

УДК 639.3 575.224

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ РЫБЫ КАК СЕЛЕКЦИОННЫЙ КРИТЕРИЙ ПРИ РАБОТЕ С КАРПОМ

А.А. ИВАНОВ¹, Г.И. ПРОНИНА¹, А.Б. ПЕТРУШИН²

О Кафедра морфологии и физиологии животных
РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева,² ГНУ ВНИИР)

Для оценки селекционных групп карпа разработали и использовали комплекс гематологических и цитохимических показателей крови, адаптировав методики, принятые в медицине, для анализа крови рыб. Иммунологические тесты, а именно лизосомального катионного белка, индуцированного фагоцитоза, динамики активизации нейтрофилов и хозяйственные признаки (живая масса, жизнеспособность) позволили сформировать в субпопуляциях карпа группы с повышенной неспецифической резистентностью и более высоким потенциалом продуктивности.

Ключевые слова: карп, селекция, неспецифическая резистентность, гемопоэз, биохимия крови, нейтрофилы, катионный белок, индекс активации нейтрофилов.

Иммунология рыб является одной из наименее разработанных областей физиологии рыб. Закономерности функционирования центральных и периферических органов иммунитета рыб не изучены в полной мере. В настоящее время нет общепринятых и доступных приемов оценки иммунологического состояния рыб. Однако опыт, накопленный в медицинской практике, свидетельствует о том, что показатели общей и специфической резистентности могли бы стать инструментом эффективного отбора в селекционной работе с культивируемыми гидробионтами.

Фагоцитоз является важнейшим фактором общего и специфического иммунитета. У рыб все клетки крови (эритроциты, лейкоциты и тромбоциты) обладают способностью к фагоцитозу [4, 14]. Наиболее специализированы в этом отношении полиморфноядерные гранулоциты и особенно их зрелые формы — палочкоядерные нейтрофилы [7]. Процесс фагоцитоза сопровождается образованием активных форм кислорода, идентификация которых является важным звеном в оценке функциональной активности фагоцитов. Ключевым считается супероксидный анион кислорода (O_2^-), с которого берет начало каскад реактивных производных кислорода [8]. Внезапную и быструю метаболическую перестройку нейтрофила принято называть респираторным взрывом.

Радикальное изменение метаболического состояния нейтрофила обуславливается резким увеличением расхода глюкозы в реакциях гексозомонофосфатного шун-

тирования и образованием НАДФ, что предопределяет появление в клетках фагоцитов супероксидного аниона кислорода. При активации нейтрофил способен окислить до 30% глюкозы [7]. Одновременно возрастает потребление кислорода фагоцитами и образование в их цитозоле радикалов с мощным энергетическим потенциалом. В литературе, посвященной защитным функциям нейтрофилов рыб, значимость фагоцитоза в указанных процессах освящена недостаточно, а выводы зачастую имеют противоречивый характер [5, 9, 12].

Использование в практической селекции оценки отбираемых в племенное ядро рыб по малым лимфоцитам, количеству полиморфноядерных и палочкоядерных нейтрофилов оправдано, поскольку теоретически может приводить к созданию популяций с повышенной жизнеспособностью. По литературным сообщениям, такой отбор способствовал повышению жизнеспособности потомков, особенно к третьему поколению. Было установлено, что выживаемость сеголетков возрастает с 50-60% у исходного стада до 81-85% у потомства F3 при отборе производителей по комплексу иммунологических признаков [6].

Целью выполненных исследований был поиск, адаптация и апробация в практической селекционной работе с карпом методов оценки иммунологического состояния рыбы, аналогичных тем, что применяются в медицине и ветеринарии на млекопитающих.

Методика

Исследования проводили на карпах пяти селекционных поколений двух пород: анишском зеркальном и чувашском чешуйчатом. В каждой группе исследовалось не менее 10 особей.

Для характеристики эритропоза и лейкоцитарной формулы крови использовались традиционные методы [2, 3, 12, 13]. Для оценки общерезистентных свойств организма впервые на рыбах применили цитохимические тесты. В медицинских исследованиях в качестве показателя потенциала фагоцитарной активности нейтрофилов на основе катионного белка нейтрофилов рассчитывают средний цитохимический коэффициент (СЦК), косвенно характеризующий активность клеточного иммунитета [11].

