловно, иногда результаты, выходящие за пределы референсного диапазона, свидетельствуют о заболевании. Однако референсные значения могут зависеть от качества анализа, а также во многом зависят от вида, пола, возраста и других показателей и могут варьировать в широких пределах в одной группе. Так, С. В. Холодкевич с соавторами [1], в результате многочисленных экспериментов на бентосных беспозвоночных (речные раки (*Astacus astacus*, *Pontastacus leptodactylus*) и моллюски (*Mytilus edulis* L., *Mytilus galloprovincialis* Lam., *Littorina littorea* L. и др.)), установили, что индивидуальные различия в ответах тест-животных, отобранных по указанным общепринятым показателям, могут достигать 40–50 % по характеристикам кардиоактивности (частоты сердечных сокращений) и общему белку гемолимфы.

Вследствие этого для разных групп должны быть получены различные референсные диапазоны.

Ориентируясь на референсные значения физиолого-иммунологических показателей гидробионтов, можно определить физиологическое состояние и иммунный статус исследуемой группы рыб или речных раков.

Используемые в рыбоводной практике методы оценки физиологического состояния рыб не дают исчерпывающей информации о метаболизме и состоянии иммунной системы, сложны, трудоемки и затратны [2–5]. Полной физиолого-иммунологической оценки речных раков

не проводилась. Нами была предложена методика клинической лабораторной диагностики гидробионтов, которая является прижизненной, что позволяет сохранять объекты исследования живыми в процессе выращивания и селекционно-племенной работы [6]. Преимуществом данной методики является также то, что в ней используется комплекс наиболее информативных показателей, необходимых и достаточных для оценки состояния здоровья пойкилотермных обитателей водной среды. В то же время мы выбрали методы исследования, не перегружающие и не усложняющие работу и доступные для практического использования в аквакультуре.

Целью настоящей работы являлось определение референсных значений показателей крови рыб и гемолимфы речных раков – как продолжение исследований по расширению методической составляющей физиолого-иммунологической оценки гидробионтов.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись рыбы: карповые (*Cyprinidae*), сомовые (*Siluridae*), осетровые (*Acipenseridae*), щуковые (*Esocidae*); речные раки: длиннопалый (*Pontastacus leptodactylus*) и широкопалый (*Astacus astacus*).

Кровь для анализа отбирали из хвостовой вены рыб. Получение гемолимфы раков *in vivo* осуществляли методом пункции вентрального синуса.

Референсные значения определяли следующими способами:

– *гематологические* – методами дифференциального подсчета показателей гемопоза, лейкоцитарной формулы рыб, гемоцитарной формулы речных раков;

– *иммунологические* – цитохимическим методом по среднему цитохимическому коэффициенту (СЦК) лизосомального катионного белка в нейтрофилах крови рыб и гемоцитах речных раков в реакции с бромфеноловым синим [7], адаптированным для гидробионтов Г. И. Прониной [8], СЦК рассчитывался для рыб (речных раков) по формуле

$$\text{СЦК} = [0 \cdot \text{H}_0(\Gamma_0) + 1 \cdot \text{H}_1(\Gamma_1) + 2 \cdot \text{H}_2(\Gamma_2) + 3 \cdot \text{H}_3(\Gamma_3)]/100,$$

где $\text{H}_0(\Gamma_0)$, $\text{H}_1(\Gamma_1)$, $\text{H}_2(\Gamma_2)$, $\text{H}_3(\Gamma_3)$, % – количество нейтрофилов рыб (гемоцитов речных раков) с активностью 0, 1, 2 и 3 балла соответственно;

– *биохимические* – на анализаторе Chem Well Awareness Technology с использованием реактивов Vital: содержание общего белка и фракций, глюкозы, креатинина, холестерина, активность ряда ферментов (аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), креатинкиназа (КК)) в сыворотке крови.

