

УДК: 639.3. 636.082.4

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ КОНСТАНТЫ ГОМЕОСТАЗА В СЕЛЕКЦИОННОЙ РАБОТЕ С КАРПОМ

А.А. ИВАНОВ, Г.И. ПРОНИНА

(Кафедра морфологии и физиологии животных
РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

Изучали состояние иммунитета гидробионтов по гематологическим, биохимическим и цитохимическим показателям с целью определения их референтных значений и последующего практического использования в качестве маркеров иммунной устойчивости в селекции рыбы. Адаптировали применительно к рыбе медицинскую методику оценки лизосомального катионного белка и активации респираторного взрыва нейтрофилов по НСТ-тесту. Установили, что у ангелинских краснухостойчивых карпов фагоцитарная активность нейтрофилов крови при индицировании зимозаном выше, чем у аналогов других пород. Заключили, что ряд констант гомеостаза могут быть использованы в качестве маркеров неспецифической резистентности в процессе селекционной работы с карпом.

Ключевые слова: карп, селекция, клеточный иммунитет, цитохимический коэффициент лизосомального катионного белка, НСТ-тест.

Физиолого-иммунологические исследования при выведении пород имеют существенное значение, особенно в условиях напряженной эпизоотологической ситуации. Разработка системного подхода к оценке иммунофизиологического статуса культивируемых рыб может способствовать повышению эффективности производства и селекции рыбы [3, 17]. Изменения гомеостаза и системы иммунной защиты рыб при воздействии факторов среды и селекционного процесса представляют собой информационный ресурс, который должен использоваться в практической работе с гидробионтами.

Уровень жизнедеятельности и состояние здоровья любого организма при взаимодействии с окружающей средой определяется тем, что существует предел эффективной реактивности организма на факторы окружающей среды различной модальности, сверхпороговые значения которых нарушают гомеостаз [14, 16]. Устойчивость гомеостаза организма по отношению ко внешним стимулам является результатом нейрогуморальной регуляции, эффективность которой может быть оцифрована, т.е. объективно оценена.

Существует точка зрения, что устойчивость к патогенам (восприимчивость ко многим заразным болезням) обусловлена генетически [1, 18]. В каждой породе имеются линии и семейства, обладающие повышенной устойчивостью к контаминации. Рыбы разных пород и линий имеют неодинаковые адаптационные возможности. Так, карпы, различающиеся по гену чешуи, обладают различной иммунофизиоло-

гической реактивностью. Показано, что устойчивость карпов чешуйчатой и разбросанной групп значительно выше, чем голых и линейных [4, 7]. Это подтверждается более высокой скоростью накопления антител, например, после вакцинации убитой формалином культурой *Aeromonas punctata* (штамм С-10) в дозе 2 млрд клеток на 100 г массы тела рыбы.

Имеются сообщения о том, что иммунитет карпов чешуйчатой и разбросанной групп также неодинаков. Отмечено, что уровень агглютининов у карпов с разбросанным покровом чешуи выше, чем у типично чешуйчатых рыб [4].

Целесообразность оценки рыб и проведения селекции по иммунной устойчивости очевидна. Однако этот подход в селекционной работе в рыбоводстве до сегодняшнего времени не находит широкого применения. Основной причиной отказа рыбоводов от селекции гидробионтов по иммунорезистентности является отсутствие унифицированных доступных для практического использования тестов оценки состояния не специфического иммунитета культивируемых объектов. Высказанные соображения послужили поводом для проведения данного исследования на рыбе.

Целью работы явилось изучение физиолого-иммунологического состояния карпов разных селекционных групп по гематологическим и цитохимическим показателям и выявление констант гомеостаза, отражающих состояние неспецифического клеточного иммунитета карпа.

Материал и методы исследований

Объектом исследований являлся доминант отечественного прудового рыбоводства — карп (*Cyprinus carpio* L.). Материалом для аналитических исследований послужили годовики карпа, отобранные в конце зимовки. Для оценки влияния природно-климатических факторов в формировании резистентности использовали рыбу из двух отдаленных географических районов России. В племенном хозяйстве «Кирия» Чувашии (2-я зона рыбоводства) и рыбоводном хозяйстве «Флора» Волгоградской обл. (5-я зона рыбоводства) рыбы отбирались ускоренным методом селекции по показателям крови: активности ферментов крови, количеству нейтрофилов, состоянию эритропоза [9]. Ангелинские карпы (зеркальные и чешуйчатые), прошедшие длительную селекцию на иммунную устойчивость к краснухе в рыбхозе Краснодарского края, были завезены на стадии личинки в п/х «Кирия» весной 2009 г. в количестве 300000 шт.

