

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 597.554.3:612.017

**ВЛИЯНИЕ ТРАНСПОРТИРОВКИ НА СОСТАВ ЛЕЙКОЦИТОВ  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КАРПА *CYPRINUS CARPIO***

© 2007 г. В.Р. Микряков, Л.В. Балабанова, Д.В. Микряков

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН*

*Ярославская обл., Некоузский р-н, пос. Борок 152742*

Поступила в редакцию 04.04.2007 г.

Окончательный вариант получен 09.04.2007 г.

Изучено влияние транспортировки на состав лейкоцитов периферической крови карпа *Cyprinus carpio*. Рыбы на транспортировку реагировали изменением процентного содержания состава лейкоцитов. В первые дни после перевозки в крови карпов отмечено снижение количества лимфоцитов и увеличение гранулоцитов по сравнению с кровью рыб до транспортировки.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных технологических операций в прудовом рыбном хозяйстве является транспортировка (перевозка) рыб. Транспортировка оказывает стрессирующее воздействие на рыб, вызывая повышение концентрации глюкокортикоидных гормонов (Barton et al., 1980), глюкозы (Wardle, 1972), приводя к сдвигу гематологических параметров (Fletcher, 1986), водно-солевому дисбалансу (Мартемьянов, 1983), снижению иммунитета к инфекционным и инвазионным болезням (Ведемейер и др., 1981; Бауэр и др., 1984; Schaperclaus, 1979).

Состав лейкоцитов и величины, отражающие содержание отдельных типов клеток в онтогенезе и при воздействии на рыб стресс-факторов сильно меняются. Рыбы на изменение условий среды обитания, вызванной загрязнением воды поллютантами, нарушением газового, температурного режима, интенсификацией процессов рыбоводства, технологии их выращивания и т.д. реагируют де- и рестабилизацией количественных и качественных характеристик лейкоцитов (Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989). Одним из таких факторов, вызывающих дисбаланс состава лейкоцитов, снижение иммунореактивности и появление эпизоотий в рыбоводных хозяйствах, является транспортировка. Поэтому исследованию состава лейкоцитов в настоящее время уделяется огромное внимание тем более, что это дает ценную информацию об условиях среды обитания, о характере течения патологических процессов, индуцируемых токсикантами, паразитами, недоброкачественными кормами, последствиях массовых отравлений, эпизоотий инфекционных и инвазионных болезней и др.

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния транспортировки на состав лейкоцитов карпа *Cyprinus carpio*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Влияние транспортировки изучали на 60 двухлетках карпа средней массой 200-250 г. Рыб перевозили в пластиковых ваннах объемом 1 м<sup>3</sup> в течение 10 часов из тепловодного рыбоводного хозяйства ОАО РТФ «Диана» поселка Кадуй Вологодской области до экспериментальной базы «Сунога» ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН. После транспортировки карпов содержали в принудительно аэрируемых аквариумах при температуре воды 18-20 °С. Отбор проб крови проводили через 1,3, 7 и 14 сут. с момента начала перевозки рыб.

О влиянии транспортировки на клетки иммунной системы рыб судили по данным анализа состава лейкоцитов, который определяли в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимза. Кровь получали из хвостовой вены. Мазки крови фиксировали этиловым спиртом и окрашивали по Романовскому-Гимза. В каждом мазке определяли относительное количество лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов, базофилов и бластных клеток.

В качестве контроля использовали показатели лейкоцитарной формулы крови карпов, полученные до начала транспортировки.

Результаты исследований подвергали статистической обработке при помощи стандартного пакета программ (Microsoft Office 98, приложение Statistica) с последующей оценкой различий с использованием t-теста,  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структурно иммунная система рыб, как и у наземных позвоночных, состоит из клеточных и гуморальных компонентов, лимфомиелоидной ткани и органов лимфо- и гемопоэза (Галактионов, 1995). К иммунокомпетентным клеткам рыб принято относить все клетки лимфоидно-макрофагальной системы: лимфоциты, плазмоциты, гранулоциты, макрофаги, эндотелиоциты, клетки Купфера, естественные киллеры и т.д. По характеру выполняемой ими функции они неоднородны и подразделяются на антигенраспознающие, антигенразрушающие, антителосинтезирующие, клетки «памяти». Иммунокомпетентные клетки также осуществляют синтез медиаторов иммунного ответа, цитокинов, интерферона, лизоцима, лизосомальных ферментов и т.д. Основными клетками организма рыб, определяющими работу иммунной системы и синтезирующими большинство иммунологических компонентов, в том числе специфических антител, являются лейкоциты, во всем многообразии их популяций и субпопуляций. Лейкоциты рыб представлены разнообразными по структуре и функции клетками: лимфоцитами, моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами и базофилами. Разнообразие форм клеток, составляющих основу лейкоцитарной формулы или лейкограммы, определяется видовыми и экологическими особенностями рыб (Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989).