Статистическая обработка результатов осуществлялась методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента. Достоверными считались различия при $p \geq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Гемопоз у рыб имеет ряд особенностей. В частности, у них больше органов гемопоза, чем у высших позвоночных (млекопитающих), поэтому в крови рыб в норме содержится определенной количество бластных форм эритроцитов. К органам гемопоза у рыб относятся: жаберный аппарат (эндотелий сосудов и ретикулярный синцитий, сосредоточенный у основания жаберных лепестков), кишечник (слизистая), сердце (эпителиальный слой и эндотелий сосудов), почки (ретикулярный синцитий между канальцами), селезенка, сосудистая кровь, лимфоидный орган (скопления кроветворной ткани – ретикулярного синцития – под крышкой черепа).

Наиболее филогенетически древним неспецифическим врожденным фактором иммунной защиты является фагоцитоз. Одной из систем, обеспечивающих биоцидность фагоцитов, являются кислороднезависимые механизмы, к которым относятся специфические катионные белки. В ходе исследований показано, что СЦК лизосомального катионного белка в фагоцитах является индикатором биоцидности циркулирующих жидкостей гидробионтов и позволяет судить о состоянии их клеточного иммунитета.

Наш выбор биохимических показателей для физиологической оценки гидробионтов разных видов был обусловлен следующими причинами.

Аминотрансферазы играют ключевую роль в обмене веществ, объединяя в единое целое белковый, углеводный, жировой обмен. Учитывая исключительную роль этих ферментов в обмене веществ клетки, их активность целесообразно использовать в качестве биохимического индикатора физиологического статуса.

Альбумины сыворотки отражают субстратную обеспеченность анаболических процессов организма и напряженность пластического обмена. Показатель доли альбуминов является одним из оценочных критериев адаптационных возможностей и жизнестойкости организма.

Уровень глюкозы в крови является мягкой константой гомеостаза у гидробионтов. Повышенное содержание глюкозы в крови свидетельствует об интенсивном распаде гликогена печени либо об относительно малом использовании глюкозы тканями, а пониженное ее содержание – об исчерпании запасов гликогена печени либо интенсивном использовании глюкозы тканями организма. По изменению содержания глюкозы в крови судят о скорости ее аэробного окисления в тканях организма при мышечной деятельности и интенсивности мобилизации гликогена печени.

Щелочная фосфатаза катализирует процесс отщепления фосфорорганического остатка от органических доноров. Во многих случаях содержание щелочной фосфатазы увеличивается не за счет механического накопления и высвобождения в кровь, а связано с нейрогенной или хронической индукцией ее синтеза. Нами отмечена обратная корреляция активности фермента с массой тела рыб, что можно использовать в селекционной работе с гидробионтами. Кроме того, отмечается видоспецифичность фермента.

Креатинин является катаболитом макроэргического обмена, преимущественно, в мышечной ткани. Отклонения уровня креатинина от нормы, как правило, свидетельствуют о нарушении функции почек, высокой мышечной активности, или деструктивных изменениях мышечной ткани.

Активность креатинкиназы в сыворотке крови в паре с показателем концентрации креатинина является информативным диагностическим тестом при различных заболеваниях, является отражением напряженности энергетического обмена в мышцах.

Холестерол обеспечивает стабильность клеточных мембран в широком интервале температур, что особенно важно для пойкилотермных организмов, к которым относятся рыбы и речные раки.*

Нами выявлено, что у всех исследуемых видов рыб показатели гемопоэза различаются незначительно и в большей степени зависят от состояния их организма и сезона года (табл. 1).

Таблица 1

Физиологические изменения гематологических, цитохимических и биохимических показателей рыб

