Известия ТСХА, выпуск 4, 2013 год

УДК 575.224:57.577

КАТИОННЫЕ НЕФЕРМЕНТНЫЕ БЕЛКИ ЛИЗОСОМ ФАГОЦИТОВ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ИНДИКАТОРЫ БИОЦИДНОСТИ ВНУТРЕННЕЙ СРЕДЫ ГИДРОБИОНТОВ

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

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

Изучали неспецифический клеточный иммунитет по составу иммунокомпетентных клеток и активности катионных белков фагоцитов гемолимфы речных раков (широкопалых — Astacus astacus и длиннопалых — Pontastacus leptodactylus) и крови позвоночных гидробионтов: рыб (на примере карпа — Cyprinus carpio L.) и амфибий (на примере травяной лягушки — Rana temporaria и гладкой шпорцевой лягушки — Xenopus laevis). Лейкограмма изучаемых позвоночных гидробионтов лимфоцитарного типа. Однако процент сегментоядерных нейтрофилов в крови травяных лягушек значительно выше, чем у рыб. На фоне лимфоцитарного профиля констатировали более активный лейкопоэз у рыб по сравнению с амфибиями. Неспецифический иммунитет гидробионтов разных систематических групп представлен фагоцитозом. У рыб и амфибий основные фагоцитирующие клетки крови — макрофаги (моноциты) и микрофаги (нейтрофилы). Все типы клеток гемолимфы речных раков (гемоцитов) являются фагоцитами. Выявили, что гидробионты, находящиеся на разных уровнях эволюционного древа, имеют сходную активность неферментного лизосомального белка фагоцитирующих клеток. Однако на фоне ряда патологий отмечают изменение (как правило, увеличение) активности и концентрации лизосомальных катионных белков, особенно в разгар инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной этиологии. Не обнаружили межвидовых различий бактерицидной активности фагоцитов у представителей ракообразных, рыб и амфибий. Зафиксировали разный уровень активности катионных белков в составе фагоцитов здоровых раков и раков, пораженных ржавопятнистым заболеванием. При попадании возбудителя данного заболевания грибковой этиологии (Saprolegnia parasitica) в водную среду обитания примерно 1/5 широкопалых речных раков (Astacus astacus) не заболевает. У них средний цитохимический коэффициент СЦК достоверно ниже, чем у заболевших особей. На основании общепринятого утверждения, что фагоцитарная активность является неспецифическим врожденным фактором иммунитета, по результатам собственных исследований заключили, что активность катионного белка можно использовать как индикатор уровня неспецифического иммунитета в селекции гидробионтов на иммунную устойчивость.

Ключевые слова: речные раки, карп, земноводные, кровь, катионные белки фагоцитов.

Одной из систем, обеспечивающих биоцидность фагоцитов, является кислороднезависимая (КНЗ) система клеток. К КНЗ-системе в первую очередь относятся специфические катионные белки — дефенсины (от англ. defence — защита). Они демонстрируют различные защитные эффекты: могут повреждать мембраны микробов (катепсин G), расщеплять мукопептиды клеточной стенки бактерий (лизоцим), лишать бактерии железа, необходимого для их пролиферации (лактоферрин), переваривать убитые микробы [11, 17].

Показано, что катионные белки обладают не только антимикробной активностью, но и свойствами медиаторов воспаления; они являются фактором проницаемости, стимулятором фагоцитоза, модификатором дыхательных и ферментативных процессов в клетке. Высказано предположение о трех взаимосвязанных механизмах внеклеточного антимикробного действия лизосомных катионных белков нейтрофильных гранулоцитов в очагах воспаления: 1) прямое антимикробное действие (киллинг), 2) подготовка (опсонизация) бактерий к фагоцитозу, 3) стимуляция фагоцитарной и антимикробной активности макрофагов при их контакте с катионными белками [16, 17, 33].

При ряде болезней отмечают изменение (как правило, увеличение) активности и концентрации лизосомальных катионных белков, особенно в разгар инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной этиологии [1, 3, 6, 12, 13, 14, 15, 18, 20, 23, 24, 25, 31]. Е.А. Тихонина обнаружила увеличение активности катионного белка в нейтрофилах крови при неинфекционной патологии у пациентов с ишемической болезнью сердца [21].

