

УДК 575.224:57.577

ГОМЕОСТАЗ ВНУТРЕННЕЙ СРЕДЫ ГИДРОБИОНТОВ: ВИДОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ ХЛАДНОКРОВНЫХ

А.А. ИВАНОВ, Г.И. ПРОНИНА, Н.Ю. КОРЯГИНА, А.О. РЕВЯКИН

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

Описаны особенности гомеостаза хладнокровных гидробионтов из разных систематических групп: раков, рыб, земноводных. Гемолимфу получали методом пункции вентрального синуса. Кровь у рыб брали при помощи хирургического шприца из хвостовой вены. У лягушек кровь получали из сердца после предварительной общей анестезии. Концентрацию неферментного катионного белка в лизосомах нейтрофилов измеряли по методу М.Г. Шубича после авторской модификации и адаптации для анализа крови раков, рыб и земноводных. Авторы предложили собственную классификацию гемоцитов гемолимфы раков и описали функции отдельных классов гемоцитов. Авторы сообщают об обнаружении нового класса гемоцитов в составе гемолимфы раков, которые они назвали как «прозрачные клетки». Для раков характерно отсутствие жестких констант гомеостаза, низкая субстратная обеспеченность анаболических процессов, малое количество клеточных элементов в гемолимфе. Карп на фоне раков и земноводных в условиях опыта выделялся высоким уровнем триглицеридов, холестерина и активностью АСТ крови. Авторы обращают внимание на чрезвычайную волатильность концентрации альбуминов и глюкозы в сыворотки крови рыб и ассоциируют это явление с естественным неизбежным голоданием в зимний сезон. Картина крови в мазках крови использовалась для оценки гемопоэза рыб. Присутствие юных форм эритроцитов таких, как эритробласты и нормобласты, свидетельствуют об активизации эритропоэза. У амфибий выявили лимфоцитарный профиль и, как норму, присутствие овальной формы эритроцитов. К особенностям земноводных отнесли напряженный белковый обмен (высокий уровень общего белка, альбуминов, активность ферментов переаминирования, концентрация мочевины), относительный нейтрофилиз и эозинофилию.

Ключевые слова: речные раки, карп, земноводные, кровь, гомеостаз.

В условиях средней полосы России фауна внутренних водоемов представлена по большей части пойкилотермными животными. Многие из них являются объектами аквакультуры. Физиология этих животных остается предметом изучения. Жизнь в водной среде накладывает свой отпечаток на строение тела, физиологию и биохимию гидробионтов.

Исследование значений констант внутренней среды позволяет оценить устойчивость гомеостаза и адаптивные способности животных. Эволюция животных преследует цель оптимизации обмена веществ и энергии живого существа с окружающей средой, на защиту организма от воздействия неблагоприятных факто-

ров [3]. Эволюционные изменения морфологии животных сопровождаются изменениями функций органов. Вследствие этого состав и свойства внутренней среды (крови, гемолимфы) животных, занимающих разное положение, ожидаемо неодинаковы. Однако характер этих отличий, особенности гомеостатических регуляторных механизмов и пределы референтных значений отдельных констант гомеостаза зачастую не известны [10]. А эта информация важна как в теоретическом, так и прикладном аспектах. Особая скудность информации в части гомеостаза характерна для представителей фауны, обделенных вниманием исследователей из утилитарных соображений, но занимающих важное место в составе биоценозов пресных водоемов (ракообразные, амфибии). Речные раки, рыба и амфибии выступают естественными элементами водных биоценозов и одновременно являются важным объектом промысла.

Так, лишь в последние годы исследователи обратили внимание на речных раков, естественные популяции которых подверглись мощному антропогенному прессингу [4,12]. Когда-то обычные для водоемов средней полосы России животные практически исчезли из состава водных биоценозов [14, 20]. Возникла реальная угроза их полного исчезновения и необходимость разработки технологий их искусственного воспроизведения. А разведение животных в искусственных условиях невозможно без знаний особенностей их физиологии.

Цель данной работы — сравнительный анализ гомеостаза хладнокровных гидробионтов, стоящих на разных ступенях эволюции.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись представители разных систематических групп: ракообразных на примере широкопалых речных раков (*Astacus astacus*), рыб на примере карпа (*Cyprinus carpio* L.), земноводных на примере травяных лягушек (*Rana temporaria*) и гладких шпорцевых лягушек (*Xenopus laevis*). В исследованиях были использованы 24 особи речных раков, 40 голов карпа, 10 травяных лягушек, 10 шпорцевых лягушек.

Гемолимфу речных раков получали путем пункции вентрального синуса. Кровь у рыб отбирали из хвостовой вены, у лягушек — из сердца. Данные процедуры проводили с соблюдением правил асептики.

У раков общее число гемоцитов (ОЧГ) и гемоцитарную формулу определяли методом светового микроскопирования с использованием камеры Горяева. Показатели эритропоза и дифференциальный подсчет лейкоцитов в крови рыб (лейкоформула) определяли в окрашенных по Паппенгейму мазках периферической крови микроскопически на цифровом микроскопе Optika DM 15. Уровень гемопоэза рыб и земноводных оценивался по присутствию в периферической крови незрелых форм эритроцитов.

Биохимический анализ гемолимфы и крови проводили на автоматизированном комплексе Chem Well Awareness Technology. Перед исследованием гемолимфу центрифугировали при 3000 об./мин и температуре +6° С в течение 5 мин.

Фагоцитарная активность нейтрофилов рыб и гемоцитов речных раков определялась цитохимическим методом по М.Г. Шубичу [15].