Авторы провели адаптацию принятой в медицине методики оценки лизосомального катионного белка нейтрофилов и успешно применили эту методику в своих исследованиях на рыбах. Активация микрофагов оценивалась по тесту НСТ (восстановление нитросинего тетразолия). Принцип метода состоит в том, что образующиеся в активированном нейтрофиле реактивные формы кислорода, обладающие бактерицидным действием, восстанавливают нитросиний тетразолий (желтого цвета) в нерастворимый диформазан, который выпадает в клетках в виде темно-синих гранул и фиксируется исследователем при микроскопировании препарата крови [11]. Состояние нейтрофила без дополнительной стимуляции принято называть «спонтанным НСТ-тестом». Подобно другим цитохимическим индикаторам, спонтанный НСТ-тест отражает степень возбуждения нейтрофилов. Число нейтрофилов, содержащих диформазан и его количество в них, служат мерой количественной оценки образования реактивных метаболитов кислорода фагоцитом. Адгезированные нейтрофилы, продуцирующие реактивные метаболиты кислорода (O_2 , H_2O_2 , OH , $HOCl$), проявляют выраженную токсичность к собственным соматическим и микробным клеткам [1]. У здоровых людей *in vitro* количество нейтрофилов с диформазаном не превышает 10-15% [10]. Увеличение этого показателя сопровождается аутоиммунной реакцией, запускающей каскад перекисного окисления липидов с развитием

ряда патологий. Другой вариант — активизация фагоцитов под влиянием инфекции или воспалительного процесса в организме животного. У рыб продукция активных форм кислорода нейтрофилами не изучена.

В лабораторных условиях имеется возможность оценить количественно интенсивность образования свободных радикалов из числа реактивных метаболитов кислорода по реакции активации нейтрофилов. Динамика активации нейтрофилов (ДАН) позволяет *in vitro* количественно оценить процесс образования реактивных метаболитов кислорода при активации фагоцитоза (индуцированный НСТ-тест). Индуцированный НСТ-тест характеризует функциональный резерв нейтрофилов, вскрывая потенциальную способность отвечать респираторным взрывом. Индуцированный НСТ-тест рассматривается как биохимический критерий готовности нейтрофила к завершённому фагоцитозу т.е. характеризует силу клеточного иммунитета организма.

Результаты исследований

При анализе гематологических показателей особей чешуйчатого карпа, прошедших через отбор по эритропозу (сумма зрелых и полихроматофильных эритроцитов) и показателям лейкоцитарной формулы крови (сумма: малые лимфоциты, полиморфноядерные и палочкоядерные лейкоциты), отмечена стабилизация процессов кроветворения в селекционных популяциях (табл. 1).

Таблица 1

Гематологические показатели чешуйчатого карпа разных поколений селекции

Показатель	F2	F3		F5	
	Двух- годовики	двухгодовики		годовики	двух- годовики
		самки	самцы		
<i>Эритропоз, %</i>					
Сумма бластных форм эритроцитов	1.2±0.45 2,3±0,72	6.4±0.75 7,3± 1,45	6.0±1.15 9,0±4,36	1.0±0.20 0,8±0,24	0.8±0.29 0,5±0,25
Сумма зрелых и полихроматофильных эритроцитов	87.1 ± 1.42 82,0±2,84	73.1±2.08 72,3±2,22	76.0±2.08 67,7±7,88	92.5±2.62 92.1 ±2,14	87.8±2.01 9,07±2,29
<i>Лейкоцитарная формула крови, %</i>					
Палочкоядерные нейтрофилы	—	0.7±0.37 0,4±0,27	0.2±0.07 0,8±0,60	0.4±0.45 1,5±0,47	2.2±0.74 0,2±0,22
Сегментоядерные нейтрофилы	—	1.3±0.62 1,7±0,07	1.5±1.26 2,17±0,44	2.3±0.84 1, 3± 1,08	1.6±0.76 1,2±1,34
Всего нейтрофилов	4.2±0.03 3,5±0,49	2.0±0.65 2,1 ±0,84	1.7±0.65 3,0±1,0	2.7±1.4 2,8±0,68	3.8±0.42 1,4±1,3
Моноциты	5.8±0.77 2,9±0,69	9.8± 1.15 2,5±0,91	8.2±1.73 2,8±0,4	3.1±0.44 2,7±0,60	2.3±0.49 2,6±0,67
<i>Катионный белок</i>					
СЦК	—	—	—	1.62±0.12 1,75±0,17	1.89±0.11 1,91 ±0,05

Примечание. В числителе — чувашские чешуйчатые, в знаменателе — анишские зеркальные карпы.

Анализ данных таблицы 1 свидетельствует, что в пятом поколении как у годовиков, так и у двухгодовиков интенсивность эритропоза находится в границах физиологической нормы для карпа этих возрастных групп. Сумма зрелых и полихроматофильных эритроцитов у них составляет 87,8-92,5% при незначительных межпородных различиях.