Отличительным признаком структуры дефенсинов является высокое содержание в их составе основных аминокислот (от 4 до 10 остатков аргинина и лизина), что в значительной степени определяет их катионный заряд и высокую изоэлектрическую точку. Для этих белков характерно и относительно высокое содержание аминокислот с гидрофобными боковыми цепями (изолейцина, пролина, лейцина, валина, фенилаланина, триптофана). Еще одной особенностью первичной структуры катионных белков является наличие 6 остатков аминокислоты цистеина, которые участвуют в образовании внутримолекулярных дисульфидных мостиков, стабилизирующих вторичную структуру пептидной молекулы и придающих ей повышенную устойчивость к переваривающему действию протеиназ гранулярного аппарата нейтрофилов в очагах воспаления [7, 8].

Катионные белки лизосомального аппарата клеток являются ранним приобретением эволюции. Они давно служат предметом изучения в медицине, но в ветеринарной практике широкого применения пока не нашли. Результаты исследований авторов, выполненных на животных, стоящих на низких ступенях эволюции, — раках, рыбах и амфибиях, дают основание говорить о раннем эволюционном происхождении этой линии иммунологической защиты животных.

Клеточная часть гемолимфы ракообразных представлена тремя видами гемоцитов: агранулоцитами, полугранулоцитами и гранулоцитами [10, 28, 32]. Недавно выделен еще один тип клеток, предположительно являющихся предшественниками перечисленных выше клеток, — «прозрачные клетки» [19].

Каждый тип гемоцитов выполняет свою специфическую функцию в процессе иммунной защиты. Мембраны агранулоцитов содержат рецепторы, распознающие антиген-детерминанты. При вторжении в организм чужеродных агентов, например ß 1,3-глюканов грибков или LPS-маркеры бактериальных клеток, происходит их распознавание по принципу комплементарности. Далее следует активация каскада ферментов, выход профенолоксидазной системы из гранулоцитов и полугранулоцитов. Агранулоциты и полугранулоциты осуществляют фагоцитоз, инкапсуляцию слоями гемоцитов, микробный киллинг, агглютинацию чужеродных агентов [29, 34].

Несмотря на значительные различия системы иммунитета у животных разных систематических групп изучаемых нами гидробионтов, неспецифический иммунитет представлен фагоцитозом у всех видов. Поэтому для оценки состояния биоцидности циркулирующих жидкостей гидробионтов мы использовали цитохимический метод оценки фагоцитарной активности фагоцитов.

Материал и методы

Объектами исследования являлись животные-гидробионты разных типов и классов. Ракообразных представляли широкопалый (Astacus astacus) и длиннопалый (Pontastacus leptodactylus) речные раки, рыб — типичный обитатель внутренних водоемов средней полосы — карп (Cyprinus carpio L.), земноводных — два вида амфибий — травяная лягушка (Rana temporaria) и гладкая шпорцевая лягушка (Xenopus laevis). Количество особей в опыте: 20 самцов и 4 самки речных раков; 20 самцов и 20 самок карпа; по 5 самцов и 5 самок травяных и шпорцевых лягушек.

Гемолимфу речных раков получали путем пункции вентрального синуса. Кровь для анализа у рыб отбирали методом пункции хвостовой вены, у лягушек кровь получали из полости желудочка сердца после предварительного обездвиживания с соблюдением правил асептики.

Гемоцитарную формулу речных раков рассчитывали на основе результатов микроскопирования нативной гемолимфы в камере Горяева. Показатели активности эритропоэза и дифференциальный подсчет лейкоцитов рыб с последующим расчетом лейкоформулы производили в окрашенных по Паппенгейму мазках цельной крови на цифровом микроскопе Optika DM 15.

Фагоцитарную активность нейтрофилов рыб, амфибий и гемоцитов раков оценивали цитохимическим методом по М.Г. Шубичу с бромфеноловым синим [23].

При определении степени бактерицидной активности фагоцитов исследуемые клетки делили на 4 группы:

0 степень — гранулы катионного белка отсутствуют;

1 степень — единичные гранулы белка в поле зрения;

2 степень — гранулы занимают примерно 1/3 площади цитоплазмы;

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

Итоговый результат активности фагоцитов оценивали по среднему цитохимическому коэффициенту (СЦК) по L. Kaplow [30] по формуле

$$СЦК = (0 \times Н_0 + 1 \times Н_1 + 2 \times Н_2 + 3 \times Н_3)/100,$$

где $Н_0$, $Н_1$, $Н_2$, $Н_3$ — количество нейтрофилов с активностью 0, 1, 2 и 3 балла соответственно.