Лейкоциты рыб, в отличие от таковых высших позвоночных, в основном представлены лимфоцитами, тогда как у теплокровных - клетками нейтрофильного ряда. Центральной фигурой иммунной системы рыб, как и у представителей других классов позвоночных, является лимфоцит. Лимфоциты рыб по характеру выполняемых функций, содержанию мембранных иммуноглобулиновых рецепторов, продолжительности жизни и гистогенезу являются гетерогенными и подразделяются на две субпопуляции. Условно их обозначают как Т- и В-лимфоциты (Микряков, 1991; Микряков и др., 2001; Кондратьева и др., 2001; Степанова, Микряков, 2002; Manning, Nakanishi, 1996). Т-лимфоциты в организме рыб осуществляют распознавание «своего» и «чужого», участвуют в передаче антигена (иммуногена) макрофагам, обладают цитотоксической активностью и т.д. Местом образования этих клеток является тимус, и они относятся к долгоживущим клеткам (Manning, Nakanishi, 1996). Популяция В-лимфоцитов выполняет функцию синтеза антител и образования предшественников антителообразующих клеток. Они относятся к короткоживущим клеткам (Микряков, 1991). Важную роль в реализации иммунологических функций выполняют и другие типы лейкоцитов: гранулоциты и моноциты. Они участвуют в фагоцитозе микроорганизмов, синтезе цитокинов, медиаторов, неспецифических факторов иммунитета: лизоцима, интерферона, гемолизина, хитиназы и т.д. (Manning, Nakanishi, 1996; Secombes et al., 1996). У карпов нейтрофилы функционируют как клетки-киллеры, разрушающие инфицированные вирусами клетки. Нейтрофилы поглощают зараженные клетки при первом контакте с ними или разрушают их путем выделения токсических кислородных метаболитов (супероксидный радикал, гидроперекисный радикал, гидроксильный радикал, синглетный кислород, перекись водорода, оксид азота и др.). Эозинофильные гранулоциты обладают цитотоксическими свойствами и выполняют важную роль в защите рыб от паразитов (Vazzana et al., 1998).

Анализ данных состава лейкоцитов карпа позволил установить все основные типы клеток, характерные для данного вида рыб (лимфоциты, моноциты, палочко- и сегментоядерные нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и бластные формы).

При исследовании лейкограмм периферической крови карпов, подвергнутых транспортировке, по сравнению с контрольными, нами отмечены различия в содержании лимфоцитов, палочкоядерных нейтрофилов и бластных форм клеток (табл.). У опытных рыб наблюдали лимфопению, нейтрофилию и уменьшение количества бластных форм клеток по сравнению с интактными особями.

Зафиксировано уменьшение количества лимфоцитов у опытных карпов после транспортировки по сравнению с контролем на 15,3% через 1 сут. и на 7,2% через 3 сут. Значительное увеличение на 15% содержания нейтрофилов, основной функцией которых является фагоцитоз микроорганизмов, нами отмечено в крови карпов на следующий день после перевозки. Достоверные различия в процентном

соотношении палочкоядерных нейтрофилов у опытных (14,7%) и контрольных (5,4%) рыб отмечены также на 3 сут. наблюдения. К концу недели показатели процентного содержания лимфоцитов и нейтрофилов между опытом и контролем имеют небольшое различие, что указывает на возвращение к норме и стабилизацию структурно-функционального состояния органов иммунопоэза.

**Таблица.** Изменение количества лейкоцитов крови карпа после транспортировки, %.

**Table.** Change of quantity of leukocytes of blood of a carp after transportation, %.

Время, сут	Лимфоциты	Моноциты	Палочко-ядерные нейтрофилы	Сегментоядерные нейтрофилы	Эозинофилы	Базофилы	Бластные формы
Перед транспортировкой	76,7±3,46	2,7±0,41	5,4±1,84	1,5±0,45	4,9±0,53	1,3±0,31	7,6±0,76
Через 1 сут	61,4±4,38*	2,8±0,58	19,0±3,06*	2,8±0,46	5,0±0,57	2,0±0,50	7,0±1,00
Через 3 сут	69,5±5,61*	2,2±0,51	14,7±3,90*	2,7±0,51	4,8±0,93	1,1±0,24	5,0±0,97*
Через 7 сут	78,9±3,56	1,5±0,35	8,6±1,93	1,9±0,36	3,2±0,64	0,9±0,33	5,0±0,85
Через 14 сут	84,3±1,65	1,2±0,20	8,0±1,54	1,6±0,55	1,4±0,18	0,4±0,18	3,1±0,60*

**Примечание:** \* – достоверно относительно контроля при  $p \geq 0,05$ .

**Note:** \* – difference is significant at  $p \geq 0,05$ .

Также зафиксировано постепенное уменьшение содержания бластных форм клеток. К концу срока наблюдения у опытных рыб количество этих клеток снизилось до 3,1% по сравнению с 7,6% у особей, исследованных до транспортировки.

Достоверных различий между процентным содержанием других типов клеток крови между опытными и контрольными рыбами нами не наблюдалось.