Уровень нейтрофилов и моноцитов в мазках крови также свидетельствует о нормальном физиологическом состоянии карпов этого возраста без существенных породных влияний. В наших опытах мы предприняли попытку оценить карпов по цитохимическому коэффициенту. Цитохимическую реакцию проводили по методу Астальди, основанному на выявлении различной степени интенсивности специфической окраски субклеточных структур нейтрофилов. В зависимости от количества образующихся в нейтрофилах гранул исследуемые клетки делили на 4 группы. Группа 0 — с отрицательной реакцией, группа 1 — единичные гранулы; группа 2 — гранулы занимают 1/3 цитоплазмы клетки; группа 3 — гранулы занимают 2/3 и более цитоплазмы клетки. Для количественного выражения результатов просматривают 100 нейтрофилов, дифференцируя их по указанному принципу. Средний цитохимический коэффициент (СЦК) рассчитывали 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.

Исследования показали, что у годовиков СЦК ниже (и, следовательно, фагоцитирующая активность нейтрофилов ниже), чем у двухгодовиков. Результаты наших исследований согласуются с общепринятыми данными о более низкой резистентности карпов на первом году жизни (более высокий отход, чувствительность к неблагоприятным факторам среды) по сравнению с рыбой старших возрастных групп. Наши наблюдения свидетельствуют о том, что рыба с различным чешуйчатым покровом имеет разный уровень иммунной защиты. В частности, у зеркальных карпов способность нейтрофилов к образованию реактивных форм кислорода выше и, следовательно, способность нейтрофилов зеркального карпа к опсонизации патогенных клеток выше, чем у нейтрофилов чешуйчатого карпа. На втором году жизни рыб наблюдается тенденция к увеличению СЦК с 1,7 до 1,9, и между группами различия становятся минимальными. Эти данные согласуются с показателями более медленного роста у чешуйчатых сеголетков (111 г против 220 г) и одинакового прироста массы у двухлетков (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Рост двухлетков карпа

Показатель	Чешуйчатый покров	
	чешуйчатые	зеркальные
Масса, г	767±30	900±23
Относительная скорость роста, %	591	326

Как видно из таблицы 2, живая масса рыбы с зеркальным характером чешуйчатого покрова была достоверно выше: 900 г против 767 г. Различия можно отнести на счет лучшей обеспеченности зеркального карпа пластическим материалом и генетически обусловленной более высокой энергией роста этой популяции рыбы.

Характеризуя эритропоз трехгодовиков, необходимо отметить его активное состояние во всех популяциях. Сумма молодых клеток красной крови у чешуйчатых карпов составляла 13,2%, у зеркальных — 12,7%. Доля зрелых эритроцитов была выше — 86,8 и 87,3% соответственно у чешуйчатого и зеркального карпа. Количество молодых клеток у зеркального карпа меньше за счет гемоцитобластов самой ранней стадии развития эритроцита (табл. 3).

Весной, как правило, в зимовальных прудах снижается количество кислорода в воде. При пониженном содержании кислорода в воде зимовальных прудов у перезимовавших рыб возрастает кислородная емкость крови: из депо выбрасываются эритроциты и усиливается кроветворение. Объем крови увеличивается за счет повышения численности кровяных клеток, продолжительность жизни эритроцитов при этом остается неизменной.

В условиях нашего опыта активизация эритропоза у рыб свидетельствует о наметившемся нарастании весеннего повышения обмена веществ, в т.ч. гормональной активности, и находится в норме для этого периода.

Сезонное симпатоадреналовое напряжение сопровождается изменениями в составе белой крови. Анализ крови показал, что после зимовки у рыб повышен уровень типичных фагоцитов. Причем у чешуйчатых карпов более заметно увеличение доли нейтрофилов (+12,5%). У зеркального карпа зафиксировано почти двукратное увеличение доли моноцитов (3,4 против 1,36%). Повышение количества иммунокомпетентных клеток в крови рыб весной связано с напряженным кислородным режимом, изменением жесткости и степени минерализации воды, активизацией пищевой мотивации. В зимовальных прудах пища отсутствует, плотность посадки рыбы высокая, а при повышении температуры воды и увеличении продолжительности светового дня резко возрастает активность эндокринных структур и активизируется обмен веществ рыбы. На этом фоне карпы разного генотипа активизируют разные физиологические и биохимические адаптационные механизмы.