В адаптированном варианте для речных раков формула выглядит следующим образом:

$$СЦК = (0 \times Г_0 + 1 \times Г_1 + 2 \times Г_2 + 3 \times Г_3)/100,$$

где $Г_0$, $Г_1$, $Г_2$, $Г_3$ — количество гемоцитов с активностью 0, 1, 2 и 3 балла соответственно.

Цифровой материал обрабатывался методами вариационной статистики на компьютере с использованием приложения Excel.

Результаты и обсуждение

В гемоцитарной формуле речных раков не отмечено существенных различий между двумя изучаемыми видами (табл. 1). Гемоциты гемолимфы широкопалого и длиннопалого раков представлены примерно равными долями (25–40%) в сумме гемоцитов, за исключением прозрачных клеток, доля которых существенно меньше (3–8%). Гендерные различия клеточного состава гемолимфы не подтверждаются ста-

Таблица 1

Гемоцитарная формула речных раков, %

Показатель	*Astacus astacus*		***Pontastacus leptodactylus***
	♂	♀	♂
Агранулоциты	40,0 ± 3,98	29,0 ± 10,98	34,9 ± 4,88
Полугранулоциты	24,2 ± 5,72	34,3 ± 4,82	29,7 ± 3,43
Гранулоциты	27,8 ± 2,82	29,8 ± 7,92	32,1 ± 2,35
Прозрачные клетки	8,0 ± 1,90	4,5 ± 1,67	3,4 ± 1,58

тистическим анализом из-за высокой вариабельности показателей в пределах малой выборки.

В таблице 2 представлены результаты дифференциального подсчета лейкоцитов карпа и лягушек. Судя по доле ювенильных форм гранулоцитов и палочкоядерных нейтрофилов, можно сделать предположение о том, что лейкопоэз у рыб проте-

Таблица 2

Лейкоцитарная формула рыб и амфибий, %

Показатель	Карп		Травяная лягушка	
	самцы	самки	самцы	самки
	а	б	в	г
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: ^{аб} и т.д. — различия достоверны между группами животных.

кает интенсивнее, чем у амфибий. Возможно, это связано с тем, что у земноводных количество очагов гемопоэза меньше, чем у рыб, и органом кроветворения является красный костный мозг [5].

Лейкограмма изучаемых позвоночных гидробионтов лимфоцитарного типа. Однако процент сегментоядерных нейтрофилов в крови травяных лягушек значительно выше, чем у рыб. Доверительный коэффициент для самцов составил 5,5; для самок — 8,0. У самок травяных лягушек доля сегментоядерных нейтрофилов достоверно больше, чем у самцов.

По-видимому, эта особенность амфибий в большей степени обусловлена не систематическим положением, а адаптационными особенностями животных этой группы. В пользу данного предположения свидетельствует тот факт, что доля сегментоядерных нейтрофилов в крови шпорцевых лягушек также невелика: 2,7 ± 0,5%. У травяных лягушек в крови обнаруживается незначительное (по сравнению с карпом) количество палочкоядерных нейтрофилов. А у шпорцевых лягушек палочкоядерных нейтрофилов не обнаружено вовсе.

При оценке бактерицидной активности фагоцитов по СЦК катионного белка в лизосомах межвидовых различий выявлено не было (табл. 3). У раков СЦК составил величину около 1,7 ед; у карпа и лягушек — чуть больше (1,78–2,06 ед.). Однако достоверность различий статистический анализ не подтверждает ($P > 0,05$).

Таблица 3

СЦК катионного лизосомального белка фагоцитов гидробионтов, ед.

Широкопалые речные раки (*Astacus astacus)*		Карп (*Cyprinus carpio L.*) чувашский чешуйчатый		Травяные лягушки *(Rana temporaria)*	
самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
1,69 ± 0,13	1,78 ± 0,11	1,77 ± 0,18	2,06 ± 0,98	1,78 ± 0,27	1,78 ± 0,24

Авторами было проведено исследование широкопалых речных раков, пораженных ржавопятнистым заболеванием (РПЗ). Это специфическое заболевание ракообразных имеет грибковую природу. РПЗ проявляется как хроническое заболевание и характеризуется возникновением на панцире речных раков коричневатых пятен с некротизированными участками карапакса.