Показатель	Вид рыб						
	Карп	Линь	Язь	Сом	Русский осетр	Стерлядь	Щука
Показатели эритропоэза, %							
Гемоцитобласты, эритробласты	0–2	0,5–1,5	–	0–2	0,5	–	–
Нормобласты	0,5–7	2–3,5	2–3	0–6	4,5	2–4	2–3
Базофильные эритроциты	5–19	3–8	7–9	2–20	8–11	10–20	5–7
Сумма зрелых и полихроматофильных эритроцитов	77–92	89–91	87–91	75–98	83–87	80–83	89–92
Лейкоцитарная формула, %							
Миелобласты	0–0,4	–	–	–	–	–	–
Промиелоциты	0–0,4	0,3–1,8	0–0,5	0–2	0–2	0–1,5	0–1,2
Миелоциты	0–3	0–0,5	1–2	0–2	0–0,5	1–2,5	1–3
Метамиелоциты	0–8	0–1	1–3	1–6	2–4	0–1	0–2
Палочкоядерные нейтрофилы	0–10	1–8	2–5	0–18	0–3	2–5	1–3
Сегментоядерные нейтрофилы	0–9	2–5	1–7	0–20	1–4	1–4	2–4
Эозинофилы	0–1	–	–	0–2	–	–	–
Базофилы	0–1	0–3	–	0–2	–	–	–
Моноциты	0–8	1–5	1–4	0–5	2–4	3–6	2–4
Лимфоциты	78–93	79–91	80–92	73–96	85–90	82–89	86–93
Фагоцитарная активность нейтрофилов							
СЦК, ед.	1,5–2,1	1,6–1,9	1,4–2,0	1,5–2,2	1,5–1,9	1,6–2,1	1,6–1,9
Биохимические показатели							
Общий белок, г/дл	14–35			25–40	20–25	20–25	
Альбумин, г/дл	5–18			14–17	14–18	14–19	
Глюкоза, ммоль/л	2–5	6–12		1–20	1–3	2–4	4–9
АЛТ, ед./л	16–58	30–50	25–60	32–70	40–80	50–110	
АСТ, ед./л	82–650	330–350	250–300	83–570	230–270	250–310	210–320
ЩФ, ед./л	9–120	36–50	56–75	3–25	100–190	90–160	45–55
КК, ед./л	90–5000	3000–3200	35–500	1300–3700	2300–2800	2300–2800	3500–3700
Креатинин, мкмоль/л	3–15			6–13	5–12	7–13	25–40
Холестерол, мг/дл	90–140	90–170		68–210	50–80	50–80	90–170

Для рыб характерен лимфоцитарный профиль – основу белой крови составляют лимфоциты, доля которых в общем пуле лейкоцитов не опускается ниже 70 % и не превышает 94 %. Рост доли гранулярных лейкоцитов свидетельствует о неблагополучии рыб с различной этиологией (воспаление, инфекция, инвазия, аллергия).

Нами выявлены различия в соотношении разных форм гемоцитов в гемолимфе широкопалого и длиннопалого речных раков при изменениях условий среды (табл. 2).

Таблица 2

**Средние гематологические, биохимические
и цитохимические показатели гемолимфы речных раков**

Показатель	Вид речного рака	
	<i>Astacus astacus</i>	<i>Pontastacus leptodactylus</i>
Общее число грибов, шт./мкл	250–1200/725*	300–1300/800
Гемоцитарная формула, %		
Агранулоциты	20–45/32,5	20–45/32,5
Полугранулоциты	20–50/35	20–50/35
Гранулоциты	20–45/32,5	20–45/32,5
Прозрачные клетки	0,5–15/6,5	0,3–15/5,5
Биохимические показатели		
Глюкоза, ммоль/л	2–7/4,5	0,2–3/1,6
АЛТ, ед./л	50–170/80	50–170/80
АСТ, ед./л	50–170/120	50–170/120
ЩФ, ед./л	10–25/17,5	30–90/60
Фагоцитарная активность гемоцитов		
СЦК, ед.	1,5–2,0/18,5	1,5–2,0/18,9

* В числителе референсные пределы, в знаменателе – средние значения.

В частности, недостаток кальция в воде и повышение содержания нитратов и нитритов вызывают уменьшение доли гранулоцитов и возрастание относительной доли ювенильных форм гемоцитов. При транспортном стрессе растет доля агранулоцитов на фоне снижения фагоцитов – полугранулоцитов. Представленные гематологические показатели являются индикаторами состояния рыбы, что позволяет использовать их при физиолого-иммунологической оценке.

Заключение

Количество показателей лабораторных исследований, для которых установлены стандартные референсные значения, невелико. Нами определены референсные значения следующих показателей: гематологических (показатели эритропоза, лейкоцитарная формула крови рыб и гемоцитарная формула гемолимфы речных раков), цитохимических (содержание лизосомального катионного белка в фагоцитах циркулирующих жидкостей гидробионтов) и биохимических (содержание субстратов в циркулирующих жидкостях: глюкозы, общего белка и альбуминов, креатинина, холестерина; активность ферментов: аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, креатинкиназы). Значения показателей являются критериями физиологического состояния гидробионтов в процессе культивирования и селекционной работы.