По нашему мнению, у зеркальных карпов идет более интенсивный расход внутренних резервов. При этом отмечаются деструктивные явления и использование структурных элементов тела (липидов и белков) на обеспечение функциональных потребностей организма рыбы. Например, образование холестерина происходит из резервов печени и как следствие усиливается синтез стероидных гормонов. На этом фоне отмечается более высокая субстратная обеспеченность обменных процессов. Данная теоретическая посылка подкрепляется результатами биохимического анализа крови. У зеркальных карпов в сыворотке крови обнаруживается более высокий уровень холестерина (162,8 против 134 мг/дл) и триглицеридов (162 против 148 мг/дл).

Повышенная активность креатинкиназы, высокий уровень креатина и мочевины свидетельствуют о функционально-деструктивных изменениях в организме рыб на момент взятия у них крови. В частности, распад белков и окисление креатинфосфата вследствие длительного голодания и повышения двигательной активности рыб после зимовки являются причинами этих биохимических изменений крови. Все это происходит на фоне выброса в кровяное русло фагоцитов. Продукты распада структурных элементов тканей фагоцитируются моноцитами и палочкоядерными нейтрофилами [1, 7, 8].

В условиях сезонного напряжения метаболизма у рыб большой интерес для исследователей вызывает состояние иммунитета гидробионтов. Для оценки иммунных адаптационных возможностей рыб авторы применили нетрадиционные для ветеринарной и рыбоводной практики методы и тесты (СЦК, ИАН, ДАН), которые исполь-

**Гематологическая характеристика карпа анишской зеркальной
и чувашской чешуйчатой пород**

Показатель	Трёхгодовики		Четырёхлетки	
	чешуйчатые	зеркальные	чешуйчатые	зеркальные
<i>Эритропоз, %</i>				
Гемоцитобласты, эритробласты	0,6±0,27	0,9±0,27	0, 8± 0,2	0,6±0,3
Нормобласты	2,8±0,42	3,2±0,42	4,8±1,3	4,3±0,7
Базофильные эритроциты	9,8±1,78	8,6±3,07	9,2±1,9	9,0±0,9
Сумма зрелых и полихроматофильных эритроцитов	86,8±2,19	87,3±3,60	85,2±2,7	86,0±0,9
<i>Лейкоцитарная формула крови, %</i>				
Миелоциты	—	0,2±0,21	0, 2± 0,2	0,6±0,5
Метамиелоциты	5,0±0,79	7,4±1,64	2, 0± 0,8	2,0±0,9
Палочкоядерные нейтрофилы	4,4± 1,30	5,2±1,67	1,4±0,6	3,0±1,5
Сегментоядерные	3,6± 1,44	1,8±0,96	3,4±1,2	1,7±1,7
Всего нейтрофилов	8,0±1,06	7,0±1,46	5, 2± 1 1	4,7±0,3
Эозинофилы	0,4±0,27	0,2±0,22	0, 2± 0,2	0,3±0,3
Базофилы	—	0,2±0,22	0, 8± 0,4	0,7±0,3
Моноциты	1,36±1,35	3,4±0,76	5, 2± 0,7	5,0±1,1
Лимфоциты	83,0±1,87	81,6±3,11	86,2±0,8	87±1,2
<i>На 1000 эритроцитов</i>				
Лейкоцитов	82± 10,8	98±11,9	98±8,6	77± 12,0
<i>Функциональная активность нейтрофилов</i>				
СЦК	1,65±0,13	1,69±0,07	1,7±0,11	1,9±0,09
ИАН спонтанный	0,15±0,03	0,17±0,01	0,17±0,02	0,24±0,02
% активности	8,8±1,39	9,0±0,35	8, 6±1 1	11,8±0,9
ИАН индуцированный	0,30±0,041	0,32±0,05	0,40±0,03	0,43±0,02
% активности	15,6±1,04	15,6±2,02	18,4±1,7	19,2±0,9
ДАН	2,3±0,52	1,9±0,25	2, 6± 0,5	1, 8±0,16
Функциональный резерв нейтрофилов, %	15,4±3,33	15,0±4,42	22,8±5,3	18,8±2,9

зуются в медицине. Оценка и отбор рыб по СЦК, ИАН, ДАН позволяют получить племенной материал с высокой неспецифической резистентностью.

Как показали наши исследования, указанные методы вполне приемлемы для использования в рыбоводной практике и селекционной работе с карпом. По нашим данным, ИАН спонтанный у опытной рыбы находился на одном уровне (за исключением зеркальных четырехлеток) и практически не зависел от возраста и генотипа.

Лишь у четырехлеток карпа зеркального показатель выделялся и составлял 0,24 ед. против 0,17 ед. у карпа чешуйчатого того же возраста (см. табл. 3).