При определении неферментного лизосомального катионного белка в фагоцитах исследуемые клетки делились на 4 группы по степени их фагоцитарной активности (рис. 1-6):

0 степень — гранулы катионного белка отсутствуют;

1 степень — единичные гранулы;

2 степень — гранулы занимают примерно 1/3 цитоплазмы;

3 степень — гранулы занимают 1/2 цитоплазмы и более.

Средний цитохимический коэффициент (СЦК) по L. Kaplow [20] рассчитывают по формуле

$$\text{СЦК} = (0 \times H_0 + 1 \times H_1 + 2 \times H_2 + 3 \times H_3) / 100,$$

где H_0 , H_1 , H_2 , H_3 — количество нейтрофилов с активностью 0, 1, 2 и 3 балла соответственно.

В адаптированном варианте для речных раков формула выглядит следующим образом:

$$\text{СЦК} = (0 \times \Gamma_0 + 1 \times \Gamma_1 + 2 \times \Gamma_2 + 3 \times \Gamma_3) / 100,$$

где Γ_0 , Γ_1 , Γ_2 , Γ_3 — количество гемоцитов с активностью 0, 1, 2 и 3 балла соответственно.

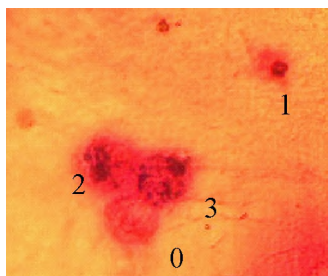


Рис. 1. Гемоциты широкопалого речного рака

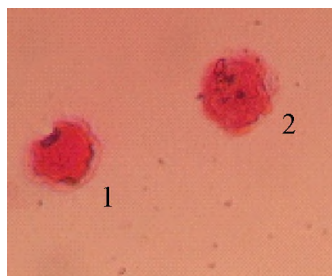


Рис. 2. Гемоциты широкопалого речного рака



Рис. 3. Нейтрофил травяной лягушки



Рис. 4. Нейтрофил карпа

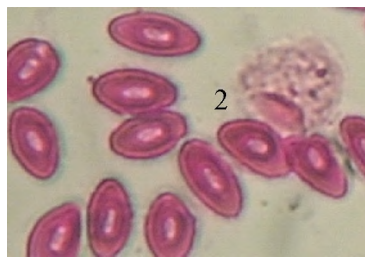


Рис. 5. Нейтрофил сома обыкновенного

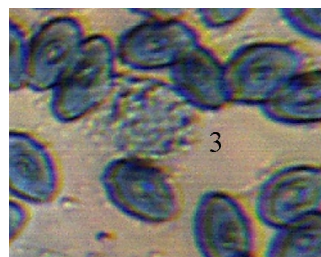


Рис. 6. Нейтрофил сома обыкновенного

Цифрами показана степень активности клеток (0 — минимальная активность, ... 3 — максимальная бактерицидная активность фагоцитов).

Результаты и их обсуждение

О физиологии ракообразных известно немного. Кровеносная система у животных этой группы незамкнутая. Циркулирующей по организму рака жидкостью является гемолимфа. Частично гемолимфа движется внутри сосудов, выстланных собственным эпителием, частично же она заполняет полости тела — синусы [13].

У животных с циркулирующей кровью дыхательным пигментом является ген, содержащий четыре атома железа, соединенный с белком глобином в гемоглобин [1]. В группе ракообразных гемоглобином обладают лишь некоторые животные. Это рачок артемия, дафния, один паразитический веслоногий рачок, один представитель остракода и один паразитический усоногий рачок. В гемолимфе десятиногих раков в свободном состоянии присутствует гемоциан — дыхательный белковый пигмент, содержащий в своем составе два атома меди [16, 19].

Внутренняя среда раков — гемолимфа — неоднородна по своему составу. В нее входит жидкая часть лимфы и клеточные структуры. Клеточная часть гемолимфы речных раков представлена полиморфными гемоцитами (рис.7). Нами предложены следующие критерии для дифференцировки этих клеток [11].

Гемоциты (ГЦ) рака по морфологическим признакам можно разделить на четыре группы. *Агстулоциты* (ГЦ I). Малые клетки размером 3-17 мкм, обычно сферической формы, содержат только малое количество крошечных цитоплазматических включений. Гемоциты этого типа дольше других клеток сохраняются на стекле в неизменном виде.

Полугранулоциты (ГЦ II). Подобны по размерам гранулированным клеткам, имеют размеры в пределах 8-40 мкм. Это, как правило, более крупные клетки, по сравнению с ГЦ I их цитоплазма содержит меньшее количество микроскопических лучепреломляющих гранул. Изредка

встречаются ГЦ II веретенообразной формы с ясно видимым центрально расположенным ядром. *In vitro* на стекле цитоплазма этих клеток разрушается быстро, и через 30-40 мин ГЦ II становятся трудно отличимыми от агранулоцитов.

Гранулоциты (ГЦ III). Это самые крупные клетки гемолимфы, которые могут достигать размеров 50 мкм и больше. Их цитоплазма заполнена многочисленными и крупными гранулами с высоким лучепреломлением. Через 15 мин после отбора гемолимфы *in vitro* начинается выброс гранул с последующим растворением цитоплазмы.

