РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

Сравнительная характеристика альтернативных биомоделей по гематологическим и биохимическим показателям

Н. Ю. Корягина[1], Г. И. Пронина[1], А. О. Ревякин[2]

[1] НИИ ирригационного рыбоводства Россельхозакадемии, Московская обл.
[2] Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская обл.

Контактная информация: Gidrobiont4@yandex.ru; scbmt@yandex.ru

Физиологическое состояние речных раков во многом определяется показателями метаболизма, в частности показателями гемолимфы. Клетки гемолимфы – гемоциты (все типы) участвуют в иммунной защите речных раков. Альбумины гемолимфы широкопалого рака (*Astacus astacus*) обоих полов составляют около 27% от общего белка. Отмечены видовые и половые различия свойств гемолимфы речных раков. Показатель активной реакции (pH) у широкопалого рака ниже, чем у длиннопалого (*Pontastacus leptodactylus*). Уровень глюкозы у самцов широкопалого рака выше, чем у самок того же вида и самцов длиннопалого. Щелочная фосфатаза активнее в гемолимфе *Pontastacus leptodactylus*, чем *Astacus astacus.* С большой степенью достоверности можно говорить о корреляции между содержанием альбуминов в гемолимфе *Astacus astacus* (как самцов, так и самок) и процентным содержанием полугранулоцитов; в отношении гранулоцитов прослеживается обратная корреляция.

Ключевые слова: биомодели, биомоделирование, раки, гемолимфа.

Перспективным направлением биомоделирования является использование беспозвоночных животных, которые обладают сопоставимостью физиологической реакции с высшими животными, а также специфическими свойствами, позволяющими расширить представления о спектре действия тестируемого фактора на биосистему. Кроме того, они удовлетворяют современным этическим представлениям и нормам, ограничивающим область применения высших животных в фармакологических и других экспериментальных исследованиях.

В качестве объекта нами были выбраны пресноводные речные раки, так как они являются наиболее доступными и характеризуются некоторыми особыми свойствами, расширяющими их применение. В частности, раки обладают высокой регенеративной способностью. Данное свойство позволяет применять их при биотестировании различных факторов на морфогенез, пролиферацию и дифференцировку клеток различных тканей. Помимо этого, речные раки являются тест-объектами экологического мониторинга.

Гематологические и биохимические показатели гемолимфы речных раков отражают их физиологическое состоя-

ние. Кровеносная система речных раков родов *Astacus* и *Pontastacus* (*Decapoda: Crustacea*) незамкнутая. Дыхательный белковый пигмент гемолимфы речных раков – гемоцианин содержит в своем составе два атома меди, и свойства гемоциана различаются у водных и полуводных ракообразных [14]. Эволюционные последствия выхода на сушу сопровождается уменьшением Боровского эффекта и сродства гемоцианина к кислороду.

Клеточная часть циркулирующей гемолимфы представлена гемоцитами. Большинство исследователей выделяют 3 типа гемоцитов речных раков: агранулоциты, полугранулоциты, гранулоциты [5, 15]. Все эти клетки дифференцированы. Мы, придерживаясь данной классификации, выделяем незрелые прозрачные клетки, которые, вероятно, являются предшественниками клеток гемолимфы [6]. В полугранулоцитах и гранулоцитах содержится профенолоксидазная система, выполняющая функцию иммунной защиты организма. Под воздействием чужеродных агентов (например, ß 1,3-глюканов грибковых или LPS – липополисахаридов бактериальных клеток) она выделяется из клеток в гемолимфу, активизируя каскад ферментов, в результате профенолоксидаза (*prophenoloxidase*) превращается в активный фермент фенолоксидазу (*phenoloxidase*). Полугранулоциты и агранулоциты являются фагоцитами [13].

Гемоцитарная формула (процентное соотношение разных типов гемоцитов), которая может изменяться не только при патологии, является важным показателем, отражающим состояние речных раков. Отмечено, что у взрослых раков (3–4-леток) *Pontastacus leptodactylus* процентное содержание гранулоцитов выше, чем у годовиков [6].

