

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 597.554.3.577.17

**ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНОВ КАРПА *CYPRINUS CARPIO*
ПОСЛЕ ТРАНСПОРТИРОВКИ**

© 2008 г. В.Р. Микряков, Н.И. Силкина, Д.В. Микряков

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
Ярославская обл., пос. Борок 152742*

Поступила в редакцию 09.04.2007 г.

Окончательный вариант получен 08.05.2007 г.

Обобщены результаты исследований влияния транспортировки на морфофункциональное состояние печени, почек и селезенки карпа *Cyprinus carpio*. Рыбы на транспортный стресс реагировали изменением соматических индексов иммунокомпетентных органов, активацией перекисного окисления липидов. Показана зависимость исследуемых признаков от особенностей структурно-функциональной организации органов и времени, прошедшего после транспортировки.

ВВЕДЕНИЕ

Как в естественных, так и в искусственных условиях обитания рыбы неоднократно подвергаются воздействию различных по природе и происхождению стрессирующих факторов: физических, химических, биологических, паразитарных, нерестовых, транспортных, технологических (при индустриальных способах выращивания), техногенных и т.д. (Лукияненко, 1983; Кашулин и др., 1999; Pickering, 1981).

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, 1975), дисбалансу водно-солевого обмена (Мартемьянов, 1983), снижению иммунитета к паразитам, вызывающим инфекционные и инвазионные болезни (Ведемейер и др., 1981; Бауэр и др., 1984; Scharerclaus, 1979).

В ряде работ было показано негативное воздействие перевозки на физиолого-биохимическое состояние рыб. Однако в литературе практически отсутствуют данные о характере изменения морфофизиологического состояния иммунокомпетентных органов при транспортном стрессе. Между тем известно, что у стрессированных рыб, подвергнутых воздействию неблагоприятных факторов, наблюдается снижение соматических индексов и изменения структурно-функциональных характеристик органов иммунитета – почек, печени и селезенки (Степанова и др., 1998; Кашулин и др., 1999; Микряков и др., 2001; Балабанова и др., 2003).

Изучение этого вопроса представляется весьма важным для выяснения механизма повреждающего транспортного воздействия в иммунокомпетентных органах рыб. Это важно также при мониторинге условий среды обитания рыб, анализе темпов роста и развития и при разработке профилактических и оздоровительных мероприятий по борьбе с последствиями влияния стресс-факторов на иммунный статус и состояние здоровья рыб.

Целью работы было определение характера влияния транспортного стресса на морфофизиологическое состояние различных по структурно-функциональной организации иммунокомпетентных органов (почек, селезенки и печени) карпа *Cyprinus carpio*, выполняющих разнообразные иммунологические функции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Влияние транспортировки изучали на 60 двухлетках карпа *Cyprinus carpio* средней массой 200-250 г. Рыб перевозили в пластиковых ваннах (объемом 1 м³) 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 проводили через 1, 3, 7, 14 и 21 сут. с момента начала перевозки рыб.

Исследованных особей карпов подвергали полному биологическому анализу. Морфофункциональное состояние иммунокомпетентных органов оценивали по соматическим индексам почек, селезенки и печени, по интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и общей (интегральной) антиокислительной активности (ОАА).

Индекс рассчитывали по процентному отношению исследуемого органа к массе рыбы по формуле: $X = A/B \times 100$, где X – индекс органа, %; A – масса органа, г; B – масса рыбы, г.

Перекисное окисление липидов изучали в гомогенатах тканей печени, туловищных почек и селезенки. Липиды из тканей экстрагировали общепринятым методом по Фолчу (Folch et al., 1957). Об интенсивности ПОЛ в тканях судили по накоплению малонового диальдегида (МДА) – одного из конечных продуктов перекисного окисления. Концентрацию МДА определяли на основе учета количества продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой и дающих с ней окрашенный комплекс. Интенсивность окрашивания оценивали спектрофотометрически по изменению максимума поглощения при 532 нм (Андреева и др., 1988). Содержание МДА вычисляли с учетом коэффициента молярной экстинкции МДА ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) и выражали в нмолях на 1 г ткани. Исходно в животных тканях содержание малонового диальдегида крайне незначительно, и 98% его образуется в процессе взаимодействия тиобарбитуровой кислоты при разрушении гидроперекисей

липидов. Содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, вычисляли по формуле: $X = E \times 85,47$, где X – содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, выраженное в количестве малонового диальдегида (мкмоль/л); E – оптическая плотность при 535 нм.

Об общей (интегральной) антиокислительной активности судили по кинетике окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха в присутствии тканевых экстрактов по общепринятой методике, описанной Семеновым и Ярошем (1985). Гомогенат получали путем растирания тканей иммунокомпетентных органов с физиологическим раствором в соотношении 1 : 1. Константу ингибирования окисления субстрата, являющуюся показателем антиокислительной активности органа, определяли относительно контроля по формуле: $K_i = K_{\text{кон}} - K_{\text{оп}} / C$, где: $K_{\text{кон}}$ и $K_{\text{оп}}$ – константы скоростей окисления субстрата соответственно в контроле и в опыте, C – концентрация биологического материала в кювете.

В качестве контроля использовали исследуемые показатели 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

Анализ полученных результатов показал, что карпы на транспортный стресс реагировали изменением исследованных параметров (табл. 1, 2). Соматические индексы почек, селезенки и печени под влиянием транспортировки отличались размахом и амплитудой изменчивости (табл. 1). Динамика изменений количественных показателей соматических индексов у разных исследованных органов имела разное направление. Установленные особенности изменений относительной массы почек, селезенки и печени карпа отражают различия их структурно-функциональной организации и содержание в тканях исследованных органов гормончувствительных клеток, ответственных за поддержание иммунного гомеостаза (Микряков и др., 2006).

Соматические индексы почек, основная масса которых состоит из лимфомиелоидной ткани, выполняющей иммунологические и гемопозитические функции у рыб (Иванова, 1983; Микряков, 1991; Галактионов, 1995; Кондратьева и др., 2001; Микряков и др., 2001; Zapata et al., 1996), в первую неделю после транспортировки изменялись в сторону снижения (от $0,73 \pm 0,03$ до $0,59 \pm 0,07$), тогда как в последующие сроки наблюдения – повышения (до $0,84 \pm 0,06$) (табл. 1).

Таблица 1. Индекс иммунокомпетентных органов карпа после транспортировки, (%).
Table 1. Index immunocompetent organs of a common carp after transportation, %.

Сроки отбора проб	Иммунокомпетентные органы		
	Почки	Селезенка	Печень
Контроль	0,73±0,03	0,22±0,05	2,90±0,12
Через 1 сутки	0,73±0,04*	0,29±0,01	2,88±0,37
Через 3 суток	0,61±0,01*	0,38±0,03*	2,18±0,24
Через 7 суток	0,59±0,07	0,35±0,03	1,50±0,12
Через 14 суток	0,83±0,03*	0,39±0,06	1,38±0,18
Через 21 сутки	0,84±0,06*	0,54±0,02*	1,58±0,07

Примечание: здесь и в таблице 2: * – различия достоверны при $p \geq 0,05$.

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

Таблица 2. Содержание малонового диальдегида (МДА) и общей антиокислительной активности (ОАА) в иммунокомпетентных органах карпа *Cyprinus carpio* L. после транспортировки.

Table 2. Concentrations of malonic dialdehyde (MDA) and total antioxidant activity (TOA) in common carp immunocompetent organs after transportation, %.

Сроки отбора проб, сут. после транспортировки	почки	
	МДА, нм/г	ОАА, л x моль ⁻¹ x мин ⁻¹
Перед началом опыта	19,50±0,24	39,0
1	19,80±0,22	39,0
3	16,16±0,28	38,8
7	18,38±0,60	39,3
14	19,02±0,30	34,3*
21	18,94±0,15	32,1*
	печень	
Перед началом опыта	11,0±0,40	33,4
1	11,5±0,44	34,3
3	10,82±0,20	32,2*
7	11,06±0,33	33,9
14	11,48±0,39	34,8*
21	11,5±0,25	32,8
	селезенка	
Перед началом опыта	5,39±0,22	18,5
1	6,02±0,04*	17,2
3	6,00±0,04*	16,2*
7	6,04±0,01*	16,4*
14	6,02±0,04*	16,3*
21	6,04±0,02*	16,1*

Направление изменения соматических индексов селезенки, отличалось от таковых почек и печени. Основная масса селезенки рыб состоит из красной пульпы, а имеющаяся белая пульпа, выполняющая функцию лимфопоэза, недостаточно развита и расположена в виде отдельных диффузных скоплений (Заботкина, Микряков, 1996; Микряков и др., 2001; Zapata et al., 1996). Селезенка в ответ на транспортировку, в отличие от других органов, реагировала увеличением своей

относительной массы. Известно, что селезенка по особенностям структурной организации и характеру выполняемой функции напоминает костный мозг высших позвоночных. Согласно современным представлениям, основной функцией данного органа является эритро- и тромбопоэз, затем – лимфопоэз, тогда как почек – лимфо- и миелопоэз (Иванова, 1983; Заботкина, Микряков, 1996; Кондратьева и др., 2001; Микряков и др., 2001; Zapata et al., 1996). Независимо от срока взятия пробы относительная масса селезенки у опытных рыб была выше, по сравнению с контролем. В конце срока наблюдения спленосоматический индекс карпов, после транспортировки превышал значение контрольных рыб более чем в 2 раза.

Результаты анализа динамики изменения гепатосоматических индексов карпа не позволили установить существенных различий между данными опытных и контрольных рыб. Количественные характеристики индексов печени, основными функциями которой считаются: детоксикация, нейтрализация, разрушение чужеродных тел, элиминация их из организма и синтез острофазного белка – С-реактивного белка (Микряков, 1991; Микряков и др., 2001), после транспортировки, постепенно падали.