Прозрачные клетки (ГЦ IV). Это структуры размером 8-35 мкм. В нативной эндолимфе при световом микроскопировании мазков эндолимфы эти клеточные структуры идентифицируются с трудом, поскольку являются прозрачными. При микроскопировании на стекле ядра клеток не просматриваются, что послужило поводом для названия ГЦ IV прозрачными клетками. Ядро ГЦ IV не просматривается из-за большого количества цитоплазмы. По истечении некоторого времени (от 15 до 50 мин),



Рис. 7. Микроскопическая картина гемолимфы широкопалого речного рака. Окраска по Паппенгейму. Увеличение 10х40. Обозначения: 1 — агранулоциты, 2 — полугранулоциты, 3 — гранулоциты, 4 — прозрачные клетки

становится видимым крупное овальное ядро этих клеток. При окрашивании мазков эндолимфы по Паппенгейму ядра прозрачных клеток визуализируются в поле зрения микроскопа, поскольку приобретают темно-фиолетовый цвет. Помимо этого, ГЦ IV отличает наличие большого количества псевдоподий.

Циркулирующей жидкостью рыб и земноводных является кровь. Клеточную часть крови, как известно, составляют эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. Наличие в периферической крови рыб зрелых и незрелых (молодых) эритроцитов является нормальным явлением и не служит показателем неблагополучия в отличие от млекопитающих. В эритроцитах рыб в отличие от эритроцитов млекопитающих имеется крупное ядро (рис. 8).

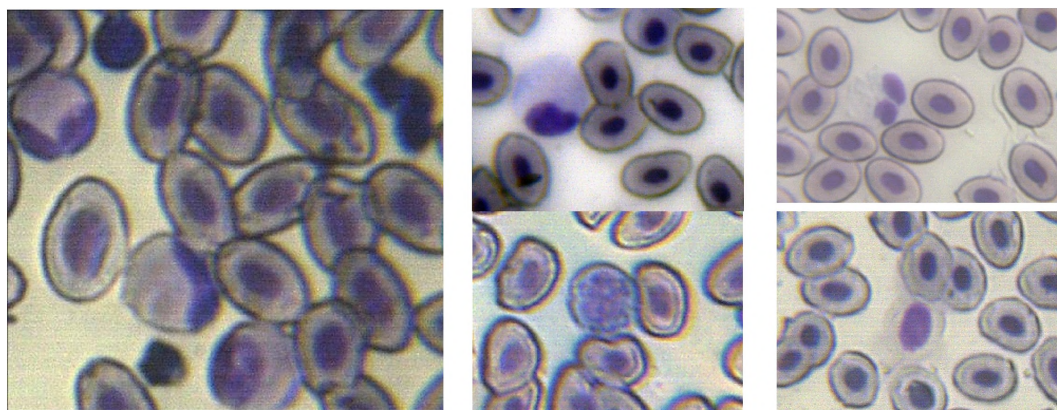


Рис. 8. Микроскопическая картина крови карпа. Окраска по Паппенгейму. Увеличение 10 x 40

Эритроциты сома и карпа имеют диаметр 9-11 мкм. Размер лейкоцитов зависит от их вида клеток и составляет от 10 до 25 мкм [2]. Самыми крупными клетками крови рыб являются моноциты, диаметр которых превышает 50 мкм [5].

Прозэритробласт — на окрашенных мазках крови хроматин имеет нежную зернистость, цитоплазма клеток слегка базофильна. При электронно-микроскопическом исследовании в клетках этого типа отмечается отсутствие гранулярного эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. По мере дифференцировки клеток в них появляются свободные рибосомы и полирибосомы, диффузно распределенные по цитоплазме.

Прозэритробласт способен к пролиферации, а дифференциация его потомства приводит к появлению *базофильного эритробласта*. Базофилия цитоплазмы объясняется обилием в ней полирибосом. Другие органеллы присутствуют в цитоплазме в минимальном количестве. Базофильные эритробласты способны к воспроизводству. Этим объясняется наличие свободных рибосом — органелл, необходимых для синтеза пластического материала всех клеточных органелл. Однако по мере созревания клетки свободных рибосом становится меньше. Установлено, что полирибосомы базофильного эритробласта — это органеллы, в которых происходит синтез глобиновых цепей гемоглобина.

Следующий этап дифференцировки в этом ряду характеризуется появлением *полихроматофильного эритробласта*. Наблюдаемая в мазках крови полихромато-

фильность связана с полирибосомами, взаимодействующими со щелочным компонентом красителя. Гемоглобин, синтезируемый на полирибосомах, ацидофилен. Это последняя клетка в эритроидном ряду, способная к митозу.

Далее клетка утрачивает способность к делению, ее цитоплазма теряет базофилию и превращается в *нормобласт*. В специальной литературе встречается и ее другое название — *нормоцит* [3. 7].

Эритропоэз заканчивается формированием зрелой клетки — *эритроцита*.

Кровь рыб лимфоцитарного типа. В лейкоцитарной формуле преобладают лимфоциты. Процентное соотношение разных типов лейкоцитов (лейкоформула) отражает не только физиологическое состояние рыб, но некоторые стороны клеточного иммунитета. Все типы лейкоцитов в той или иной степени причастны к иммунной защите организма.

Все типы лейкоцитов (лимфоциты, моноциты, базофилы, эозинофилы и нейтрофилы) имеют ядро и способны к активному амебоидному движению. В организме рыб лейкоциты поглощают бактерии, отмершие и раковые клетки, синтезируют биологически активные вещества, вырабатывают антитела. Лейкоциты не только выполняют защитные функции, но и играют значительную роль в обмене веществ, особенно белковом и жировом.