Оценивая коридор изменений химических констант гомеостаза рыб и речных раков, следует подчеркнуть высокую пластичность большинства показателей. У пойкилотермных гидробионтов синтетические и катаболические реакции активно протекают в широком диапазоне значений температуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Холодkevич С. В. Методические подходы к формированию референтных групп бентосных беспозвоночных на основе комплекса оценок их функционального состояния / С. В. Холодkevич, Т. В. Кузнецова, С. В. Сладкова, Г. П. Удалова, В. А. Любимцев // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2010. Т. 1. С. 297–303.
2. Вихман А. А. Системный анализ иммунофизиологической реактивности рыб в условиях аквакультуры / А. А. Вихман. М.: Экспедитор, 1996. 176 с.
3. Микряков В. Р. Актуальные вопросы иммунологии рыб / В. Р. Микряков // Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ. Л.: Наука, 1978. С. 116–133.

4. *Методические указания по определению уровня естественной резистентности и оценке иммунного статуса рыб. Утверждены департаментом ветеринарии от 25.11.1999. № 113-4-2/1795.*
5. *Серпунин Г. Г. Гематологические показатели адаптаций рыб: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Г. Г. Серпунин. Калининград, 2002. 49 с.*
6. *Иванов А. А. Клиническая лабораторная диагностика в аквакультуре. Методические указания / А. А. Иванов, Г. И. Пронина, Н. Ю. Корягина, А. Б. Петрушин. М.: Изд-во ТСХА, 2013. 50 с.*
7. *Шубич М. Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего / М. Г. Шубич // Цитология. 1974. № 10. С. 1321–1322.*
8. *Пронина Г. И. Физиолого-иммунологическая оценка культивируемых гидробионтов: карпа, сома обыкновенного, речных раков: дис. ... д-ра биол. наук / Г. И. Пронина. М.: РГАУ МСХА им. К.А. Тимирязева, 2012. 246 с.*

Статья поступила в редакцию 8.06.2015

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Пронина Галина Иозепоовна – Россия, 142460, Московская область, Ногинский район, пос. им. Воровского; Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбководства; д-р биол. наук; ведущий научный сотрудник лаборатории рыбохозяйственных исследований и поликультуры рыб; gidrobiont4@yandex.ru.

Корягина Наталья Юрьевна – Россия, 142460, Московская область, Ногинский район, пос. им. Воровского; Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбководства; канд. биол. наук; старший научный сотрудник лаборатории рыбохозяйственных исследований и поликультуры рыб; gidrobiont4@yandex.ru.



G. I. Pronina, N. Yu. Koryagina

REFERENCE VALUES OF PHYSIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL INDICATORS OF HYDROBIONTS OF DIFFERENT SPECIES

Abstract. The purpose of the research is to define the reference values of blood parameters of fish and crayfish hemolymph – as a continuation of the researches on the expansion of the methodological component of the physiological and immunological evaluation of aquatic organisms. The objects of the study were fishes: carp (*Cyprinidae*), catfish (*Siluridae*), sturgeon (*Acipenseridae*), pike (*Esocidae*) and crayfish: long-fingered (*Pontastacus leptodactylus*) and broad-fingered (*Astacus astacus*). The samples of the circulating fluid were selected *in vivo* with the preservation of life and health of hydrobionts: blood – from the tail vein of fish; hemolymph – from the ventral sinus of crayfish. The hematologic parameters such as hemocyte and leukocyte formula were determined. The immunological indicators (oxygen independent factors of cellular immunity) were evaluated by the content of lysosomal cationic protein in phagocytes using cytochemical method, adapted to aquatic poikilothermic hydrobionts. The biochemical indicators (total protein and fractions, glucose, creatinine, cholesterol), the activity of some enzymes (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, creatine kinase) in serum of the fish were determined using the analyzer Chem Well Awareness Technology with the reagents Vital. Hemolymph of crayfish before the biochemical studies were centrifuged at 3000 rot/min and the temperature +6 °C during 5 minutes. The studies determined the range of variations of indicators for aquatic organisms of different species and presented the reference values. The high ductility of the most indicators is fixed. The synthetic and catabolic reactions of poikilothermic hydrobionts actively occur in a wide range of the temperatures.