Изучению гемолимфы речных раков посвящено не много работ. В основном, они направлены на определение влияния экологических факторов среды. Например, выяснено, что перепады температуры и солености вызывают изменения осмотической резистентности гемолимфы белого речного и красного болотного раков (*Procambarus clarkii, P. zonangulus*) [11].

Отмечено, что воздействие на речных раков *Astacus astacus* в межлиночный период мягкой воды с повышенной кислотностью (pH 4) в присутствии алюминия – 25 μмоль/л и Ca^{++} 100 μмоль/л вызывает постепенное развитие серьезного метаболического ацидоза. Прямым ответом организма речного рака на данное изменение среды является усиленная вентиляция (гипервентиляция), что в значительной степени компенсирует ацидоз. При этом Боровский эффект гемоцианина *Astacus astacus* слабо выражен. Возникающее повышение постжаберного парциального давления углекислого газа (PCO_2) имеет минимальное влияние на транспорт кислорода гемолимфой, концентрация гемоцианина не изменяется от кислотно-алюминиевого воздействия, не развивается внутренняя гипоксия. На основании этого сделано предположение, что покрытые хитиновым панцирем жабры речного рака в отличие от жабр рыб намного менее чувствительны к кислотному и кислотно-алюминиевому воздействию [12].

Материалы и методы

В нашем эксперименте исследовались половозрелые речные раки: широкопалый (*Astacus astacus*) и длиннопалый (*Pontastacus leptodactylus*), которые содержались в аквариумах в течение месяца. В лабораторию для исследования они транспортировались в обсушенном виде

Таблица 1

Размерно-весовые, гематологические и биохимические показатели половозрелых речных раков *Astacus astacus* и *Pontastacus leptodactylus* и их сравнительная оценка

Показатель	*Àstacus astacus*		P – достоверность	*Pontastacus leptodactylus* (M±m)	P – достоверность
	♂	♀			
Вес, г	**29,0±3,96**	25,7±5,03	> 0,05	**64,5±6,95**	**< 0,05**
Длина тела, мм	**93,6±3,96**	96,3±5,32	> 0,05	**133,0±5,30**	**< 0,05**
ОЧГ в 1 мм³	384±111,6	544±56,0	> 0,05		
Время свертывания, сек.	2,4±0,27	2,8±0,55	> 0,05	3,4±0,53	> 0,05
Глюкоза, ммоль/л	**2,16±0,615**	**0,50±0,240**	**< 0,05**	**< 0,55**	**< 0,05**
Лактат, мг/дл	62,7±6,89	48,4±6,49	> 0,05	–	–
Альбумин, г/л	47,8±4,62	41,0±12,73	> 0,05	–	–
Мочевина, мг/дл, ммоль/л	8,66±1,198 1,44±0,20	6,90±2,860 1,15±0,48	> 0,05	–	–
Общ. белок, г/л	180±30,1	151±22,8	> 0,05	–	–
Триглицериды, мг/дл	9,4±1,44	24,5±11,80	> 0,05	–	–
Холестерин, мг/дл	11,3±1,76	11,7±2,91	> 0,05	–	–
АЛТ (U/L) при 37°C	80,6±11,67	102,3±15,89	> 0,05	55,1±17,75	> 0,05
АСТ (U/L) при 37°C	57,7±7,30	57,2±8,68	> 0,05	55,3±33,45	> 0,05
ЩФ (U/L) при 37°C	**17,1±2,09**	20,9±2,26	> 0,05	**78,0±20,21**	**< 0,05**
Гемоцитарная формула, %					
Агранулоциты	40,0±3,98	29,0±10,98	> 0,05	34,9±4,88	> 0,05
Полугранулоциты	24,2±5,72	34,3±4,82	> 0,05	29,7±3,43	> 0,05
Гранулоциты	27,8±2,82	29,8±7,92	> 0,05	32,1±2,35	> 0,05
Прозрачные клетки	8,0±1,90	4,5±1,67	> 0,05	3,4±1,58	> 0,05

*П*римечание: для перевода единиц в ммоль/л используется повышающий коэффициент 0,1665.

в течение 4 часов при температуре 21°C. Гемолимфу отбирали из вентрального синуса речных раков при сохранении их жизни и здоровья, с соблюдением правил асептики. Общее число гемоцитов (далее ОЧГ) определяли в камере Горяева по общепринятой методике, гемоцитарную формулу подсчитывали дифференциальным методом. Биохимические показатели определяли с помощью прибора: Chem Well + (перед исследованием гемолимфу центрифугировали при 4000 об/мин и температуре +6°C в течение 5 мин.) и Reflotron (без предварительной обработки гемолимфы). Время свертывания гемолимфы измеряли по Моравицу в модификации Тодорова. У речных раков агглютинации гемолимфы не происходит и фибриновая нить не образуется. Поэтому время свертывания фиксировали в самом начале коагуляции – образования желеобразного сгустка.

Статистическую обработку полученных результатов (малая выборка: от 4 до

Таблица 2

Биохимические показатели крови разных видов лабораторных животных [4]

Показатель	Самцы	Самки	P**
Белые крысы			
АЛТ, (U/L)	78,6±9,1	54,1±11,7	>0,05
АСТ, (U/L)	168,9±27,5	103,1±9,5	<0,05
ЩФ, (U/L)	61,5±29,0	254,1±30,3	<0,05
Белок, г/л	81,3±2,8	49,6±1,2	<0,001
Альбумин, г/л	40,6±1,1	46,4±1,2	<0,05
Мочевина, ммоль/л	5,1±0,6	5,0±0,3	>0,05
Глюкоза, ммоль/л	7,2±0,3	7,4±0,3	>0,05
Морские свинки			
АЛТ, (U/L)	63,8±3,9	78,1±13,8	>0,05
АСТ, (U/L)	109,6±14,8	102,7±18,9	>0,05
ЩФ, (U/L)	175,0±25,0	140,0±11,0	>0,05
Белок, г/л	40,9±2,3	42,1±2,6	>0,05
Мочевина, ммоль/л	9,0±0,9	8,8±0,4	>0,05
Глюкоза, ммоль/л	7,2±0,4	6,8±0,3	>0,05
Кролики			
АЛТ, (U/L)	77,1±13,5	104,4±44.3	>0,05
АСТ, (U/L)	72,8±26,4	52,3±9,0	>0,05
ЩФ, (U/L)	224,6±29,4	227,0±75,5	>0,05
Белок, г/л	79,1±4,0	76,6±4,2	>0,05
Альбумин, г/л	52,3±0,3	43,4±0,5	>0,001
Мочевина, ммоль/л	5,8±0,3	5,8±0,5	>0,05
Глюкоза, ммоль/л	8,4±0,4	9,0±0,4	>0,05

10 особей в каждой группе) проводили методом вариационной статистики по Стьюденту. Достоверными считались различия показателей при p <0,05.

Результаты и обсуждение

Сравнительные характеристики половозрелых (3–4 года) самцов и самок вида *Astacus astacus* и самцов *Pontastacus leptodactylus* представлены в табл. 1. Достоверных отличий самцов и самок одного вида – *Astacus astacus* по размеру, весу, а также по гематологическим и биохимическим показателям не отмечено, за исключением содержания глюкозы в гемолимфе, которое было значительно выше у самцов по сравнению с самками. Вероятно, это связано с активным расходованием глюкозы самками в фазе репродуктивной активности. В гемолимфе *Astacus astacus* (как у самцов, так и у самок) альбумины составляют около 27% от общего белка. То есть примерно 73% приходится на глобулиновые фракции.

В силу видовых особенностей *Pontastacus leptodactylus* значительно крупнее, pH гемолимфы и активность щелочной фосфатазы у них выше, а содержание глюкозы меньше, чем у *Astacus astacus*. По активности аспартатаминотрансферазы (далее АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ), времени свертываемости гемолимфы, а также по гемоцитарной формуле достоверных отличий между этими двумя видами не наблюдалось.