Лейкоциты делятся на гранулоциты (содержащие гранулы) и агранулоциты (незернистые лейкоциты).

Агранулоциты (лимфоциты и моноциты). Лимфоциты у рыб составляют большую часть всей суммы лейкоцитов периферической крови. Лимфоциты выполняют функцию иммунного надзора в организме, отвечают за формирование общего и специфического иммунитета. Лимфоциты синтезируют антитела в ответ на внедрение антигенов, лизируют чужеродные клетки, обеспечивают уничтожение собственных мутантных клеток, формируют иммунную память, участвуют в реакции отторжения трансплантата. Выполнение перечисленных функций осуществляется специализированными формами лимфоцитов. В настоящее время различают три популяции лимфоцитов: Т-лимфоциты, В-лимфоциты и нулевые лейкоциты.

Моноциты являются самыми крупными клетками белой крови, поэтому зачастую называются макрофагами. Они обладают самой высокой фагоцитарной активностью по отношению к продуктам распада клеток и тканей, обезвреживают токсины, образующиеся в очагах воспаления.

Характеризуя систему мононуклеарных фагоцитов, следует отметить, что она объединяет связанные воедино монобласты, промоноциты, моноциты и различные по структуре тканевые макрофаги, которые ранее относили к ретикулоэндотелиальной системе. Макрофаги — долгоживущие фагоцитарные клетки, обладающие большинством функций нейтрофилов. Они участвуют в целом комплексе иммунологических процессов, не опосредуемых нейтрофилами [7, 9].

Гранулоциты. К этой группе относят нейтрофилы, базофилы и эозинофилы. Нейтрофилы (микрофаги) являются наиболее подвижными клетками защиты организма от бактерий. Проникая через стенки капилляров, нейтрофилы попадают в межтканевые пространства, где включаются в развитие воспалительного процесса. Они способны к фагоцитозу мелких инородных частиц, в т.ч. бактерий, могут растворять (лизировать) омертвевшие ткани. Эозинофилы содержат многочисленные лизосомные включения, обладают хемотаксическими свойствами, способностью к фагоцитозу и окислительному метаболизму. По сравнению с нейтрофилами эозинофилы отличаются большей продолжительностью жизни, а тканевые эозинофилы могут

рециркулировать. При паразитарных поражениях эозинофилы играют центральную роль в защите организма хозяина.

Базофилы принимают участие в воспалительных и аллергических реакциях, в регуляции проницаемости сосудистой стенки. Важнейшей функцией базофилов является синтез, накопление в гранулах и выведение гистамина. Гистамин — это специфический биоактивный амин, который играет важную роль в гуморальных механизмах управления воспалением. Базофилы синтезируют, накапливают в гранулах и выводят гепарин, известный прежде всего как антикоагулянт, а также как средство регулирования клеточной пролиферации, реализации комплемента, фагоцитоза и пиноцитоза. Базофилы могут секретировать простагландины, тромбоксаны, лейкотриены, фактор хемотаксиса эозинофилов и нейтрофилов, серотонин, протеазы, фактор активации кровяных пластинок и многие другие биоактивные вещества. Тканевые базофилы способны к фагоцитозу.

Лейкоциты земноводных обычно мельче, имеют неправильно-округлую форму и могут двигаться амебообразно. По особенностям строения выделяют несколько классов лейкоцитов с разной частотой встречаемости. Ядра лимфоцитов обычно округлы, заполняют почти все внутриклеточное пространство. Лейкоциты земноводных подвижны и активно мигрируют в очаг воспаления. У зеленой лягушки при температуре +20° С скорость движения лейкоцитов составляет 0,13 мкм в секунду.

Базофилы крови лягушки малы, густо наполнены средней величины зернами. Эозинофилы правильной, круглой формы, содержат отдельно лежащие в цитоплазме зерна. Цитоплазма интенсивно голубого цвета.

Лейкоцитарная формула земноводных носит лимфоидный характер: от 86 до 96% лейкоцитов периферической крови приходится на лимфоциты. Среди клеток белой крови встречались нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты разной степени зрелости и даже лимфоплазмocyты [7].

Образование клеток крови у рыб происходит во многих органах [2, 7]. Очагами кроветворения являются почки (ретикулярный синцитий между канальцами), жаберный аппарат (эндотелий сосудов и ретикулярный синцитий, сосредоточенный у основания жаберных лепестков), кишечник (слизистая), сердце (эпителиальный слой и эндотелий сосудов), селезенка, сосудистая кровь, лимфоидный орган.

На отпечатках, сделанных со срезов этих органов, всегда присутствуют кровяные клетки разных типов разных стадий зрелости. У костистых рыб наиболее активно гемопоэз происходит в лимфоидных органах, почке и селезенке. При этом главным органом кроветворения являются почки (проксимальная часть). В почках и селезенке происходит как образование эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, так и распад эритроцитов [2, 5].

Данных по клеточному составу крови амфибий крайне мало. Известно, что земноводные выделяют крупным размером эритроцитов. Диаметр эритроцита у бесхвостых амфибий лежит в пределах 15-23 мкм, у хвостатых амфибий еще больше — 27-70 мкм. Количество гемоглобина в крови земноводных колеблется в широких пределах — 19-100 г/л [2, 3].

Картина крови травяных лягушек представлена на рисунке 9.

Наши исследования показали, что эритроциты травяной лягушки представляют собой эллипсоидные тельца, несколько вогнутые в центре. Их протоплазма имеет желтоватый цвет благодаря пропитывающему ее белку гемоглобину. Внутри клетки располагается ядро, по форме соответствующее форме клетки (как правило, овальное).

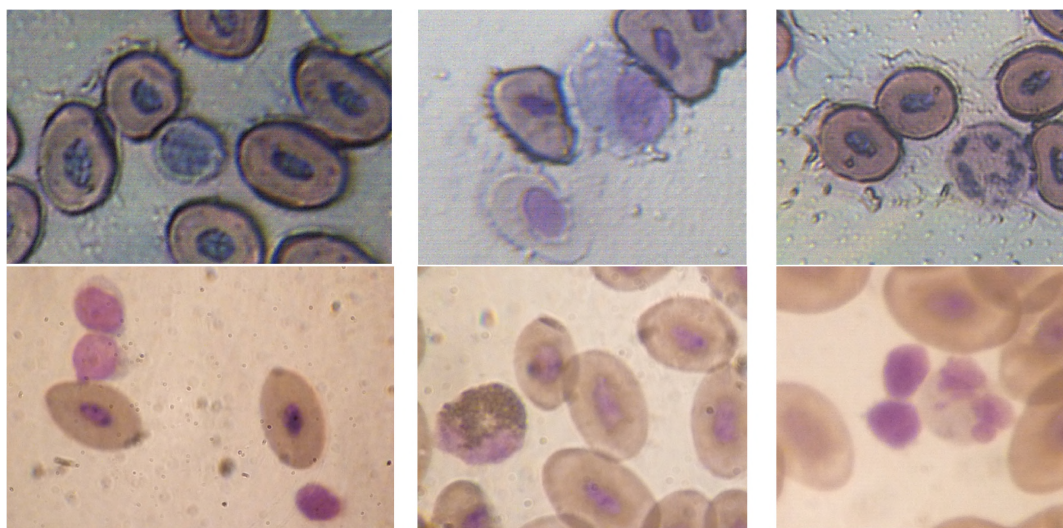


Рис. 9. Микроскопическая картина крови травяной лягушки. Окраска по Паппенгейму. Увеличение 10 x 40

Некоторые виды амфибий имеют до 5% безъядерных эритроцитов, которые называют эритропластидами. В этом смысле особняком стоит безлегочная саламандра: у нее до 95% эритроцитов не имеют ядра.

Тромбоциты лягушек — довольно крупные ядерные структуры (5 x 17 мкм) эллиптической, вытянутой формы. Правда, у отдельных бесхвостых амфибий обнаружены и безъядерные тромбоциты [13].

У земноводных сравнительно высокая интенсивность кровообращения, что обеспечивает высокий уровень метаболизма, необходимый для адаптации как в воде, так и на суше. На суше большая часть метаболической энергии тратится на преодоление гравитации. Это дало возможность земноводным освоить сушу. Однако произошло это ценой заметного ограничения подвижности.

У амфибий, в отличие от костистых рыб, впервые возникает специальный очаг кроветворения — красный костный мозг, хотя активность его периодическая и зависит от времени года. Развитие костного мозга связывают с выходом земноводных на сушу, неизбежным в этом случае развитием скелета в ответ на действие сил гравитации [6].

У земноводных кроветворную функцию выполняет и селезенка. В этом органе имеет место разделение между красной и белой пульпой. Белая пульпа включает скопления лимфоцитов на разных этапах клеточной дифференцировки. Кроме того, в селезенке обнаружено большое количество эритроцитов, находящихся на разных этапах разрушения. У бесхвостых амфибий в этом органе много меланоцитов.

У гребенчатых тритонов существует механизм обратимого увеличения размеров селезенки в связи с особенностями дыхания в водной и воздушной средах. Если животное находится на воздухе, то его организм в избытке снабжается кислородом. В этом случае эритроциты депонируются в селезенке. В водной среде у земноводных развивается относительное гипоксическое состояние. Регуляторные механизмы

гомеостаза кислорода осуществляют выброс эритроцитов из депо в кровь, что повышает кислородную емкость крови и эффективность транспорта дыхательных газов кровью в целом [17].

Ретикулярная ткань кроветворных органов располагается у земноводных вне сосудистой системы и благодаря способным к клонированию стволовым клеткам обеспечивает начальные стадии развития клеток крови.

Попав в сосудистую систему, незрелые клеточные структуры выполняют свои основные функции. При этом по существу незрелые клетки продолжают оставаться в процессе созревания и дифференцировки.

У холоднокровных гидробионтов механизм гемостаза подобен тому, что наблюдается у теплокровных, с той лишь разницей, что он адаптирован к низким температурам. Так, у шпорцевой лягушки снижение температуры тела до 10° С существенно не влияет на процесс гемостаза. У земноводных ферменты каскада свертывания способны работать в более широком диапазоне температур, чем у теплокровных животных [3, 10].

У земноводных весьма специфический способ гемостаза при кровопотерях. Он заключается в восстановлении утраченного объема крови и восстановлении кровяного давления за счет быстрого поступления жидкости из тканей в кровеносное русло. Земноводные имеют небольшой по сравнению с сухопутными животными объем крови. Однако содержание воды в их тканях и органах выше, чем у наземных животных. Лягушка отвечает на кровопотерю таким сильным разбавлением крови за счет межклеточной жидкости, что последняя капля, вытекающая из раны, выглядит бесцветной. Роль тромбоцитов здесь значительна: они компенсируют более низкую активацию каскада свертывания разбавленной крови.