Key words: fishes, crayfish, physiological state, immune status, hematologic, biochemical, cytochemical indicators.

REFERENCES

1. Kholodkevich S. V., Kuznetsova T. V., Sladkova S. V., Udalova G. P., Liubimtsev V. A. Metodicheskie podkhody k formirovaniyu referentnykh grupp bentosnykh bespozvonochnykh na osnove kompleksa otsenok ikh funktsional'nogo sostoianiia [Methodical approaches to formation of the reference groups of benthos invertebrates based on a number of estimations of their functionality]. *Sovremennye problemy fiziologii i biokhimii vodnykh organizmov. Ekologicheskaiia fiziologiia i biokhimiiia vodnykh organizmov*. Petrozavodsk, KarNTs RAN, 2010. Vol. 1, pp. 297–303.
2. Vikhman A. A. *Sistemnyi analiz immunofiziologicheskoi reaktivnosti ryb v usloviakh akvakul'tury* [System analysis of immunological and physiological activity of fish in conditions of aquaculture]. Moscow, Ekspeditor Publ., 1996. 176 p.
3. Mikriakov V. R. Aktual'nye voprosy immunologii ryb [Actual issues of fish immunology]. *Teoreticheskie aspekty rybokhoziaistvennykh issledovaniy vodokhranilishch*. Leningrad, Nauka Publ., 1978. P. 116–133.
4. *Metodicheskie ukazaniia po opredeleniiu urovnia estestvennoi rezistentnosti i otsenke immunnogo statusa ryb* [Methodical recommendations on determination of the level of natural resistance and estimation of the immune status of fish]. Uтверждены департаментом ветеринарии от 25.11.1999, no. 113-4-2/1795.
5. Serpunin G. G. *Gematologicheskie pokazateli adaptatsii ryb*. Avtoreferat dis. dok. biol. nauk [Hematological parameters of fish adaptation. Abstract of dis. doc. biol. sci.]. Kaliningrad, 2002. 49 p.
6. Ivanov A. A., Pronina G. I., Koriagina N. Iu., Petrushin A. B. *Klinicheskaiia laboratornaiia diagnostika v akvakul'ture*. Metodicheskie ukazaniia [Medical laboratory diagnostics in aquaculture. Methodical recommendations]. Moscow, Izd-vo TSKhA, 2013. 50 p.
7. Shubich M. G. Vyiavlenie kationnogo belka v tsitoplazme leukotsitov s pomoshch'iu bromfenolovogo si-nego [Identification of cation protein in cytoplasm of leukocytes using bromphenol blue]. *Tsitologiiia*, 1974, no. 10, pp. 1321–1322.
8. Pronina G. I. *Fiziologo-immunologicheskaiia otsenka kul'tiviruemykh gidrobiontov: karpa, soma obyknovennogo, rechnykh rakov*. Dis. dok. biol. nauk [Physiological and immunological estimation of cultivated hydrobionts: carp, catfish, crayfish]. Moscow, RGAU MSKhA im. K. A. Timiriazeva, 2012. 246 p.

The article submitted to the editors 8.06.2015

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Pronina Galina Iozepovna – Russia, 142460, Moscow region, Noginsk region, village named after Vorovskiy; All-Russian Scientific Research Institute of Irrigational Fish Breeding; Doctor of Biology; Leading Researcher of the Laboratory of Fisheries Researches and Polyculture; gidrobiont4@yandex.ru.

Koryagina Natalya Yurevna – Russia, 142460, Moscow region, Noginsk region, village named after Vorovskiy; All-Russian Scientific Research Institute of Irrigational Fish Breeding; Candidate of Biology; Senior Research Associate of the Laboratory of Fisheries Researches and Polyculture; natalykoryagin@yandex.ru.