Сравнительный анализ биохимических показателей разных биомоделей показал, что уровень глюкозы в гемолимфе речных раков значительно ниже, чем в сыворотке крови млекопитающих (табл. 2), а у речных раков *Pontastacus leptodactylus* меньше чувствительности прибора. То же можно сказать и о содержании мочевины. Однако уровень белка и альбуминов в гемолимфе речных раков значительно выше, чем в сыворотке крови данных грызунов. Ак-

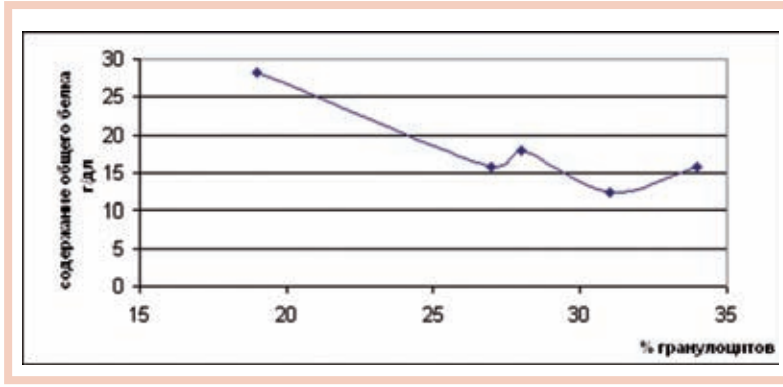


Рис. 1. Зависимость процентного содержания гранулоцитов от общего белка у самцов речных раков *Astacus astacus*. Показана обратная корреляция между содержанием общего белка и относительным количеством гранулоцитов гемолимфы самцов *Astacus astacus*

тивность трансфераз очень лабильный показатель, который может значительно меняться под воздействием факторов среды. Тем не менее, данный показатель незначительно отличался у всех изучаемых биомоделей разных систематических групп. У речных раков активность щелочной фосфатазы была небольшой по сравнению с млекопитающими биомоделями, при этом наблюдалась значительная вариабельность показателя. Данное различие можно объяснить различиями метаболизма. Во-первых, раки пойкилотермные животные, и обменные процессы идут у них медленнее. Во-вторых, у речных раков экзоскелет, в отличие от эндоскелета позвоночных, поэтому щелочная фосфатаза в значительной степени содержится в их покровных тканях, нежели в гемолимфе.

Корреляция биохимических показателей гемолимфы *Astacus astacus* с процентным содержанием разных типов гемоцитов представлена в табл. 3.

Анализируя полученные результаты, можно говорить о достоверной прямой корреляции между содержанием альбуминов в гемолимфе *Astacus astacus* (как самцов, так и самок) и процентным содержанием полугранулоцитов; в отношении гранулоцитов прослеживается также достоверная, но обратная корреляция (табл. 3). Прослеживается обратная зависимость содержания общего белка с гранулоцитами (рис. 1) и прозрачными клетками, а у самок – и с полугранулоцитами. У самцов полугранулоциты связаны с общим белком прямой зависимостью (рис. 2). Графики наглядно демонстрируют прямую и обратную зависимости исследуемых показателей. В отношении аланинаминотрансферазы (далее АЛТ) достоверная корреляция наблюдается только у самцов: прямая – по отношению к полугранулоцитам, обратная – к агранулоцитам. У самцов отмечается достоверная обратная корреляция агранулоцитов с содержанием глюкозы.

У самок *Astacus astacus* наблюдается достоверная корреляция активности щелочной фосфатазы (далее ЩФ): прямая – с процентным содержанием гранулоцитов; обратная – с содержанием агранулоцитов и полугранулоцитов (у самцов не прослеживается корреляция).

Выводы

Таким образом, характеристика гемолимфы пресноводных речных раков по-

Таблица 3

Коэффициенты корреляции (r) некоторых биохимических показателей и процентным содержанием разных типов гемоцитов *Astacus astacus*

Показатели обмена	Гемоцитарная формула, %							
	Агранулоциты		Полугранулоциты		Гранулоциты		Прозрачные клетки	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
ЩФ	−0,27	**−0,89**	−0,04	**−0,85**	+0,04	**+0,95**	**+0,61**	+0,15
АЛТ	**−0,94**	+0,07	**+0,71**	+0,07	−0,27	+0,04	+0,25	+0,15
АСТ	**-0,66**	+0,01	-0,02	**-0,73**	0,47	-0,07	**+0,76**	**+0,88**
Альбумины	−0,38	**+0,78**	**+0,64**	**+0,75**	**−0,59**	**−0,81**	−0,22	+0,33
Общий белок	-0,27	**+0,81**	**+0,79**	**-0,76**	**-0,88**	**-0,71**	**-0,51**	**-0,70**
Лактат	-0,22	**+0,70**	**+0,77**	**-0,82**	**-0,89**	**-0,75**	**-0,52**	+0,45
Глюкоза	**-0,91**	**-0,03**	**+0,59**	**-0,97**	**+0,08**	+0,19	**+0,59**	+0,19
Холестерин	-0,33	**+0,68**	**+0,79**	**-0,75**	**-0,77**	**-0,74**	**+0,61**	+0,49
Мочевина	**-0,88**	+0,43	+0,43	**+0,55**	**-0,01**	-0,45	**+0,55**	**-0,69**

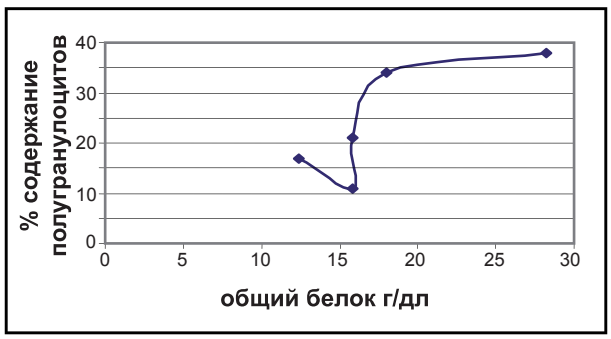


Рис. 2. Зависимость процентного содержания полугранулоцитов от содержания общего белка у самцов речных раков *Astacus astacus*. На графике точки (содержание общего белка, г/дл и содержание полугранулоцитов каждой особи в эксперименте, %) соединены сплошной линией. Видна прямая корреляция данных показателей: чем выше процент полугранулоцитов, тем выше содержание общего белка в гемолимфе

зволит создать нормативную базу для использования их в качестве биомоделей.

Видовые отличия по составу гемолимфы заключаются в том, что у широкопалого больше глюкозы, а показатели активной реакции (pH) и активности щелочной фосфатазы более низкие по сравнению с длиннопалым. Имеют место половые различия гематологических и биохимических свойств гемолимфы. Содержание глюкозы в гемолимфе самцов широкопалого находится на гораздо более высоком уровне, чем у самок.

Альбумины гемолимфы *Astacus astacus* обоих полов составляют около 27% от общего белка.

Клеточная часть гемолимфы речных раков представлена четырьмя типами гемоцитов: прозрачными клетками (предшественниками клеток гемолимфы), агранулоцитами, полугранулоцитами, гранулоцитами. Процентное содержание разных типов гемоцитов положительно или отрицательно коррелирует с биохимическими показателями гемолимфы: содержанием альбуминов и глюкозы, активностью АЛТ и др.

При проведении биохимических и гематологических исследований гемолимфы речных раков, используемых в качестве биомоделей, при формировании групп аналогов необходимо учитывать их половую принадлежность.

Список литературы

1. ***Дубовская Л.В.*** Выбор метода и обоснование методического подхода к выявлению активности холинэстераз цельной крови человека с использованием реактива БАС-Cl//Медицинская консультация. 1998. № 3. С. 35–39.

2. ***Жуковский Ю.Г., Кузнецова Л.П., Сочилина Е.Е., Алебян Г.П.*** О ферментативном гидролизе дитиохолинового эфира пробковой кислоты под действием различных холинэстераз//Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1997. Т. 33. С. 308–312.

3. **Курилова С.А., Богданова А.В., Назарова Т.И., Аваева С.М.** //Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. С. 1147–1152.

4. ***Малинин М.Л., Тихомирова Е.И., Обух Л.Б., Кияшко В.В., Ласкавый В.Н.*** Половые различия по биохимическим показателям крови у разных видов лабораторных животных //Известия Саратовского Университета. 2008. Т.8. (Сер. Химия. Биология. Экология. Вып.1.) С. 51–54.

5. ***Мартынова М. Г., Быстрова О. М., Парфенов В. Н.*** Синтез нуклеиновых кислот и локализация предсердного натрийуретического пептида в гемоцитах речного рака //Цитология. 2008.Vol.50, №3. С. 243–248.

6. ***Пронина Г. И., Корягина Н. Ю.*** Повышение иммунофизиологического статуса ракообразных – основа эффективности раководства//Международная научно-практическая конференция: Рациональное использование пресноводных экосистем – перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК». 2007. С. 418–421.

7. ***Пронина Г.И., Корягина Н.Ю.*** Некоторые видовые особенности физиологической и иммунной системы речных раков // Физиология адаптации: Материалы 1-й Всероссийской научно-практической конференции. Волгоград. 2008. С. 9–103.

8. ***Танюхина О.Н., Коневалова А.Р., Попов А.И.*** Диагностика раннего выявления нарушений здоровья лиц, контактирующих с фосфорорганическими отравляющими веществами, с помощью анализатора активности холинэстераз крови «Гранат-3» //Вестник российской военно-медицинской академии. 2005. Т. 1, № 14. С. 211–214.

9. ***Хейль В., Коберштейн Р., Цавта Б.*** Референтные пределы у взрослых и детей. Преаналитические предосторожности. М.: Мир, 2001. 176 с.

10. ***Muller G.*** Klinisch-chemische Diagnostik. Gustav Fischer Verlag. 1993. Jena Stuttgart. P. 233.

11. ***Newsom J. E., Davis K. B.*** 1994. Osmotic responses of haemolymph in red swamp crayfish (Procambarus clarkii) and white river crayfish (P. zonangulus) to changes in temperature and salinity//Aquaculture. Vol.126. P. 373–381.

12. ***Jensen Frank B., Malte Hans.*** Acid-base and electrolyte regulation, and haemolymph gas transport in crayfish, Astacus astacus, exposed to soft, acid water with and without aluminium //Comparative Physiology (B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology). 1990. Vol.160, № 5. P. 483–490.

13. ***Soderhall K., Johansson M. W. and Smith V. J.*** Internal Defence Mechanisms. Freshwater crayfish//Biology, management and exploitation, edited by D.M Holdich and R.S. Lowery. 1988. P. 213–235.

14. ***Spicer J.I., Taylor A.C.*** Oxygen-binding by haemocyanins from an ecological series of amphipod crustaceans // Marine Biology. 1994. Vol.120, № 2. P. 231–237.

15. ***Taylor S., Landman M.J., Ling N.*** Flow cytometric characterization of freshwater crayfish hemocytes for the examination of physiological status in wild and captive animals // J. Aquat. Anim. Health. 2009. Vol.21, №3. P. 195–203.

16. ***Thomas L.*** Alkalische Phosphatase. In: Thomas L (Editor) Labor und Diagnose, Marburg//Die Medizinische Verlagsgesellschaft. 1995. Stud.–Edit. der 4. S. 50.

Comparative characteristics of alternative biomodels on hematological and biochemical parameters

N. Ju. Koryagina, G. I. Pronina, A. O. Revyakin

The physiological condition of crayfish is in many respects defined by metabolism indicators, in particular haemolymph indicators. Haemolymph cages – haemocytes (all types) participate in immune protection of crayfish. Albumins in haemolymph *Astacus astacus* both sex make about 27 % from the total protein and are postponed basically in semigranulocytes.

Specific and sexual distinctions of properties of a haemolymph of crayfish are noted. An indicator of active reaction (pH) of *Astacus astacus*, more low, than *Pontastacus leptodactylus*. Level of glucose at males *Astacus astacus* more higher, than at females of the same kind and males *Pontastacus leptodactylus*. Alkaline phosphatase is more active in haemolymph *Pontastacus leptodactylus*, than *Astacus astacus*. With the big degree of reliability it is possible to speak about correlation between concentrate albumins in haemolymph *Astacus astacus* (both males, and females) and percentage semigranulocytes in the relation granulocytes return correlation is traced.

Key words: biomodel, biomodeling, crayfish, hemolimfa.