Гемоцитарная формула речных раков (процентное соотношение разных типов гемоцитов), как и лейкоцитарная формула крови рыб является важным показателем, отражающим их гомеостаз и состояние неспецифического иммунитета.

Количество клеточных элементов в составе внутренней среды у раков, рыб и земноводных различно. По нашим данным, меньше всего клеток (гемоцитов) в гемолимфе раков (ОЧГ 500-900 клеток в 1 мкл). У рыб и лягушек общее количество клеток (эритроциты, лейкоциты и тромбоциты) не превышает 3 млн/мкл. В сравнении с млекопитающими это в 2-3 раза меньше. Вероятно, малое количество клеток низших позвоночных компенсируется большей продолжительностью жизни. Так, если продолжительность жизни эритроцитов млекопитающих составляет 100-120 дн., то у рыб эритроциты сохраняют морфологическую целостность и функциональную активность на протяжении более 1 года.

Результаты наших исследований показали, что структура популяции гемоцитов у самцов и самок широко палых речных раков одинакова (табл. 1).

Гранулярные и негранулярные гемоциты в гемолимфе раков обнаруживаются примерно в равных количествах — примерно по 30%. Прозрачные клетки в составе популяции гемоцитов занимают 8-9%. Провести сравнение гемоцитов речных раков и клеток крови позвоночных довольно сложно, так как невозможно сопоставить разные типы клеток: гемоциты и эритроциты, лейкоциты, тромбоциты. Можно сказать лишь, что на долю гранулярных клеток речных раков (полугранулоциты и гранулоциты) приходится больше 50% от всех гемоцитов. Тогда как у карпа и лягушек большую часть составляют агранулоциты — лимфоциты и моноциты (табл. 2).

По уровню лейкопоза различий между карпом и травяными лягушками не обнаружено. Однако лейкопоз интенсивнее протекает у рыб (судя по доле ювенильных

Таблица 1

Состав популяции гемоцитов гемолимфы широкопалых речных раков

Показатели	Самцы	Самки
ОЧГ, в 1 мм ³ гемолимфы	850 ± 111	501 ± 107
<i>Гэмоцитарная формула, %</i>		
Агранулоциты Гц I	31,6 ± 1,9	25,8 ± 2,6
Полугранулоциты Гц II	29,2 ± 3,3	27,5 ± 9,9
Гранулоциты Гц III	30,6 ± 2,9	38,8 ± 7,9
Прозрачные клетки Гц IV	8,7 ± 1,5	8,0 ± 4,9

Таблица 2

Клеточный состав крови некоторых гидробионтов

Показатель	Карп (<i>Cyprinus carpio</i>)		Травяные лягушки (<i>Rana temporaria</i>)	
	самцы	самки	самцы	самки
	а	б	в	г
<i>Эритропозз, %</i>				
Гемоцитобласты, эритробласты	0,5 ± 0,3	1,3 ± 0,3	0,8 ± 0,3	0,4 ± 0,4
Нормобласты	2,3 ± 0,5	3,3 ± 0,6	2,8 ± 0,6	2,4 ± 0,5
<i>Лейкоцитарная формула, %</i>				
Миелобласты	—	0,5 ± 0,3		
Промиелоциты	—	—		
Миелоциты	—	—		
Метамиелоциты	2,5 ± 0,3 ^в	2,5 ± 0,7	0,2 ± 0,3 ^а	—
Палочкоядерные нейтрофилы	2,8 ± 1,1	4,0 ± 0,4	0,2 ± 0,3	0,6 ± 0,4
Сегментоядерные	3,0 ± 1,4 ^в	2,3 ± 1,0 ^г	12,2 ± 0,9 ^{аг}	16,8 ± 1,5 ^{бв}
Всего нейтрофилов	5,8 ± 1,4 ^в	6,3 ± 1,0 ^г	12,4 ± 0,9 ^а	17,4 ± 1,5 ^б
Эозинофилы	0,3 ± 0,3 ^в	0,3 ± 0,3 ^г	3,0 ± 0,7 ^а	3,2 ± 0,9 ^б
Базофилы	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,3	—	0,4 ± 0,4
Моноциты	4,5 ± 0,5	2,8 ± 0,8	2,8 ± 0,5	2,0 ± 0,4
Лимфоциты	86,8 ± 1,7 ^в	88,0 ± 1,5 ^г	81,6 ± 1,0 ^а	77,0 ± 1,7 ^б

Примечание. Здесь и далее:^{аб} и т.д. — различия достоверны.

форм гранулоцитов и палочкоядерных нейтрофилов). Это связано с тем, что у земноводных количество очагов гемопоэза меньше, чем у рыб, и центральным органом кроветворения является красный костный мозг [2].

Лейкограммы карпа и лягушек во многом сходны при общем лимфоцитарном профиле. Однако с высокой степенью достоверности можно утверждать, что доля сегментоядерных нейтрофилов в крови травяных лягушек значительно выше, чем у рыб. Доверительный коэффициент для самцов составил 5,5; для самок — 8,0. Нужно также отметить и гендерные различия: в крови самок травяных лягушек сегментоядерных нейтрофилов достоверно больше, чем у самцов. Однако отмеченные различия обусловлены не систематическим положением, а адаптационными особенностями животных. В пользу данного утверждения свидетельствует тот факт, что доля сегментоядерных нейтрофилов крови самцов лягушек другого вида (шпорцевых) невелика — $2,7 \pm 0,5\%$. Палочкоядерных микрофагов в крови шпорцевых лягушек не обнаружено вообще. У травяных лягушек в мазках крови выявлено также меньшее количество палочкоядерных нейтрофилов по сравнению с карпом.