Основным методом селекции ангелинских карпов являлся отбор на провокационном фоне [6]. Под термином краснуха понимается симптомокомплекс, вызываемый аэромонадами, вирусом весенней виремии и псевдомонадами. На племенном участке, где проводили селекцию, не применяли лечебных препаратов против краснухи и проводили полную выбраковку больных и переболевших рыб. В результате данной многолетней работы удалось значительно повысить резистентность карпа к заболеванию. Количественные характеристики повышенной резистентности ангелинского зеркального карпа были показаны при постановке биопроб с возбудителями заболевания. В каждой группе исследовалось не менее 10 особей.

Для оценки изучаемых групп рыб использовался комплекс гематологических показателей. Исследования крови включали: фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови, оценку интенсивности эритропоза и лейкопоза, дифференцированный подсчет количества окрашенных по Паппенгейму лейкоцитов и расчет лейкоцитарной формулы.

Фагоцитарная активность фагоцитирующих клеток крови оценивалась по среднему цитохимическому коэффициенту содержания лизосомального катионного белка

в нейтрофилах крови (СЦК), который измеряли по Шубину с бромфеноловым синим [8, 10, 11, 13, 15]. Активацию респираторного взрыва нейтрофилов крови оценивали с помощью НСТ-теста с гистохимическим индикатором респираторного взрыва — нитросиним тетразолием [2, 12]. Цифровой материал обрабатывали на компьютере при помощи программного обеспечения MS Excel 2010.

Результаты и их обсуждение

Сравнение годовиков карпа из разных зон рыбоводства (табл. 1) показало, что в р/х «Флора» в Волгоградской обл. рыбы достигли значительно большей массы по сравнению с рыбой, выращенной в Удмуртии. Так, индивидуальная живая масса годовиков зеркального карпа составила 169 г, чешуйчатого карпа несколько меньше — 134 г. Это хороший показатель даже для 5-й зоны рыбоводства с большим вегетационным периодом и более теплым летом. Помимо влияния климатического фактора хорошие результаты выращивания годовиков следует относить и к более качественному кормлению рыбы. Кормление в хозяйстве осуществлялось комбикормом (с применением автокормушки Лавровского), в состав которого входили: пшеница, жмых, кукуруза, нут. А комбикорм для производителей дополнительно обогащали рыбной мукой.

В Чувашии (2-я зона рыбоводства) рыбы получали менее питательный рацион, который включал пшеницу, зерноотходы, семена сорных трав. Кормление осуществлялось менее рациональным способом: 1 раз в день кормовыми дорожками по ложу пруда. Результаты выращивания кроссбредной рыбы в п/х «Кирия» значительно отстают от показателей р/х «Флора». К концу вегетационного периода рыба имела живую массу 50,7 г при длине тела 12-13 см. Лучшие результаты выращивания завезенного в Удмуртию карпа имеют простое объяснение: выход завезенных личинок ангелинского карпа (зеркального и чешуйчатого) был менее 25%, а у рыб кросса «Петровский» — 40% (нормативный показатель).

В результате в выростные пруды был посажен ангелинский карп, прошедший отбор на резистентность. И при меньшей плотности посадки ангелинский карп оказался в более выгодных условиях питания, что в конечном счете и предопределило его высокую живую массу на конец сезона зимовки — 106 г при длине тела 16-17 см. Следует отметить и отсутствие преимуществ какой-либо популяции (зеркальный или чешуйчатый карп) при выращивании в условиях п/х «Кирия» на фоне явного отставания в росте чешуйчатого карпа в условиях Волгоградской обл.

Анализ активности ферментов крови — аланинаминотрансферазы и щелочной фосфатазы — свидетельствует о том, эти ферменты у карпа имеют и генетическую детерминированность и зависимость от факторов среды. Кроме того, для активности АЛТ и ЩФ характерен и большой коэффициент вариабельности внутри выборки. Поэтому эти константы гомеостаза следует относить к категории мягких констант, непригодных для использования в селекционном процессе.

В весенний период у рыб происходит активация процессов эритропоэза, поэтому в периферической крови годовиков карпа всех изучаемых групп имеется значительный процент незрелых эритроцитов. Как следует из таблицы 1, во всех субпопуляциях карпа доля зрелых эритроцитов находилась в пределах 78-84%. Доля гемоглобинов была невелика — около 1%. Из незрелых форм эритроцитов в периферической крови преобладали нормобласты и базофильные эритроциты, на долю которых приходилось 10-20% от общего количества красных клеток.