Появление очагов меланиновых пятен на панцире раков рассматривается как проявление иммунной реакции на вторжение грибковых возбудителей, однако этиология заболевания до конца неясна. РПЗ у широкопалого рака вызывает грибок *Septocylindrium eriocheir*, у длиннопалого рака — грибок другого вида — *Septocylindrium astaci* [4, 9, 22].

Европейские астакологи возбудителей аналогичных очаговых поражений идентифицировали как гриб *Fusarim solani*, относящийся к классу несовершенных грибов, а также как плесневый грибок *Saprolegnia parasitica* [2, 26, 27, 33].

В нашем исследовании заболевших раков авторы диагностировали по наличию на теле ржавых, оранжевых, темно-коричневых и черных пятен, а также язв. Микроскопическое исследование препаратов, приготовленных из пораженной ткани, показало, что у раков в пораженных местах присутствовали гифы, цисты и геммы гриба *Saprolegnia parasitica*, которые сохраняли жизнеспособность при высеве на

среду Чапека. У авторов имеются обоснованные подозрения, что РПЗ сопровождают вторичные бактериальные инфекции.

Результаты анализа клеточного состава гемолимфы свидетельствуют, что по общему числу гемоцитов и характеру гемоцитарной формулы пораженные РПЗ и клинически здоровые особи раков не различались (табл. 4). На долю агранулярных клеток, полугранулоцитов и типичных гранулоцитов как у здоровых раков, так и раков с признаками РПЗ приходилось 27–36%. В то же время у клинически здоровых раков в гемолимфе было достоверно больше прозрачных клеток. Следовательно, при РПЗ может иметь место угнетение функций кроветворных органов. Однако напрашивается и другое предположение: РПЗ поражает те особи, у которых гемопоэз в силу каких-то причин протекает недостаточно активно.

Таблица 4

Гематологические показатели речных раков *Astacus astacus*

Показатель	Клинически здоровые особи	Раки с признаками РПЗ
Масса тела, г	21,2 ± 0,2	20,3 ± 1,1
Длина тела, мм	87,5 ± 0,7	88,0 ± 1,4
Общее число гемоцитов (ОЧГ), мкл	363 ± 302	453 ± 238
Гемоцитарная формула, %		
Агранулоциты	30,5 ± 1,3	26,8 ± 8,1
Полугранулоциты	30,8 ± 19,0	33,7 ± 8,0
Гранулоциты	29,8 ± 11,2	36,4 ± 5,5
Прозрачные клетки	8,9 ± 8,3	3,1 ± 1,4
Фагоцитарная активность		
СЦК, ед.	0,87 ± 0,12*	1,62 ± 0,12*

* Различия достоверны.

Тот факт, что СЦК катионного белка у пораженных раков был достоверно выше, чем у здоровых животных (1,62 ед. против 0,87 ед.), может свидетельствовать в пользу того, что у раков с признаками РПЗ имеет место радикальное перестроение иммунных механизмов. Поражение РПЗ свидетельствует о том, что иммунная система речных раков не справляется с грибковым возбудителем, разрушающим карапакс, но сдерживает развитие бактериальной инфекции.

Интересно заметить, что клинически здоровые особи находились с больными в одном водоеме и имели с ними физический контакт. Вероятно, в иммунологическом отношении эти особи более защищены от грибковой инфекции. Не исключено, что снижение в лизосомах содержания неферментного катионного белка у здоровых особей произошло вследствие его активного использования в процессе иммунной защиты, которая имеет более выраженный фунгицидный вектор.

Таким образом, цитохимический коэффициент лизосомального катионного белка в фагоцитах является показателем биоцидности циркулирующих жидкостей гидробионтов и позволяет судить о состоянии их клеточного иммунитета. Показатель может использоваться в качестве иммунооценочного теста в рыбоводных хозяйствах при выращивании различных животных объектов аквакультуры, а также как индикатор уровня неспецифического иммунитета в практической селекции гидробионтов.

Библиографический список

1. *Абидов М.Т., Жигунова И.М.* Состояние функциональной активности лейкоцитов у больных сальмонеллезом // Вестник КБГУ. Нальчик, 1997. № 3. С. 32–33.

2. *Александрова Е.Н., Пронина Г.И., Корягина Н.Ю.* Микологическое исследование поражений внешних покровов речных раков // Материалы Международной научно-практической конференции. Минск, 2004. С. 266–269.