В крови травяных лягушек достоверно больше эозинофилов по сравнению с кровью карпа. У шпорцевых лягушек отмечена более высокая концентрация эозинофилов — $1,8 \pm 0,4\%$, что достоверно больше, чем концентрация аналогичных клеток в крови у рыб. По всей вероятности, это обусловлено уже видовыми особенностями системы крови.

Биохимический анализ гемолимфы и крови гидробионтов позволяет говорить о наличии гомеостатических особенностей у гидробионтов разных видов. В случае с раками для характеристики внутренней среды более корректно использовать термин гомеокинез, поскольку показатели гомеостаза имеют широкий диапазон колебаний (ошибка средней превышает 10% от среднеарифметической) и их цифровые значения сильно зависят от внешних факторов.

Наши исследования показали (табл. 3), что для раков характерна низкая субстратная обеспеченность анаболических процессов. В гемолимфе раков по сравне-

Т а б л и ц а 3

Цитохимические и биохимические показатели гидробионтов

Показатель	Широкопалые речные раки (<i>Astacus astacus</i>)		Карп (<i>Cyprinus carpio</i> L.) Чувашский чешуйчатый		Травяные лягушки (<i>Rana temporaria</i>)	
	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
	а	б	в	г	д	е
Масса тела, г	29 ± 4^{ад}	26 ± 5^г	2383 ± 98^{ад}	2750 ± 208^{бе}	45 ± 3^{ад}	41 ± 8^г
Бактерицидная активность фагоцитов						
СЦК, ед.	$1,69 \pm 0,13$	$1,78 \pm 0,11$	$1,77 \pm 0,18$	$2,06 \pm 0,98$	$1,78 \pm 0,27$	$1,78 \pm 0,24$
Биохимические константы гомеостаза						
АЛТ, ед./л	81 ± 12^в	102 ± 16^г	40 ± 11^а	41 ± 12^{бе}	164 ± 36^в	174 ± 33^г
АСТ, ед./л	58 ± 7^а	57 ± 9	164 ± 13^а	133 ± 39	88 ± 29	109 ± 36

Показатель	Широкопалые речные раки (<i>Astacus astacus</i>)		Карп (<i>Cyprinus carpio</i> L.) Чувашский чешуйчатый		Травяные лягушки (<i>Rana temporaria</i>)	
	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
	а	б	в	г	д	е
Глюкоза, ммоль/л	2,2 ± 0,6 ^б	0,5 ± 0,2 ^{ар}	3,6 ± 1,3	4,5 ± 1,1 ^б	0,8 ± 0,3	1,4 ± 0,2
Лактатат, мг/дл	63 ± 7	48 ± 7	67 ± 8	69 ± 6	49 ± 2	52 ± 6
ЩФ, ед./л	17 ± 2 ^в	21 ± 2	26 ± 2 ^а	18 ± 1	28 ± 2	69 ± 5
Альбумин, г/дл	4,8 ± 0,5 ^д	4,1 ± 1,3 ^е	11,5 ± 3,4	9,1 ± 1,7	21,4 ± 2,4 ^а	25,0 ± 0,5 ^б
Мочевина, мг/дл	8,7 ± 1,2 ^д	6,9 ± 2,9 ^е	8,2 ± 2,7 ^д	9,6 ± 3,2 ^е	48 ± 3 ^{ав}	56 ± 1 ^{бг}
Общий белок, г/л	18,0 ± 3,0	15,1 ± 2,3 ^{ег}	26,8 ± 6,4	22,3 ± 1,7 ^е	23,8 ± 6,3	34,0 ± 2,6 ^б
Триглицериды, мг/дл	9 ± 1 ^{вд}	25 ± 12	124 ± 42 ^{ад}	105 ± 32 ^е	3 ± 2 ^{ав}	11 ± 6 ^г
Холестерол, мг/дл	11 ± 2 ^в	12 ± 3 ^{ге}	109 ± 12 ^{ад}	118 ± 21 ^б	57 ± 11 ^{ав}	85 ± 19 ^б

нию с кровью карпа и амфибий меньше общего белка, альбуминов, суммарного холестерина.

Карп в условиях нашего опыта выделялся высоким уровнем триглицеридов (в 5-10 раз выше, чем у других гидробионтов), холестерина и высокой активностью аспартатаминотрансферазы крови.

У представителей класса земноводных в сравнении с другими гидробионтами более интенсивно протекал белковый обмен. У них в крови наибольшая среди изучаемых гидробионтов активность аланинаминотрансферазы, повышенное содержание общего белка, альбуминов, конечного продукта азотистого обмена — мочевины. Эту группу животных характеризует относительный нейтрофилез (12% у самцов, 17% у самок) и умеренная эозинофилия (около 3% у самцов и самок).

Заключение

Гидробионты разного систематического положения имеют разные возможности гомеостатирования внутренней среды. По ходу эволюции механизмы поддержания гомеостаза совершенствовались. Для характеристики состояния внутренней среды раков более обоснованно использовать термин «гомеокинез», имея в виду пластичность большинства констант внутренней среды.

Фагоцитарная активность микрофагов, судя по значениям СЦК, находится на одном уровне у всех исследованных гидробионтов. Раки выделяются наличием небольшого количества клеточных структур в составе гемолимфы, однако половина из них принадлежит к популяции гранулоцитов и способна к фагоцитозу. В условиях опыта рыбы и земноводные продемонстрировали различную субстратную за-

висимость метаболизма. Для крови рыб характерен высокий уровень триглицеридов и холестерина, тогда как у земноводных в крови обнаруживается больше белка и катаболитов белкового обмена на фоне высокой активности ферментов переаминирования.