Как известно, карп обладает лимфоцитарным профилем, т.е. основную массу белых клеток крови составляют лимфоциты [5]. Наши исследования в очередной

Показатели годовиков карпа

Показатель	П/х «Киря»			Р/х «Флора»	
	карп: кросс «Петровский» чешуйчатый	ангелинский карп		карп чешуйчатый	карп рамчатый немецкий
		чешуйчатый	зеркальный		
Масса, г	50,7±6,4	106,4±6,5	106,9±5,6	134,4±9,3	169,3±9,5
Длина тела, см	12,7±0,5	16,1±0,2	16,5±0,4	16,7±0,3	18,0±0,3
<i>Ферменты крови</i>					
АЛТ, Ед/л	38,7±7,9	51,9±2,6	46,9±8,0	39,6±7,1	46,9±8,0
ЩФ, Ед/л	36,7±17,5	12,0±3,8	15,3±3,8	43,1±25,6	82,0±32,1
<i>Лейкоцитарная формула крови, %</i>					
Промиелоциты	0,14±0,15	—	0,21±0,22	—	—
Миелоциты	1,3±0,3	0,4±0,45	0,4±0,44	0,8±0,55	—
Метамиелоциты	2,0±0,62	2,2±1,95	3,2± 1,29	2,2±0,74	1,4±0,67
Нейтрофилы	1,3±0,61	6,0±2,1	5,8± 1,43	7,2±1,92	11,2±1,5
Эозинофилы	0,14±0,15	—	—	—	—
Базофилы	0,43±0,21	—	0,2±0,22	—	—
Моноциты	2,14±0,72	5,8±0,42	3,2±0,65	2,6±0,84	1,8±1,24
Лимфоциты	92,4±1,22	83,6±1,64	85,2±2,95	87,2±2,70	85,6±2,6
<i>Показатели активности эритропоэза, %</i>					
Гемоцитобласты, эритробласты	0,8±0,33	1,2±0,22	1,0±0,35	0,8±0,55	1,2±0,65
Нормобласты	3,6±0,40	2,6±0,27	2,6±0,27	3, 4± 0,91	4,4±0,67
Базофильные эритроциты	11,9± 1,71	6,8±1,2	7,2±0,96	7,8±2,58	16,6±4,04
Сумма зрелых и полихроматофильных эритроцитов	83,8±1,86	89,4±1,6	89,2±1,1	87,8±3,96	77,8±4,79

раз подтвердили этот тезис. У годовиков карпа всех вариантов опыта лимфоциты обнаруживались в количестве 84-92% от общей суммы подсчитанных лейкоцитов. В крови немецких рамчатых карпов было больше бластных форм лейкоцитов по сравнению с другими исследуемыми группами. Характерной для этих рыб оказалась и большая доля зрелых нейтрофилов на фоне отсутствия промиелоцитов и миелоцитов. Кроме того, зрелые нейтрофилы карпа немецкой селекции продемонстрировали и более высокий потенциал фагоцитарной активности микрофагов (по СЦК катионного белка и результатам НСТ-теста). Данный факт объясняется тем, что именно зрелый нейтрофил располагает готовым набором биологически активных веществ и способен формировать внутри себя фагосому. К таким биологически активным веществам относятся неферментные катионные белки, локализующиеся в лизосомах, и обладающие мощным бактерицидным действием. Только в зрелом нейтрофиле при активации респираторного взрыва образуются активные формы кислорода (АФК), наличие которых устанавливают с помощью НСТ-теста. АФК в нормальных условиях обеспечивают разрушение мембраны патогенной бактериальной клетки за счет инициирования реакций каскада перекисного окисления липидов и белков. Поэтому

активацию респираторного взрыва иейтрофила следует рассматривать как проявление повышенной неспецифической клеточной резистентности.

У кроссбредной рыбы п/х «Киря» в лейкоцитарной формуле в небольшом количестве присутствуют эозинофилы и базофилы. Эозинофилы адсорбируют и разрушают многие токсические продукты белковой природы, в т.ч. образующиеся в процессе интенсивного межуточного обмена. Базофилы синтезируют, накапливают в гранулах и выводят гистамин, участвующий в гуморальных механизмах управления и передачи сигналов и гепарин, являющийся антикоагулянтом и регулирующий клеточную пролиферацию. Очевидно, с этими функциями связано появление данных клеток в периферической крови кросса. В крови этих рыб обнаружено максимальное количество лимфоцитов — 92,4%. В периферической крови кросса содержится меньше, чем у других рыб, нейтрофилов, что возможно при повышенном расходовании этих клеток у быстрорастущих гибридов в отсутствие воспалительных процессов. У рыб чистых линий нейтрофилы составляют 5,8-11,2%.