3. *Васильев В.С., Юшкевич С.П.* Клинико-терапевтическая оценка роли лизосомальных катионных белков нейтрофилов крови при вирусном гепатите в аспекте неспецифической резистентности организма // Терапевтический архив. 1980. № 11. С. 51–53.

4. *Воронин В.Н.* Болезни и паразиты широкопалого рака *Astacus astacus* в России и сопредельных странах // Рыбн. хоз-во. Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре. Аналитическая информация. М.: ВНИЭРХ, 2000. Вып. 4. С. 1–11.

5. *Грушко М.П.* Клеточный состав кроветворных органов половозрелых самок представителей класса рыб, земноводных и пресмыкающихся // Дис. д.б.н. Астрахань, 2010. 364 с.

6. *Ивашкевич Г.А., Айетти Д.Ж.* Катионные белки лейкоцитов при гнойных заболеваниях // Вестник хирургии. 1994. Т. 133. № 12. С. 33–37.

7. *Кокряков В.Н., Алешина Г.М., Шамова О.В., Орлов Д.С., Корнева Е.А.* Достижения и проблемы в изучении антибиотических пептидов животного происхождения // Вестник РАМН. 2002. № 12. С. 15–20.

8. *Кокряков В.Н.* Очерки о врожденном иммунитете. СПб.: Наука, 2006. 273 с.

9. *Лаврентьева Г.М., Воронин В.Н.* Диагностика и профилактика инфекционных заболеваний раков в условиях Северо-Запада России // Методич. указ. СПб.: ГосНИОРХ, 1994. 10 с.

10. *Мартынова М.Г., Быстрова О.М., Парфенов В.Н.* Синтез нуклеиновых кислот и локализация предсердного натрийуретического пептида в гемоцитах речного рака // Цитология. 2008. 50 (3). С. 243–248.

11. *Маянский Д.Н., Маянская Н.Н.* Биохимия воспаления. Новосибирск, 1995. 31 с.

12. *Нагоев Б.С.* Цитохимия и цитофлюориметрия катионных белков нейтрофильных гранулоцитов здоровых людей и у больных вирусным гепатитом // Лабораторное дело. 1983. № 4. С. 18–21.

13. *Нагоев Б.С.* Цитохимическое изучение состояния лейкоцитарной системы у взрослых, больных скарлатиной // Лабораторное дело. 1988. № 10. С. 42–43.

14. *Нагоев Б.С.* Внутриклеточный метаболизм и функциональная активность лейкоцитов у больных менингитами различной этиологии // Терапевтический архив. 1989. № 11. С. 24–28.

15. *Оразаев Н.Г., Металлова А.А.* Содержание катионного белка лейкоцитов у больных гриппом // Достижения медицинской науки практическому здравоохранению. Нальчик, 1995. 59 с.

16. *Пигаревский В.Е.* Зернистые лейкоциты и их свойства. М., 1978. 128 с.

17. *Пигаревский В.Е.* Гипотеза о резорбтивной клеточной резистентности как особой форме антимикробной защиты организма // Арх. патологии. 1992. Вып. 8. С. 40–45.

18. *Прийма О.Б.* Роль гипоксии и неферментных катионных белков лейкоцитов в патогенезе послеоперационных острых гнойно-воспалительных процессов // Клиническая хирургия. 1992. № 6. С. 60–63.

19. *Пронина Г.И., Корягина Н.Ю.* Некоторые видовые особенности состава форменных элементов крови гидробионтов // Стратегия развития аквакультуры в современных условиях. Вопросы рыбного хозяйства Беларуси: сборник научных трудов / РУП «Институт рыбного хозяйства», РУП «НПЦ Национальной академии наук Беларуси по животноводству», БГУ. Минск, 2008. Вып. 24. С. 465–470.

20. *Сааева Н.М.* Состояние миелопероксидазы и содержания катионного белка у больных острым и хроническим бруцеллезом // Актуальные вопросы инфекционной патологии. Нальчик, 2000. С. 49–51.

21. *Тихонина Е.А.* Оценка системы нейтрофильных гранулоцитов при ишемической болезни сердца // Автореф. канд. дис. Челябинск, 2010. 102 с.

22. *Удалов Г.М.* Длиннопалый рак (Astacus leptodactylus) и его заболевание ржавопятнистой болезнью в некоторых водоемах Азово-Черноморского бассейна. Автореф. канд. дис. М., 1973. 17 с.

23. *Шубич М.Г.* Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // Цитология. 1974. № 10. С. 1321–1322.