Исследуемые органы на воздействие транспортногo стресса отвечали не только характером изменения их относительной массы, но и интенсивностью происходящих в них процессов перекисного окисления липидов и общей антиокислительной активностью (табл. 2). У рыб после транспортировки уровень содержания конечных продуктов перекисления липидов в тканях почек снижался, а в селезенке повышался по сравнению с данными, полученными до начала перевозки (табл. 2). В печени показатели МДА практически не отличались от контроля (табл. 2). Установленные закономерности накопления МДА в исследуемых органах и обнаруженные различия по содержанию продуктов ПОЛ свидетельствуют о разном уровне содержания структур, индуцирующих свободнорадикальные процессы и ПОЛ.

Изменение перекисеобразовательных процессов в иммунокомпетентных органах у опытных рыб, характеризующее нарушение окислительно-восстановительного баланса, отражалось на показателях ОАА (табл. 2). В исследованных органах показатели ОАА, показывающие содержание антиоксидантов, изменялись по-разному. В почках и селезенке опытных рыб содержание антиоксидантов снижалось по сравнению с контролем. Достоверные различия показателей ОАА у рыб после транспортировки зафиксированы в селезенке начиная с 3 сут., а в почках – с 14 сут. наблюдения. В печени исследуемый показатель достоверно снижался на 3 сут. и увеличивался через две недели после транспортировки.

Снижение интегрального показателя антиокислительной активности у опытных рыб свидетельствует об адаптивном увеличении содержания веществ,

обладающих свойствами антиоксидантов, в тканях и организме рыб в целом и о протекании в организме стрессированных карпов процессов восстановления нарушенного равновесия в системе перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита, возникшего при транспортировке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из материалов исследований следует, что транспортировка в организме рыб вызывает изменение соматических индексов иммунокомпетентных органов и процессов перекисного окисления липидов. Иммунокомпетентные ткани и органы на транспортировку реагируют инволюцией, изменением содержания антиоксидантов и накоплением продуктов перекисного окисления липидов, что является причиной нарушения иммунного гомеостаза и снижения адаптивных функций к патогенным организмам.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Андреева А.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. 1988. №11. С. 41-43.

Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Микряков В.Р. Влияние карбофоса и иммунизации бактериальным антигеном на некоторые показатели иммунной системы карпа *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) // Вопросы ихтиологии. 2003. Т. 43. №2. С. 262-271.

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.

Заботкина Е.А., Микряков В.Р. Влияние карбофоса на иммунокомпетентные клетки и структуру селезенки карпа // Цитология. 1996. Т. 38. №4-5. С. 551-554.

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

Кашулин Н.А., Лукин А.А., Амундсен П.-А. Рыбы пресных вод субарктики как биоиндикаторы техногенного загрязнения. Апатиты: КНЦ РАН, 1999. 142 с.

Кондратьева И.А., Киташова А.А., Ланге М.А. Современные представления об иммунной системе рыб // Вестн. Моск. ун-та. Биол. 2001. №4. С. 11-20.

Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 320 с.

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: ИБВВ РАН, 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 В.Р., Силкина Н.И., Микряков Д.В. Влияние дексаметазон-фосфата на морфо-функциональное состояние иммунокомпетентных органов карпа *Cyprinus carpio* L. // Вест. Южного науч. центра РАН. 2006. Т. 2. Вып. 1. С. 72-77.

Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Укр. биохим. журн. 1985. Т. 57. №3. С. 50-52.

Степанова В.М., Павлов Д.Ф., Чуйко Г.М. Хроническое действие кадмия на клетки ретикуло-лимфоидной ткани селезенки и периферической крови мозамбикской тилляпии (*Oreochromis mossambicus* Peters) // Биол. внутр. вод. 1998. №3. С. 68-75.

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.

Folch J., Lees M., Stanley G.N. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. №3. Pp. 497-509.

Pickering A.D. Introduction: the concept of biological stress // Stress and Fish. A.D. Pickering (ed.). London-N.Y.: Acad. Press. 1981. Pp. 1-9.

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

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.

Zapata A.G., Chiba A., Varas A. Cells and tissues of the immune system of fish. London: Acad. Press. 1996. Pp. 1-62.

CHANGE MORPHOPHIZIOLOGICAL PARAMETERS IMMUNOCOMPETENT ORGANS OF CARP *CYPRINUS CARPIO* AFTER TRANSPORTATION

© 2008 y. V.R. Mikrjakov, N.I. Silkina, D.V. Mikrjakov

Papanin's Institute for biology of inland waters of the

Russian Academy of Science, Borok

Results of researches of influence of transportation on morphological and functional condition of a liver, kidneys and spleens of carp *Cyprinus carpio* are generalized. Fishes reacted to transport stress change of somatic indexes immunocompetent organs, activation of lipid peroxidations. Dependence of investigated attributes on features of the structurally functional organization of organs and time which has been last after transportation is shown.