У карпов из пятой рыбоводной зоны больше относительное количество нейтрофилов и меньше моноцитов по сравнению с таковыми из второй зоны. Очевидно, после зимовки у годовиков карпа р/х «Флора», находящихся в более комфортных для них температурных условиях и получавших полноценный комбикорм в достаточном количестве, усилился межуточный обмен, накопились продукты распада. Именно поэтому усилилось образование микрофагов — нейтрофилов. Тогда как во второй зоне рыбоводства у карпов, находившихся при более низких температурах и ушедших в зимовку с недостаточным количеством питательных веществ, вследствие катаболических процессов накопились продукты мышечной дистрофии. И в крови этих рыб увеличился процент моноцитов — основных предшественников тканевых макрофагов — клеток, которые отвечают за процесс утилизации продуктов распада.

Анализ данных таблицы 2 свидетельствует о том, что карп разного генетического происхождения, выращенный в различных климатических и хозяйственных условиях, имеет существенные различия в части иммунологических свойств внутренней среды. У ангелинских карпов наблюдался высокий уровень спонтанного фагоцитоза, что свидетельствует о значительном потенциальном резерве фагоцитирующей активности нейтрофилов их крови.

Однако жизнестойкость целостного организма в большей мере определяется адекватностью реакций на стимулирующие фагоцитоз факторы. При индукции зимозаном достоверных различий фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови у всех изучаемых групп не наблюдалось. В некоторой степени дополнительным подтверждением этого является высокая жизнестойкость хорошо адаптированных к местным условиям чувашской чешуйчатой, анишской зеркальной пород карпа и рыб кросса «Петровский».

О жизнестойкости ангелинских карпов нельзя судить однозначно, так как в этой группе наблюдался повышенный отход рыбы. Причиной гибели явилась 20-часовая перевозка личинок автомобильным транспортом и последовавшая за ней адаптация к условиям 2-й рыбоводной зоны, средняя величина вегетационного периода которой составляет 76-90 дней (количество дней в году с температурой выше 15°) при 136-150-дневном периоде в условиях Краснодарского края (6-я зона рыбоводства).

Средний цитохимический коэффициент (СЦК) содержания лизосомального катионного белка в нейтрофилах крови был одинаковым у рыбы всех обследованных групп, т.е. фагоцитарная готовность нейтрофилов была высока и не зависела от генетики и факторов среды. Известно, что при заболеваниях, связанных с вторжением

Таблица 2

Иммунологические свойства крови карпа

Показатель	П/х «Кирия»			Р/х «Флора»	
	карп: кросс «Петровский» чешуйчатый	ангелинский карп		карп чешуйчатый	карп рамчатый немецкий
		чешуйчатый	зеркальный		
<i>Соотношение иммунокомпетентных клеток</i>					
Лф/М	43,2	14,4	28,9	33,5	47,6
НМ/Лф	0,04	0,14	0,11	0,11	0,15
<i>Фагоцитарная активность</i>					
СЦК	1,85±0,06	1,44±0,08	1,73±0,16	1,77±0,09	1,85±0,03
ИАН спонтанный	0,16±0,02	0,27±0,05	0,22±0,45	0,15±0,03	0,12±0,02
Активность, %	8,5±0,86	13,6±2,80	11,5± 1,11	8,6±1,04	7,2±0,89
ИАН индуцированный	0,40±0,05	0,48±0,06	0,28±0,06	0,26±0,04	0,29±0,02
Активность, %	18,9±2,4	22,2±2,2	15,5±3,1	13,0±1,3	14,6±1,4
ДАН	2,4±0,29	1,89±0,34	1,31 ±0,12	1,77±0,20	2,4±0,27
Функциональный резерв нейтрофилов, %	23,1 ±4,6	21,0±5,3	6,3±2,8	11,0±2,9	16,8±2,0

Примечание. Лф/М — отношение доли общего числа лимфоцитов к числу моноцитов крови; НМ/Лф — отношение доли суммы фагоцитов к общему числу лимфоцитов крови.

чужеродных агентов, показатель СЦК меняется, как правило, в сторону понижения. Следовательно, различия по этому показателю при отсутствии патогенного фактора могут определяться генетическими особенностями животных.