При индуцированном фагоцитозе (ИАН индуцированный) процесс активации нейтрофилов у трехгодовиков оценен в 15,6 %. У рыб старшей группы (четырёхлетков) этот индекс повышается до 18,4-19,2%. Показатели функционального резерва нейтрофилов, лизосомального катионного белка подтверждают данные об изменении ИАН так же, как и индекс ДАН.

В целом данные об активности эритропоэза, лейкопоэза и о состоянии иммунокомпетентных клеток крови, СЦК лизосомального катионного белка, активации ИАН и динамике ДАН свидетельствуют, с одной стороны, о высокой активности основных фагоцитов организма рыб — нейтрофилов. С другой стороны, этот комплекс характеристик нейтрофилов в сочетании с клиническими и хозяйственными показателями (живая масса, выход после зимовки, последующая жизнеспособность) свидетельствует о нормальном физиологическом состоянии рыб и их высоком адаптивном потенциале.

Выводы

1. Предлагаемый комплекс иммунологических тестов (СЦК, ИАН, ДАН) в сочетании с гематологическими и биохимическими показателями крови обеспечивает объективную оценку адаптационных возможностей рыбы. Полученные значения иммунологических характеристик на основе изучения свойств нейтрофилов крови можно принять за физиологическую норму для карпа.

2. В селекционной работе с карпом использование гематологических, биохимических (клеточный состав, константы гомеостаза) и иммунологических критериев (СЦК, ИАН и ДАН) отбора рыбы целесообразно как с биологической, так и хозяйственной точек зрения, поскольку позволяет на практике получать популяции рыбы с повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам.

Библиографический список

1. Белоцкий С.М., Авталион Р.Р. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты. М.: БИНОМ, 2008.
2. Вольнкин Ю.Л., Аминова В.А. Динамика показателей красной крови годовиков карпа в период зимовки // Вопросы экологической физиологии рыб, ихтиопатологии. Калининград, 1990. С. 63-83.
3. Головина Н.А., Тромбицкий П.Д. Гематология прудовых рыб. Кишинев: Штиинца, 1989.
4. Иванов А.А., Войнова О.А., Ксенофонтов Д.А. и др. Сравнительная физиология животных. СПб.: Лань, 2010.
5. Иванова З.П. Показатели крови карпа *Cyprinus carpio* L. в онтогенезе и в зависимости от условий выращивания // Вопросы ихтиологии, 1973. Т. 13. Вып. 3 (80). С. 405-407.
6. Маслова Н.П., Петрушин А.Б. Карп чувашской чешуйчатой породы. Породы карпа. М.: ФГНУ, Росинформагротех, 2004. С. 323-342.
7. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука. Сиб. отделение, 1989.
8. Мейер Д., Харви Д. Ветеринарная лабораторная медицина. Интерпретация и диагностика. М.: Софион, 2007.
9. Микряков В.Р., Балабанова Л.В. Клеточные основы иммунитета рыб. Физиология и паразитология пресноводных животных. Л.: Наука, 1979. С. 125-132.
10. Михкеева В.С. Циклазная система и её участие в адаптивных реакциях: сб. Биохимия молоди рыб. Петрозаводск, 1985. С. 92-98.

11. Практикум по иммунологии / Под ред. И.А. Кондратьевой, В.Д. Самуилова. М.: Изд-во МГУ, 2001.

12. Пучков Н.В. Белые кровяные тельца. Руководство по методике исследований физиологии рыб. М.: АН СССР, 1962.

13. Hongda L.U. Classification and morphological observations of hemocytes in *Eriocheir sinensis* by light and electron microcopies // Acta Hydrobiologia sinica, 2002. V. 26. № 5. P. 494-500.

14. Kaplow L. //Blood, 1957. Vol. 10. № 10. P.1023-1029.

Рецензент — д. с.-х. н. Г.И. Блохин

SUMMARY

Complex of both hematological and cytochemical blood indices has been worked out in order to make an evaluation of carp breeding groups, having adapted methods used in medicine to carry out blood tests in fish. Immunological tests notably lysosomal cationic protein, induced phagocytosis and neutrophils activation dynamics, production characteristics (live weight, vitality) allow to form, in carp subpopulations, groups with higher nonspecific resistance and improved productivity index.

Key words, carp, breeding, nonspecific resistance, hemopoiesis, blood biochemistry, neutrophils, cationic protein, test, neutrophils activation index.

Иванов Алексей Алексеевич — д. б. н. Эл. почта: ayvanov@timacad.ru.

Пронина Галина Иозеповна — к. вет. н. Тел. (499) 976-39-19.

Петрушин Александр Борисович — к. с.-х. н. Эл. почта: Gidrobiont4@Yandex.ru.