Из материалов исследований следует, что транспортировка вызывает дестабилизацию структурной организации состава лейкоцитов. Иммунная система карпа на транспортировку реагирует изменением состава лейкоцитов, наблюдается лимфопения, нейтрофилия и снижение содержания бластных форм клеток. Вызванное транспортировкой изменение процентного соотношения лейкоцитов в крови карпов вызывает снижение функции клеточного иммунитета. Наблюдаемые нами тенденции в лейкоцитарной формуле крови транспортируемых карпов аналогичны таковым у рыб, подвергшихся воздействию других стресс-факторов: токсическому (Микряков и др., 2001), паразитарному (Головина, Тромбицкий, 1989), гормональному (Микряков, 2004; Микряков, Микряков, 2005) и т.д. Снижение содержания лимфоцитов, сопровождающееся увеличением нейтрофилов, установленное после транспортировки, свидетельствует об угнетении процессов дифференцировки стволовых кроветворных клеток в сторону лимфоидного ряда, ответственных за распознавание «своего» и «чужого», реализацию специфического иммунного ответа и формирование



адаптивного иммунитета к паразитам, вызывающим заразные болезни. Происходящие в составе лейкоцитов изменения носили обратимый характер.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №06-04-48812).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Бауэр О.Н., Мусселиус В.С., Стрелков Ю.С.* Болезни прудовых рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 319 с.

*Ведемейер Г.А., Мейер Ф.П., Смит Л.* Стресс и болезни рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. 127 с.

*Галактионов В.Г.* Очерки эволюционной иммунологии. М.: Наука, 1995. 256 с.

*Головина Н.А., Тромбицкий И.Д.* Гематология прудовых рыб. Кишинев: Штиинца, 1989. 156 с.

*Иванова Н.Т.* Атлас клеток крови рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 184 с.

*Кондратьева И.А., Киташова А.А., Ланге М.А.* Современные представления об иммунной системе рыб // Вест. Моск. ун-та. сер. 16. Биология. М., 2001. №4. С. 11-20.

*Мартемьянов В.И.* Динамика содержания электролитов у пресноводных рыб при стрессе. Автореф. дисс... канд биол. наук. 1983. 18 с.

*Микряков В.Р.* Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск, 1991. 153 с.

*Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. и др.* Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление воды. М.: Наука, 2001. 126 с.

*Микряков Д.В.* Влияние некоторых кортикостероидных гормонов на структуру и функцию иммунной системы рыб: Автореф. дисс... кандидата биол. наук. М., 2004. 24 с.

*Микряков Д.В., Микряков В.Р.* Влияние гормона стресса кортизона на лейкоциты крови карася *Carassius carassius* // Биол. внутр. вод. 2005. №4. С. 90-94.

*Степанова В.М., Микряков В.Р.* Использование метода Мендеса для изучения субпопуляций лимфоцитов карпа (*Cyprinus carpio*) // Биол. внутр. вод. 2002. №3. С. 84-87.

*Barton B.A., Peter R.E., Paulencu Ch.R.* Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport and stocking // Can. J. Fish. and Aquat. Sci., 1980. V. 37. №5. Pp. 805-811.

*Fletcher G.L.* Modulation of nonspecific host defenses in fish // Vet. Immunol. Immunopathol. 1986. V. 12. Pp. 59-67.

*Manning M.J., Nakanishi T.* The specific immune system: cellular defenses. London. Academic Press. 1996. Pp. 160-206.

*Schaperclaus W.* Fischkrankheiten. Berlin: Acad.-Verlag., 1979. 1090 p.

*Secombes C.J., Hardie L.J., Daniels G.* Cytokines in fish: An update // Fish Shellfish Immunol. 1996. №6. Pp. 291-304.

*Vazzana M., Cammarata M., Reas G.* Chemiluminescence and cytotoxic activity in leukocytes of *Dicentrarchus labrax*. Abstr. Free Commun. Present. 2 Meet. Ital. Assoc. Dev. and Comp. Immunol. (IADCI), Palermo, Juli 9-10, 1998 // Anim. Biol. 1998. 7. №3. P. 155.

*Wardle C.S.* The changes in blood glucose in *Fleuronectes platessa* following capture from the wild: a stress reaction. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 1972. V. 52. №3. Pp. 635-561.

**INFLUENCE OF TRANSPORTATION ON STRUCTURE LEUKOCYTES  
OF PERIPHERAL BLOOD CARP *CYPRINUS CARPIO***

© 2007 y. **V.R. Mikrjakov, L.V. Balabanova, D.V. Mikrjakov**

*Papanin's Institute for biology of inland waters of the  
Russian Academy of Science, Borok*

Influence of transportation on structure leukocytes of peripheral blood carp *Cyprinus carpio* is studied. Fishes reacted to transportation by change of percentage of structure of leukocytes. In the first week of acclimatization after transportation in blood of carps decrease in quantity lymphocytes and increase granulocytes in comparison with blood of fishes before transportation is noted.