Заключение

Проведенные исследования подтвердили эффективность селекции карпа на основе хозяйственных и физиолого-иммунологических признаков рыбы. Породы карпа, полученные ускоренным методом селекции с отбором по гематологическим и биохимическим показателям, обладают не только высоким потенциалом роста, но и высоким потенциалом неспецифической резистентности. Ангелинские краснухоустойчивые карпы имеют некоторые особенности клеточного иммунитета: при индуцировании зимозаном фагоцитарная активность нейтрофилов их крови выше, чем у одновозрастных рыб других линий и пород. Использование цитохимических показателей иммунитета (содержание в нейтрофилах лизосомального катионного белка, оценка активации респираторного взрыва микрофагов по НСТ-тесту, индуцирование фагоцитарной активности нейтрофилов зимозаном) в комплексе с общеклиническими и биохимическими показателями крови способствует повышению эффективности селекционного процесса и сокращает время, необходимое на получение субпопуляции рыбы с желательными продуктивными признаками.

Библиографический список

1. Бородин П.М. Стресс и генетическая изменчивость // Генетика, 1987. Т. XXIII. № 6. С. 1003-1009.
2. Вккмст М.Е., Маянский А.Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: Методические рекомендации. Казань: Казанский НИИЭМ, 1979.
3. Вихман А.А. Об основных направлениях развития иммунологического исследования рыб: Сб. Труды ВНИИПРХ (Болезни рыб), 1991. Вып. 63. С. 16-22.
4. Вихман А.А., Таразевич Е.В. О сравнительной иммунофизиологической характеристике лахвинского и тремлянского карпов: Сб. Труды ВНИИПРХ, 1992. С. 39-48.

5. Иванов А.А. Физиология рыб. М.: Мир, 2003.
6. Плясов Ю.П. Селекция рыб на повышение устойчивости к заболеваниям: Сб. науч. тр. Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры. Вып.78. М.: Изд-во ВНИРО, 2002. С. 125-134.
7. Лукьяненко В.И. Иммунология рыб: врожденный иммунитет. М.: Агропромиздат, 1989.
8. Мазинг Ю.А., Старосельская И.Я. Оценка надежности лизосомально- катионного теста для лабораторной диагностики // Лабораторное дело, 1981. № 10. С. 582-584.
9. Маслова Н.П., Петрушин А.Б. Методические рекомендации по управлению селекционным процессом в рыбоводстве (на примере карпа). М.: Россельхозакадемия, 2005.
10. Нагоев Б. С. Катионный белок лейкоцитов и его значение: Методические указания. Нальчик, 1982.
11. Пигаревский В.Е., Мазинг Ю.А. К методике применения лизосомально-катионного теста в лабораторной диагностической практике //Лабораторное дело, 1981. № 10. С. 579-582.
12. Практикум по иммунологии / Под ред. И.А. Кондратьевой, В.Д. Самуилова. М.: Изд-во МГУ, 2001.'
13. Пронина Г.И. Использование цитохимических методов для определения фагоцитарной активности клеток крови или гемолимфы разных видов гидробионтов для оценки состояния их здоровья //Известия ОГАУ Оренбург, 2008. С. 160-163.
14. Резников К.М. Структурно-функциональная гетерогенность — основа жизнедеятельности организма. Прикладные информационные аспекты медицины. М.: Медицина, 1998. Т. 1. С. 2-7.
15. Шубич М.Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего //Цитология, 1974. № 10. С. 1321-1322.
16. Campbell J.D. Lifestyle, minerals and health//Med. Hypotheses., 2001. Vol. 57. № 5. P. 521-531.
17. Docan A., Cristea V, Grecu I., Dediu I. Haematological response of the European catfish, *Silurus glanis* reared at different densities in «flow-through» production system // Archiva Zootechnica, 2010. 13:2. P. 63-70.
18. Firth M.A., Sheven P.E., Hodgins D.S. Passive and active components of neonatal innate immune defenses // Anim. Health. Res. Rev., 2005. Vol. 6. № 2. P. 143-158.

Рецензент — д. б. н. Р.Т. Маннапова

SUMMARY

Hydrocoles immunity condition, according to hematologic, biochemical and cytochemical factors, has been studied in order to both determine their reference importance and hereafter to use them as markers of immune resistance in fish breeding. Medical examination methods of both lysosomal, cationic protein and respiratory neutrophils blast activation, according to NST - test, concerning fish, are adapted. Blood neutrophil phagocytal activity in angelin, rubella - resistant carps, when using zimozan is found to be higher than in analogues of other breeds. A number of homeostasis constants is concluded to be used as markers of nonspecific resistance in the process of breeding carp.

Key words: carp, breeding, cellular immunity, cytochemical coefficient of lysosomal, cationic protein, NST-test.

Иванов Алексей Алексеевич — д. б. н., проф. кафедры морфологии и физиологии 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 Иозеповна — к. в. н., соискатель кафедры морфологии и физиологии животных РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 976-39-19; e- mail: gidrobiont4@yandex.ru).