Библиографический список

1. Алякринская ПО. Гемоглобины и гемоцианины беспозвоночных. М.: Наука, 1979. 155 с.
2. Грушко М.П. Клеточный состав кроветворных органов половозрелых самок представителей класса рыб, земноводных и пресмыкающихся // Дисс. д.б.н. Астрахань, 2010. 364 с.
3. Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Эволюция крови. Ростов-на-Дону, 2001. 104 с.
4. Иванов А.А., Корягина Н.Ю., Пронина Г.Л., Ревякин А.О. Физиолого-биохимические адаптации речных раков (*Astacus astacus*) при изменении минерализации водной среды // Известия ТСХА, 2011. Вып. 3. С. 120-128.
5. Иванова Н.Т. Система крови. Ростов-на-Дону, 1995. 155 с.
6. Коржуев П.А. Эволюция. Гравитация. Невесомость. М.: Наука, 1971. 151 с.
7. Купер Э. Сравнительная иммунология (англ.). М., 1980. 500 с.
8. Любин Н.А., Конова Л.Б. Методические рекомендации к определению и выведению гемограммы у сельскохозяйственных и лабораторных животных при патологиях. Ульяновск: ГСХА, 2005. 113 с.
9. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, 1989. 343 с.
10. Немова Н.Н. Механизмы биохимических адаптаций у водных организмов: экологические и эволюционные аспекты // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Том 1. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2010. С. 198-214.
11. Пронина Г.И., Корягина Н.Ю. Некоторые видовые особенности состава форменных элементов крови гидробионтов // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси: Сб. науч. трудов. Минск: БГУ, 2008. Вып. 24. С. 465-470.
12. Стрельцов А.Б. Региональная система биологического мониторинга. Калуга: Издательство Калужского ЦНТИ, 2003. 158 с.
13. Терентьев П.В. Лягушка: Учебное пособие для студентов биологических факультетов университетов. М.: Советская наука, 1950. 345 с.
14. Цукерзис Я. Речные раки. Вильнюс: Издательство «Мокслас», 1989. 143 с.
15. Шубич М.Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // Ж. Цитология. 1974. № 10. С. 1321-1322.
16. Bond J.S., Benvon R.J. The astacin family of metalloendopeptidases // Protein Science, 1995. 4 (7). P. 1247-1261.
17. Frangioni G., Borgioli G. Splenic respiratory compensation and blood volume in the newt // J. Zool. 1993. Vol. 229. N 3. P. 505-514.
18. Kaplow I. S.A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow // Blood., 1955. Vol. 10. P. 1023-1029.
19. Volbeda A., Hoi Wim G.J. Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3,2Å resolution // J. Mol. Biol., 1989. Vol. 209. N 2. P. 249-279.
20. Westman K., Savolainen R, Julkunen M. Replacement of the native crayfish *Astacus astacus* by the introduced species *Pacifastacus leniusculus* in a small, enclosed Finnish lake: a 30-year study // Ecography, 2002. Vol. 25 (1). P. 53-73.

INTERNAL ENVIRONMENT HOMEOSTASIS OF HYDROBIONTS: SPECIFIC PECULIARITIES OF COLD-BLOODED ANIMALS

A.A. IVANOV, G.I. PRONINA, NYU. KORYAGINA, A.O. REVYAKIN

(RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev)

Distinctions of properties of circulating liquids of hydrobionts from different systematic groups are revealed: river crayfish, fishes, and amphibians. Hemolymph was obtained through ventral sinus puncture of crayfish. Fish blood was available from tail vein with the help of surgery syringe. Frogs before heart blood sampling were preliminary anaesthetized. Nonenzymatic cation protein concentration in neutrophil cell lysosomes was run by M.G. Shubich method after author's original adaptation for river crayfish, fishes, and amphibians blood. Authors suggest their own classification of crayfish hemocytes and describe functions of different classes of hemocytes. Authors inform about new class of hemocytes in hemolymph of crayfish which they named as 'transparent cells'. It is shown that for river crayfish the absence of strict indices of homeostasis, low substrate security of anabolic processes and low cell counts in hemolymph is usual. Carp compared to crayfish and amphibians showed higher level of triglycerides, cholesterol and AST activity. Authors pay attention to the dramatic volatility of albumin and glucose concentration in the blood serum of fish and associate this phenomenon with natural inevitable starvation during winter season. Carp blood picture in blood smears is used to describe the hemopoiesis of fish. The presence of young red cells in blood smears such as erythroblasts and normoblasts indicates the elevated level of hemopoiesis. Amphibian's blood analysis showed lymphocyte profile and oval form nucleated erythrocytes as normal picture. As peculiarities of amphibians high tension of nitrogen metabolism (total protein, albumin, urea content, high transaminase activity), comparative neutrophilia and eosinophilia are considered.

Key words: river crayfish, carp, amphibians, blood, homeostasis.

Иванов Алексей Алексеевич — д.б.н., профессор, заведующий кафедрой физиологии, морфологии и биохимии животных РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-39-19; e-mail: ayvanov@timacad.ru).

Пронина Галина Иосефовна — соискатель. E-mail: gidrobiont4@yandex.ru.

Корягина Наталья Юрьевна — аспирант.

Ревякин Артем Олегович — аспирант.