24. *Юанов А.А.* Содержание катионного белка лейкоцитов у больных острым и с обострением хронического панкреатита // Успехи современного естествознания. 2003. № 10. 109 с.

25. *Alam M.* Influence of neutrophil cationic proteins on generation of superoxid by human polymorphonuclear cells during phagocytosis // Inflamation. 1987. Vol. 11. № 2. P. 131–142.

26. *Chinain M. and Vey A.* Infection caused by Fusarium solani in crayfish Astacus leptodactylus // Freshwater crayfish. 1997. № 7. P. 295–302.

27. *Diéguez-Uribeondo J.L., Cerenius L., Söderhäll K.* Repeated zoospore emergence in *Saprolegnia parasitica* // Mycological Research. 1994. № 98. P. 810–815.

28. *Johansson M.W., Keyser P., Sritunyalucksana K., Söderhäll K.* Crustacean haemocytes and haematopoesis // J. Aquaculture. 2000. № 199 (1–3). P. 45–52.

29. *Johansson M.W., Söderhäll K.* Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells // J. Cell Biol. 1988. № 106. P. 1795–1803.

30. *Kaplow L.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.

31. *Piers K.L., Brown M.M., Hancock R.E.* Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria // Gene. 1993. Vol. 134. P. 7–13.

32. *Söderhäll K., Johansson M.W., Smith V.J.* Internal defense mechanisms // Freshwater crayfish: Biology, management and exploitation (edited by D.M. Holdich and R.S. Lowery). 1988. P. 213–235.

33. *Söderhall K., Dick M.W., Clark G., Furst M., Constantinescu O.* Isolation of Saprolegnia parasitica from the crayfish Astacus leptodactylus // Aquaculture. 1991. № 92. P. 121–125.

34. *Söderhäll K., Cerenius, L.* Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity // Curr. Opin. Immunol. 1998. № 10. P. 23–28.

LYSOSOMAL CATIONIC NONENZYME PROTEINS OF PHAGOCYTES USED AS A UNIVERSAL INDICATOR OF BIOCIDAL ACTIVITY OF AQUATIC ORGANISMS' INTERNAL ENVIRONMENT

A.A. IVANOV, G.I. PRONINA, N.YU. KORYAGINA.

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

Nonspecific cell immunity was studied on the basis of immunocompetent cells structure and cationic proteins activity of phagocytes in hemolymph of river crayfish (Astacus astacus and Pontastacus leptodactylus), as well as of blood of vertebral hydrobionts: fishes (Cyprinus carpio L. taken as an example) and amphibians (by the example of Rana temporaria and Xenopus

laevis). Leucogram of examined hydrobionts belongs to lymphocytic type. However the percentage of segmented nuclear neutrophils of frogs significantly exceeded that one of fish. Lymphocytic profile stated more active leukopoiesis in fishes compared to amphibians. Nonspecific immunity of hydrobionts belonging to various systematic groups is due to phagocytosis. The main phagocytizing blood cells of fishes and amphibians are represented by macrophages (monocytes) and microphages (neutrophils). All types of river crayfish hemolymph cells are phagocytes. So, all hydrobionts from different levels of the evolutionary tree were found to have the similar activity of nonenzyme lysosomal protein of phagocytizing cells. However, a number of pathologies can result in some changes in activity and concentration of lysosomal cationic proteins (their increase, as a rule), especially in case of infectious diseases caused by bacteria and viruses. Interspecific distinctions of bactericidal activity of phagocytes between crustaceans, fishes and amphibians were not revealed. But different activity levels of cationic proteins were recorded in healthy and rusty crayfish. When pathogenic agent of fungoid etiology (Saprolegnia parasitica) appeared in the water about 1/5 of all crayfish remains resistant to it. The average cytochemical coefficient of healthy crayfish was reliably lower than the one of sick individuals. On the basis of the common statement that phagocytes' activity is a nonspecific congenital factor of immunity and according to the results of our own researches it can be concluded that cationic protein activity can be used as the indicator of the nonspecific immunity level in selection of hydrobionts with immune stability.

Key words: river crayfish, carp, amphibious, blood, cationic proteins of phagocytes.

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 Иозеповна — соискатель кафедры физиологии, морфологии и биохимии животных РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева. E-mail: gidrobiont4@yandex.ru).

Корягина Наталья Юрьевна — аспирант кафедры физиологии, морфологии и биохимии животных РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева.