УДК 639.3/.5:574.5:591.1 doi: 10.15389/agrobiology.2018.2.337rus

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОЙКИЛОТЕРМНЫХ ГИДРОБИОНТОВ ИЗ ПРИРОДНЫХ И ИСКУССТВЕННЫХ ВОДНЫХ БИОЦЕНОЗОВ

Д.Д. АДЖИЕВ[1], Г.И. ПРОНИНА[2], А.А. ИВАНОВ[3], Н.Ю. КОРЯГИНА[2]

Для оценки устойчивости природных биоценозов и физиолого-иммунологического состояния гидробионтов в аквакультуре требуется определить функциональные показатели циркулирующих жидкостей гидробионтов разных систематических групп. Цель настоящего исследования — определить границы референтных значений для основных показателей гомеостаза у гидробионтов из рыбоводных и природных водоемов. Объектами исследования были речные раки (широкопалый *Astacus astacus* и длиннопалый *Pontastacus leptodactylus*), рыбы (карп *Cyprinus caprio* L., линь *Tinca tinca* L., сом обыкновенный *Silurus glanis* L.), амфибии (травяная лягушка *Rana temporaria* и гладкая шпорцевая лягушка *Xenopus laevis*). Изучали гематологические, цитохимические, биохимические показатели. Гематологические исследования включали дифференциальный подсчет гемоцитов речных раков в камере Горяева и клеток крови рыб и амфибий в мазках, окрашенных по Паппенгейму. Иммунологические показатели оценивали цитохимическим методом по среднему цитохимическому коэффициенту (СЦК) лизосомального катионного белка в нейтрофилах крови рыб и гемоцитах речных раков в реакции с бромфеноловым синим. Биохимические показатели определяли в сыворотке крови на биохимическом анализаторе Chem Well («Awarenes Technology, Inc.», США). Установлены следующие референтные значения показателей гомеостаза: общее число клеток в гемолимфе раков в пределах 700-800 в 1 мкл; у рыб число эритроцитов 1-2 млн/мкл, лейкоцитов — 50-150 тыс/мкл. Межвидовые различия гемоцитарной формулы у речных раков *Astacus astacus* и *Pontastacus leptodactylus* не выявлены. Отмечены различия по биохимическим показателям: концентрация глюкозы в гемолимфе раков *Astacus astacus* превышала аналогичный показатель у особей вида *Pontastacus leptodactylus* на 64 %, тогда как активность щелочной фосфатазы (ЩФ) оказалась почти на 71 % ниже. Фагоцитами у раков служат агранулоцитарные и полуагранулоцитарные гемоциты, а также ювенильные формы — «прозрачные» клетки. Фагоцитарная активность этих клеток, судя по среднему цитохимическому коэффициенту содержания катионного лизосомального белка, у здоровых речных раков находилась примерно на одном уровне в пределах 1,5-2,0 ед. Выявлены видовые и гендерные различия гомеостатических показателей рыб. Лейкопоэз интенсивнее происходит у линя — присутствуют бластные формы лейкоцитов (промиелоциты). Доля нейтрофилов наиболее высокая у самцов линя за счет палочкоядерных форм: в 2-3 раза больше, чем у других групп. Содержание неферментного катионного белка в лизосомах нейтрофилов у самок изучаемых рыб: карпа, линя, сома обыкновенного было больше, чем у самцов. Активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ) производителей линя и сома обыкновенного примерно в 3 раза больше, чем карпа. Отмечен высокий уровень углеводного обмена у карпа и сома по содержанию лактата — более чем в 3 раза по сравнению с линем. У исследуемых видов земноводных определены референтные значения физиологических показателей и отмечены межвидовые и половые различия. Доля сегментоядерных нейтрофилов у травяных лягушек более чем в 4 раза превышала таковую у гладкой шпорцевой лягушки. Гендерные вариации по числу сегментоядерных клеток выглядели следующим образом: содержание клеток у самцов травяной и гладкой шпорцевой лягушки было соответственно на 27 и 33 % меньше, чем у самок. Содержание лимфоцитов в крови лягушек *Rana temporaria* достоверно ниже, чем у *Xenopus laevis*. По биохимическим показателям отмечены гендерные различия у *Rana temporaria*: у самок выявлена бóльшая, чем у самцов, активность ферментов переаминирования (АлАТ и АсАТ — соответственно на 6 и 19 %), креатинкиназы (на 29 %) и щелочной фосфатазы (на 60 %). Содержание общего белка в плазме крови амфибий составляет 2-3 %, глюкозы — 1-4 ммоль/л, триглицеридов — варьирует от 0 до 400 мг%. Предлагается проводить мониторинг гомеостаза гидробионтов для оценки прогноза сохранения видов низших позвоночных в природных и искусственных водных биоценозах.

Ключевые слова: природный и искусственный водные биоценозы, гидробионты, низшие позвоночные, широкопалый речной рак *Astacus astacus*, длиннопалый речной рак *Pontastacus leptodactylus*, рыбы, карп *Cyprinus caprio*, линь *Tinca tinca*; сом обыкновенный *Silurus glanis*, амфибии, травяная лягушка *Rana temporaria*, гладкая шпорцевая лягушка *Xenopus laevis*, гомеостаз.

Растущая потребность в качественных продуктах стимулирует развитие аквакультуры и искусственного воспроизводства видов животных — традиционных членов естественных биоценозов (1). В то же время под давлением антропогенных факторов многие виды исчезают из водных биоценозов, что нарушает устойчивость сообществ гидробионтов. Так, в Москов-

ском регионе в биоценозах крайне редки речные раки и осетровые рыбы. В последние годы резко уменьшилась численность земноводных, что приводит к неконтролируемому размножению насекомых — комаров, мух, слепней. Снижения численности популяций амфибий, вымирания отдельных популяций или видов целиком в последнее время приобретает глобальный масштаб (2). Очевидно, что вокруг и внутри крупных городов невозможно обеспечить экологическую безопасность без искусственного регулирования численности и видового состава животных сообществ. Искусственное воспроизводство и использование ракообразных, рыб, земноводных в качестве маркеров стабильности биоценозов сдерживается отсутствием детальной информации о физиологической норме для животных, в первую очередь обитателей водоемов — гидробионтов. Так как кровь — лабильная система организма, гематологические показатели наиболее полно отражают физиологические особенности этих животных и изменения среды их обитания при загрязнении водоемов, служат основой биоиндикационного метода (3).

Беспозвоночные гидробионты существенно отличаются от низших позвоночных не только строением тела, но и кровеносной системой. Дыхательный пигмент большинства ракообразных — гемоцианин (4), что придает ей голубой цвет. Кровеносная система ракообразных незамкнутая: в сосудах и межклеточных полостях циркулирует гемолимфа, состоящая из жидкой части — плазмы и клеточных структур — гемоцитов. У речных раков большинство авторов выделяют три типа гемоцитов (5-7). Мы идентифицировали четыре морфофункционально самостоятельных типа этих клеток (8), хорошо различимых при микрокопировании свежеотобранной гемолимфы, которые назвали агранулоцитами, полугранулоцитами, гранулоцитами, прозрачными клетками. Агранулоциты (ГЦ I) — это мелкие (3-17 мкм), обычно сферические клетки с небольшим количеством включений. Дольше других сохраняются на предметном стекле в неизменном виде. Полугранулоциты (ГЦ II) имеют размеры 8-40 мкм. Это промежуточные клетки между двумя другими типами. Содержат небольшое количество гранул разного размера. На предметном стекле их цитоплазма разрушается, и через 30-40 мин ГЦ II трудно отличить от агранулоцитов. Гранулоциты (ГЦ III) — самые крупные клетки гемолимфы (до 50 мкм и больше) с многочисленными и крупными гранулами с высоким лучепреломлением. Через 15 мин после отбора гемолимфы начинается выброс гранул с последующим растворением цитоплазмы. Размер прозрачных клеток (ГЦ IV) около 8-35 мкм, при световой микроскопии нативной гемолимфы они идентифицируются с трудом, ядра не просматриваются. Предположительно это недифференцированные предшественники клеток крови. Гемолимфа in vitro в аэробных условиях быстро изменяет реологические свойства, утрачивает текучесть и превращается в гелеобразную массу, гемоциты в течение 30-50 мин подвергаются структурно-функциональным изменениям, постепенно превращаясь из овально-веретеновидных клеток в округлые образования. В анаэробных условиях реологические изменения эндолимфы раков, по-видимому, не происходят (или процесс тормозится), о чем свидетельствует продолжение истечения лимфы при тампонаде травматического повреждения кутикулы (эндолимфа не сворачивается), тогда как при контакте гемолимфы с воздухом за несколько секунд образуется желеобразный сгусток (9).

Функции гемоцитов ракообразных изучены мало. Однако установлено, что разные типы гемоцитов участвуют в иммунной защите. Мембраны гемоцитов-агранулоцитов содержат распознающие рецепторы. При вторжении чужеродных агентов происходит распознавание антигенов (например, β-1,3-глюканов грибов или липополисахаридов бактерий) и активируется

каскад ферментов, стимулирующих выход фенолоксидазы из полугранулоцитов и гранулоцитов (10). Установлено также, что фагоцитоз, инкапсуляция слоями гемоцитов, микробный киллинг, агглютинация антигенов осуществляется агранулоцитами и полугранулоцитами (11). В отличие от избирательного иммунитета высших позвоночных, у речных раков отсутствуют приобретенные антитела и толерантность иммунной системы, что дает основание предполагать, что клетки гемолимфы в анаэробных условиях проявляют фагоцитарную активность (12, 13). Органов гемопоэза у речных раков нет, но выделена кроветворная ткань, расположенная на дорсальной и дорсолатеральной поверхности желудка. Идентифицированы пять типов кроветворных клеток, их число составляет примерно $1,4\times10^6$ (14).

Клеточный состав крови и факторы иммунитета гидробионтов наиболее полно изучен у рыб. Морфология клеток крови рыб очень многообразна, что проявляется в форме, размерах клеток, ядер, гранул, в видовом составе клеточных элементов и в значительной мере определяется экологическими условиями обитания вида. Значения показателей белой и красной крови зависят от температуры и загрязненности воды, гидрохимического режима, состава и количества поедаемых кормов, плотности посадки при выращивании, сезона, возраста, физиологического состояния (15-17). В отличие от высших позвоночных, в крови низших — рыб содержится довольно много незрелых форм клеток. Единой классификации клеток крови нет. Так, одни авторы (13, 18) разделяют нормобласты на базофильные, полихроматофильные, оксифильные и относят их к зрелым клеткам, другие (19) считают нормобласты незрелыми клетками, а эритроциты по степени зрелости подразделяют на базофильные и полихроматофильные. По мере созревания клетки эритроидного ряда проходят стадии эритробластов, нормобластов, базофильных, полихроматофильных и зрелых эритроцитов. Зрелые лейкоциты, согласно общепринятой терминологии, делятся на гранулярные, или зернистые (базофилы, эозинофилы, нейтрофилы), и агранулярные, или незернистые (лимфоциты и моноциты). Незрелые формы лимфоидного ряда представлены лимфобластами, пролимфоцитами, монобластами, промоноцитами. К предшественникам клеток миелоидного (зернистого) ряда относятся миелобласты, промиелоциты, миелоциты, метамиелоциты (20). В отличие от млекопитающих, у рыб больше органов гемопоэза: это жаберный аппарат и развивающаяся из него вилочковая железа, лимфатические фолликулы, слизистая оболочка желудка, эпителиальный слой сердца и эндотелий сосудов, селезенка (у высших позвоночных и костистых рыб она служит органом разрушения клеток крови и фагоцитоза), почки. У костистых рыб гемопоэз наиболее активен в лимфоидных органах, почках и селезенке, причем главный орган кроветворения — почки (передняя часть). В почках и селезенке происходит как образование эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, так и распад эритроцитов. У рыб (в отличие от взрослых млекопитающих) наличие в периферической крови и зрелых, и молодых эритроцитов не служит показателем патологии.

Сведений о клеточном составе крови амфибий крайне мало. Известно, что эритроциты крови земноводных крупные и, как и у рыб, в основном ядерные (21-24). Число эритроцитов у хвостатых амфибий — примерно 0,07-0,08 млн/мкл, у бесхвостых, по разным данным, — 0,35-0,50 млн/мкл и 0,38-0,64 млн/мкл; лейкоцитов — 2,4-21,0 тыс/мкл, тромбоцитов — 8,5-21,6 тыс/мкл (25). Иногда встречаются безъядерные эритроциты (до 5 %) (19).

Мы впервые изучили ряд гематологических, цитохимических и биохимических показателей у представителей водной фауны разных таксономических (ракообразные, рыбы, земноводные) и гендерных групп в Мос-

ковской, Псковской областях и Чувашской Республике. Полученные данные можно использовать при оценке устойчивости природных биоценозов и адекватности условий содержания этих гидробионтов в аквакультуре.

Цель работы заключалась в определении референтных границ значений для основных показателей гомеостаза у гидробионтов из искусственных и природных водоемов.

Методика. Исследования (2005-2015 годы) проводили на половозрелых клинически здоровых животных разных таксономических групп: двух видах речных раков (широкопалый *Astacus astacus* и длиннопалый *Pontastacus leptodactylus*), трех видах рыб (карп *Cyprinus caprio* L., линь *Tinca tinca* L., сом обыкновенный *Silurus glanis* L.) и двух видах амфибий (травяная лягушка *Rana temporaria* и гладкая шпорцевая лягушка *Xenopus laevis*) из природных и сельскохозяйственных водоемов средней полосы европейской части России (кроме гладкой шпорцевой лягушки, выращенной в аквариальных условиях). Широкопалый речной рак обитает в водоемах Псковской области, длиннопалый — Московской. Карпа и сома обыкновенного выращивают в рыбоводных прудах рыбхоза «Киря» (Чувашская Республика), линя — в рыбхозе «Осенка» (Московская обл.). Группы животных формировали по принципу аналогов, учитывая видовую принадлежность, пол, возраст, живую массу. Численность групп зависела от доступности объекта и колебалась в пределах малой выборки (от 5 до 20 особей).

Согласно разработанной нами методике (26), пробы циркулирующих жидкостей гидробионтов (речных раков и рыб) для анализа получали неинвазивным методом с соблюдением асептики. Гемолимфу раков отбирали in vivo пункцией вентрального синуса, кровь рыб — прижизненно из хвостовой вены. У земноводных кровь для приготовления мазков для гематологических и цитохимических исследований отбирали прижизненно из пальца, для биохимического анализа — из сердца.

При окрашивании по Паппенгейму (позволяет различать ядра клеток и цитоплазматические включения) сначала проводили окрашивание и фиксацию раствором Май-Грюнвальда в течение 3 мин, затем препараты промывали дистиллированной водой, обрабатывали раствором Романовского 40 мин, промывали водопроводной водой и высушивали на воздухе.

Общее число гемоцитов (ОЧГ) для расчета гемоцитарной формулы у речных раков подсчитывали в камере Горяева в нативной гемолимфе непосредственно после отбора. Для определения показателей эритропоэза и дифференциального подсчета лейкоцитов рыб (лейкоформула) использовали мазки периферической крови, окрашенные по Паппенгейму. Активность гемопоэза у рыб оценивали по доле незрелых форм эритроцитов. Клетки крови земноводных подсчитывали в камере Горяева. Для подсчета эритроцитов образец крови разводили в 200 раз в 0,9 % растворе NaCl (20 мкл крови и 4 мл раствора). Число эритроцитов $X_э$ в 1 мкл крови рассчитывали по формуле: $X_э = (a_э \times 4000 \times 200)/80$, где, $a_э$ — число клеток в 80 малых квадратах камеры Горяева. Для подсчета лейкоцитов образец разводили в 20 раз 5 % раствором уксусной кислоты с метиленовым синим. Число лейкоцитов $X_л$ в 1 мкл крови рассчитывали как $X_л = (a_л \times 250 \times 20)/100$, где $a_л$ — число лейкоцитов в 100 больших квадратах камеры Горяева. Для просмотра препаратов использовали цифровой микроскоп Optika DM 15 с программным обеспечением OPMIAS (OPTIKA Micro Image Analysis Software) (ООО «ПриборУфа», Россия).

Иммунологические показатели оценивали цитохимически по среднему цитохимическому коэффициенту (СЦК) лизосомального катионного белка в нейтрофилах крови рыб и гемоцитах речных раков в реакции с

бромфеноловым синим (27), адаптированной для гидробионтов (28). СЦК для рыб и речных раков вычисляли по формуле:

$$СЦК = [0 \times H_0(Г_0) + 1 \times H_1(Г_1) + 2 \times H_2(Г_2) + 3 \times H_3(Г_3)]/100,$$

где $H_0(Г_0)$, $H_1(Г_1)$, $H_2(Г_2)$, $H_3(Г_3)$ (%) — число нейтрофилов рыб (гемоцитов речных раков) с активностью соответственно 0, 1, 2 и 3 балла.

При биохимических исследованиях гемолимфу раков для предотвращения быстрой коагуляции центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин и 6 °С. У рыб кровь для получения сыворотки помещали в сухую стерильную пробирку и оставляли на 1 ч при комнатной температуре, после чего сыворотку осторожно отбирали шприцом с тонкой иглой, замораживали при –15-20 °С и в замороженном виде в термоконтейнерах со льдом транспортировали в лабораторию для анализа. Биохимические показатели крови рыб и гемолимфы раков определяли на программируемом автоматическом анализаторе Chem Well («Awarenes Technology, Inc.», США), используя наборы реактивов АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»» (г. Санкт-Петербург) (анализ белков — биуретовым методом) согласно протоколу производителя.

Рассчитывали средние (*M*) и стандартные ошибки средних (±SEM). Обработку результатов осуществляли методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $P < 0,05$.

Результаты. У объектов определяли гематологические, цитохимические и биохимические показатели, на основании чего делали заключение о физиологической норме для представителей вида.

Особенности гомеостаза раков. Речные раки — группа культивируемых гидробионтов, физиология которых наименее изучена. Общеклинический анализ показателей внутренней среды у речных раков дает объективную информацию об адаптированности животного к условиям обитания и может использоваться для биомониторинга окружающей среды в целом и водной — в частности. Характеристику особенностей гематологических, биохимических и цитохимических показателей гемолимфы у двух видов речных раков иллюстрирует таблица 1.

1. Характеристика гемолимфы речных раков двух видов из природных аквацензов (*M*±SEM, Московская и Псковская области, 2010-2012 годы)

Показатель	Широкопалый рак *Astacus astacus* (а) (n =10)	Длиннопалый рак *Pontastacus leptodactylus* (n =10)
Гемоцитарная формула, %:		
агранулоциты	40,0±3,9	34,9±4,8
полугранулоциты	24,2±5,7	29,7±3,4
гранулоциты	27,8±2,8	32,1±2,4
прозрачные клетки	8,0±1,9	3,3±1,6
Гематологические и биохимические показатели:		
ОЧГ, кл/мкл	384±111	911±137[a]
глюкоза, ммоль/л	2,2±0,6	< 0,5[a]
АлАТ, IU/л	80,6±11,7	55,1±17,8
АсАТ, IU/л	57,7±7,3	55,3±33,5
ЩФ, IU/л	17,1±2,1	78,0±20,2[a]
Цитохимические показатели:		
СЦК, ед.	1,70±0,06	1,87±0,17

Примечание. ОЧГ — общее число гемоцитов, АлАТ и АсАТ — соответственно аланин- и аспартатаминотрансфераза, ЩФ — щелочная фосфатаза, СЦК — средний цитохимический коэффициент.
[a] Различия с показателями у широкопалого рака статистически значимы при $P < 0,05$.

В эндолимфе число клеток всех трех типов (агранулоциты, полугранулоциты, гранулоциты) варьировало в среднем в пределах 32-35 %. Однако у *P. leptodactylus* число прозрачных клеток было на 18,2 % меньше, чем у *A. astacus*. По другим элементам гемоцитарной формулы межвидовые различия оказались несущественными. Средний цитохимический коэффициент лизосомального катионного белка в гемоцитах у речных раков *P. leptodactylus* на 9,4 % превышал таковой у *A. astacus*.

По биохимическим показателям эндолимфы речных раков выявили

несколько закономерностей. По ферментам переаминирования активность аланинаминотрансферазы гемолимфы (АлАТ) у *A. astacus* была на треть выше, чем у *P. leptodactylus*. Другие субстратные показатели крови изменялись заметнее: средняя концентрация глюкозы в гемолимфе у *A. astacus* превышала аналогичный показатель у особей *P. leptodactylus* на 64 %, а активность щелочной фосфатазы (ЩФ) оказалась почти в 5 раз ниже.

Фагоцитами у раков являются агранулоцитарные и полуагранулоцитарные гемоциты. Кроме того, способностью к фагоцитозу обладают так называемые прозрачные клетки (предположительно ювенильные формы) (9). Наблюдения показали, что в среднем фагоцитарный резерв у особей двух видов раков примерно одинаков.

Особенности гомеостаза рыб. В эволюционной иерархии рыбы располагаются ниже теплокровных животных, соответственно, пределы изменения показателей внутренней среды организма у них шире. На примере карпа, линя и сома обыкновенного (табл. 2) мы показали, что гемопоэз у этих видов происходил примерно одинаково. Лейкопоэз интенсивнее у линя (присутствовали бластные формы лейкоцитов — промиелоциты). За счет палочкоядерных форм доля нейтрофилов была наибольшей у самцов линя (в 2-3 раза выше, чем в других группах). Эозинофилы отсутствовали у всех видов рыб, базофилы — у самок линя и сома обыкновенного (у самок карпа имелись в незначительном количестве).

2. Гематологические показатели у рыб разных видов (*M*±SEM, рыбоводные хозяйства, Волгоградская обл., Чувашская Республика, 2010-2012 годы)

Показатель	Карп *Cyprinus caprio* L.		Линь *Tinca tinca* L.		Сом обыкновенный *Silurus glanis* L.	
	самцы (а) (n =23)	самки (б) (n =10)	самцы (в) (n =7)	самки (г) (n =5)	самцы (д) (n =12)	самки (е) (n =10)
Эритропоэз, %						
Гемоцитобласты, эритробласты	0,3±0,2	0,6±0,2	1,0±0,4	–	0,7±0,4	–
Нормобласты	2,9±0,4	3,4±0,3	2,9±0,1	3,0±0,1	2,7±0,4	3,0±1,4
Базофильные эритроциты	8,6±0,4	9,1±1,1	6,0±3,8	12,1±4,2	11,6±4,0	7,5±0,7
Зрелые эритроциты	88,2±1,5	86,9±1,4	90,1±1,1	84,9±4,3	85,0±4,4	89,5±2,1
Лейкоцитарная формула, %						
Миелобласты	–	–	–	–	–	–
Промиелоциты	–	–	1,0±0,7	2,0±1,4	–	–
Миелоциты	0,8±0,4	1,3±0,5	–	5,7±1,7[а, б]	0,5±0,4[г]	1,0±0,4г
Метамиелоциты	4,0±0,9	4,3±0,4	–	6,2±4,2	3,0±1,4	3,5±0,7
Нейтрофилы:						
палочкоядерные	1,4±0,3	1,0±0,4	6,0±0,2[а, б]	2,0±0,9[в]	0,7±0,5[в]	1,5±0,4[в]
сегментоядерные	1,6±0,4	2,4±0,5	3,2±0,4[а]	4,5±0,1[а, б]	4,3±0,6[а, б]	4,5±0,8[а, б]
всего	3,0±0,3	3,4±0,9	9,2±0,9[а, б]	6,5±0,9[а, б]	5,0±0,8[а]	6,0±1,2[а]
Эозинофилы	–	–	–	–	–	–
Базофилы	0,4±0,2	0,1±0,2	2,3±0,8[а, б]	–	0,3±0,3[в]	–
Моноциты	3,0±0,3	2,2±0,5	2,1±1,1	5,5±3,5	3,3±2,0	2,5±0,7
Лимфоциты	88,8±1,2	88,7±1,3	85,4±4,4	74,1±5,6[а]	87,9±2,3[г]	87,0±2,8
Фагоцитарная активность						
СЦК, ед.	1,81±0,07	1,94±0,05	1,68±0,01[б]	2,05±0,01[в]	1,30±0,15[а, б, в, г]	1,72±0,11[г, д]
Биохимические показатели						
АлАТ, IU/л	40,2±10,5	41,3±12,2	39,6±8,9	32,6±5,9	45,0±4,4	75,1±12,8
АсАТ, IU/л	164±13	133±39	346±18[а, б]	310±40[а, б]	402±12[а, б]	367±29[а, б]
Глюкоза, ммоль/л	3,6±1,2	4,5±1,1	9,4±1,3[а]	6,6±0,5[а]	7,4±1,1[а]	8,1±1,3[а]
КК, IU/л	3896±63	3877±161	3054±18[а, б]	2990±107[а, б]	527±93[а, б, в, г]	1185±430[а, б, в, г]
Лактат, мг/дл	66,9±7,5	68,5±5,7	19,9±4,5[а, б]	19,1±2,7[а, б]	116,2±5,3[а, б, в, г]	121,1±9,8[а, б, в, г]
ЩФ, IU/л	25,5±1,5	17,5±0,5[а]	43,6±4,7[а, б]	56,3±11,4[а, б]	9,9±6,3[а, в, г]	9,3±4,0[а, в, г]
Альбумин, г/дл	11,5±3,4	9,1±1,7	15,2±1,7	14,8±1,4	12,2±0,3	13,7±2,7
Общий белок, г/л	26,8±6,4	22,3±1,7	24,9±3,3	21,5±1,2	29,9±2,5	31,0±5,1
Триглицериды, мг/дл	124±42	105±32	76±33	94±25	271±105	178±25
Холестерин, мг/дл	109±12	118±21	121±39	133±16	134±28	107±26

Примечание. АлАТ и АсАТ — соответственно аланин- и аспартатаминотрансфераза, ЩФ — щелочная фосфатаза, КК — креатинфосфокиназа, СЦК — средний цитохимический коэффициент. Прочерк означает отсутствие данных.

[а, б, в, г, д, е] Буквы в верхнем индексе указывают, различия с показателями в каком варианте статистически значимы при $P < 0,05$.

Количество неферментного катионного белка в лизосомах нейтро-

филов (СЦК) у самок было больше, чем у самцов (у линя и сома различия достоверны). Различия можно объяснить усилением неспецифического клеточного иммунитета у самок. Активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ) самцов у линя и сома была примерно в 3 раза выше, чему карпа, при высокой достоверности различий (для карпа и сома $t = 13,5$). Биологическая роль АсАТ заключается в трансаминировании, имеющем важнейшее значение для энергетического обмена. Установлено, что любые состояния, требующие срочной мобилизации компонентов белка для покрытия энергетических нужд организма, связаны с адаптивным гормонально стимулируемым биосинтезом этого фермента. Полученные результаты свидетельствуют о бóльшей стрессоустойчивости сома и линя в сравнении с карпом. Можно констатировать достоверное повышение (более чем в 3 раза) содержания лактата у карпа и сома по сравнению с линем, что свидетельствует об интенсивном углеводном обмене. В то же время минеральный обмен, судя по активности ЩФ, у самцов линя был интенсивнее в 2-3 раза.

В целом изучаемые клинически здоровые рыбы имели различия в лейкограмме: у линя была больше доля микрофагов (нейтрофилов), что указывает на потенциал фагоцитоза. Фагоцитарная активность этих клеток у самок изучаемых рыб оказалась несколько выше, чем у самцов.

Особенности гомеостаза земноводных (травяная лягушка *Rana temporaria*, гладкая шпорцевая лягушка *Xenopus laevis*). В научной литературе гомеостатические показатели амфибий обсуждаются незаслуженно редко. Наши исследования показали, что число эритроцитов у травяной лягушки колеблется у самцов в пределах 0,12-0,37 млн/мкл, у самок — 0,22-0,39 млн/мкл; лейкоцитов у самцов — 0,14-0,38 млн/мкл, у самок — 0,13-0,47 млн/мкл. Анализ состава лейкоцитов свидетельствовал о том, что у лягушек имелись как гендерные, так и межвидовые различия лейкоцитарной формулы (табл. 3).

3. Гематологические показатели у лягушек разных видов (M±SEM)

Показатель	*Rana temporaria* (травяная)		*Xenopus laevis* (гладкая шпорцевая)	
	самцы (а) (n =10)	самки (б) (n =10)	самцы (n =5)	самки (n =5)
Эритропоэз, %:				
гемоцитобласты, эритробласты	0,8±0,3	0,4±0,4	1,5±2,1	2,1±0,5
нормобласты	2,8±0,6	2,4±0,5	5,0±2,8	0,9±0,3
зрелые эритроциты	96,4±0,7	97,2±0,9	93,5±1,3	97,0±0,6
Лейкоцитарная формула, %:				
метамиелоциты	0,2±0,3	–	–	0,8±0,4
палочкоядерные нейтрофилы	0,2±0,3	0,6±0,4	–	1,2±0,6[а]
сегментоядерные нейтрофилы	12,2±0,9	16,8±1,5[а]	2,7±0,5[а, б]	4,3±0,3[а, б]
всего нейтрофилов	12,4±0,9	17,4±1,5[а]	2,7±0,5[а, б]	5,5±0,4[а, б]
эозинофилы	3,0±0,7	3,2±0,9	1,8±0,4	0,9±0,4[а, б]
базофилы	–	0,4±0,4	0,5±0,7	–
моноциты	2,8±0,5	2,0±0,4	2,6±0,8	2,2±0,5
лимфоциты	81,6±1,0	77,0±1,7	92,4±0,8[а, б]	90,6±1,2[а, б]
БА, ед.	1,78±0,27	1,78±0,24	2,02±0,06	1,74±1,20

Примечание. БА — бактерицидная активность нейтрофилов крови. Травяные лягушки были взяты из природных акваценозов (Московская обл., 2014 год), шпорцевые — выращены в аквариальных условиях. Прочерк означает, что показатель находится за пределами чувствительности прибора.

[а, б] Буквы в верхнем индексе указывают, различия с показателями в каком варианте статистически значимы при $P < 0,05$.

В крови самцов травяной и самок гладкой шпорцевой лягушек были обнаружены метамиелоциты. По числу палочкоядерных нейтрофилов самки вида *Xenopus laevis* на 67 % превосходили самцов. Доля сегментоядерных нейтрофилов у травяной лягушки более чем в 4 раза превышала таковую у гладкой шпорцевой. Гендерные вариации по числу сегментоядерных клеток выглядели следующим образом: их было соответственно на 27 и 33 % меньше у самцов травяной и гладкой шпорцевой лягушек,

чем у самок. У самцов и самок травяной лягушки доля эозинофилов в гранулоцитарном ряду белой крови оказалась сопоставима, а у самок гладкой шпорцевой лягушки изучаемый показатель был достоверно ниже. Количество лимфоцитов крови у *Rana temporaria* было достоверно меньше, чем у *Xenopus laevis*. У травяной лягушки СЦК нейтрофилов самцов и самок имел примерно одинаковые значения, у шпорцевой — у самцов оказался на 22 % выше, чем у самок.

4. Биохимические показатели крови у самцов и самок травяной лягушки *Rana temporaria* из природных акваценозов (*M*±SEM, Московская обл., 2014 год)

Показатель	Самцы (а) (n =10)	Самки (n =10)
АлАТ, IU/л	164±36	174±33
АсАТ, IU/л	88±29	109±36
Глюкоза, ммоль/л	0,8±0,3	1,4±0,2
КК, IU/л	985±159	1388±362
Креатинин, мкмоль/л	46±10	47±5
ЛДГ, IU/л	3798±417	3430±220
Лактат, мг/дл	49±16	52±6
Мочевая кислота, мкмоль/л	262±110	377±151
ЩФ, IU/л	28±16	69±45
Альбумин, г/дл	21±2	25±0,5
Мочевина, мг/дл	48±2	56±1[a]
Общий белок, г/л	24±6	34±2
Триглицериды, мг/дл	3±1	11±6
Холестерол, мг/дл	57±11	85±18
Гемоглобин, г/л	93±15	172±6[a]

Примечание. АлАТ и АсАТ — соответственно аланин- и аспартатаминотрансфераза, КК — креатинфосфокиназа, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, ЩФ — щелочная фосфатаза.

[a] Буквы в верхнем индексе указывают, что различия с показателями у самцов статистически значимы при $P < 0,05$.

Объем крови у амфибий небольшой, что осложняет ее биохимические исследования. Поэтому нам удалось определить лишь некоторые показатели (табл. 4). У *Rana temporaria* имелись половые различия: у самок бóльшая, чем у самцов, активность АлАТ и АсАТ (соответственно на 6 и 19 %), креатинкиназы (на 29 %) и щелочной фосфатазы (на 60 %).

Важную роль в энергетическом обмене животных играет глюкоза, которая представляет собой конечный продукт гидролиза и обеспечивает метаболические реакции организма. Интересно, что у самок травяной лягушки (по сравнению с другими изученными нами видами) этот показатель в наибольшей степени превышал таковой у самцов — на 43 %. Возможно, что выявленное почти 2-кратное превышение содержания глюкозы у самок относительно самцов вызвано большей зависимостью самок от физических факторов среды, особенно в периоды размножения, что делает этот показатель наиболее значимым. Кроме того, обращает на себя внимание превосходство самок земноводных над самцами и по таким биохимическим показателям крови, как содержанием креатинина, лактата, мочевой кислоты, альбумина, мочевины и общего белка (на 30 %).

Гендерная особенность липидного обмена амфибий изучаемого вида заключалась в преобладание липидных метаболитов в крови самок (триглицеридов больше на 68 %, холестерола — на 33 %) по сравнению с самцами. В целом все остальные биохимические показатели крови, за исключением активности лактатдегидрогеназы, у самок травяной лягушки выше таковых у самцов.

В отношении выявленных нами межвидовых различий у амфибий следует отметить, что содержание сегментоядерных клеток в крови самцов и самок травяной лягушки (см. табл. 3) превышало аналогичные показатели у гладкой шпорцевой лягушки соответственно на 78 и 76 %, число нейтрофилов — на 78 и 71 %, эозинофилов — на 40 и 69 %. Число эритробластов в крови самцов и самок гладкой шпорцевой лягушки по сравнению с травяной оказалось больше на 47 и 80 %. Содержание нормобластов у самцов травяной лягушки было на 44 % ниже, чем у самцов гладкой шпорцевой лягушки. По числу палочкоядерных, сегментоядерных нейтрофилов, их сумме и числу эозинофилов самки травяной лягушки

превосходили самок гладкой шпорцевой соответственно на 67; 76; 71 и 69 %. Число палочкоядерных нейтрофилов у самцов вида *Xenopus laevis* превышало такое у особей вида *Rana temporaria* на 80 %. У самцов и самок вида *Rana temporaria* доля эозинофилов была соответственно на 44 и 67 % выше, чем у животных вида *Xenopus laevis*.

Межвидовые различия по числу лимфоцитов белой крови у изучаемых представителей земноводных оказались не так очевидны. По содержанию этих агранулоцитов самцы *Xenopus laevis* незначительно превосходили самцов *Rana temporaria*. Данные по числу лимфоцитов у самок и самцов оказались аналогичными. Однако в среднем у вида *Rana temporaria* число лимфоцитов в крови было недостоверно (на 15 %) выше, чем у особей вида *Xenopus laevis*. По среднему цитохимическому коэффициенту представители травяной и гладкой шпорцевой лягушки достоверно не различались между собой.

Таким образом, у исследованных видов амфибий есть значимые видовые и гендерные различия по гомеостатическим показателям, что отражает особенности адаптации этих животных к жизни в разных биотопах.

Следует отметить, что представители ракообразных, рыб и земноводных имеют ряд общих гомеостатических признаков, несмотря на большую эволюционную удаленность. Клеточный состав циркулирующих жидкостей представлен гранулярными, агранулярными и ювенильными формами. Гемоцитарная формула речных раков разных видов содержит определенные нами четыре типа гемоцитов в близком процентном соотношении. Лейкограмма изучаемых нами низших позвоночных гидробионтов имеет как сходство, так и некоторые различия по доле разных типов лейкоцитов; интенсивность эритропоэза у них примерно одинакова. Биохимия внутренней среды у представителей этих разных таксонов также довольно сходна: в составе гемолимфы речных раков, а также плазмы крови рыб и земноводных мы обнаружили глюкозу, белки, триглицериды в сопоставимых количествах.

Итак, у изученных гидробионтов нами установлены следующие значения показателей гомеостаза, которые можно принять в качестве критериев адаптированности животных к условиям обитания, а также устойчивости природных биоценозов и адекватности условий содержания в аквакультуре: у раков — общее число клеток в гемолимфе в пределах 700-800 кл/мкл; у рыб и лягушек число число эритроцитов 1-2 млн/мкл, лейкоцитов 50-150 тыс/мкл; содержание общего белка в плазме крови позвоночных гидробионтов — 2-3 %, глюкозы — 1-4 ммоль/л, триглицеридов — 0-400 мг%; средний цитохимический коэффициент содержания неферментного катионного белка в лизосомах фагоцитирующих клеток — в пределах 1,5-2,1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лавровский В.В. Мировая аквакультура (статистические данные). *Рыбоводство и рыболовство*, 2000, 2: 18-19.
2. Houlahan J.E., Findlay C.S., Schmidt B.R., Meyer A.H., Kuzmin S.L. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, 2000, 404: 752-755 (doi: 10.1038/35008052).
3. Кейстер И.А. Морфологический состав крови ряпушки и ее изменения как биоиндикационные показатели условий обитания в Белом озере (Вологодская область). *Экология животных*, 2009, 3: 117-125.
4. Spicer J.I., Taylor A.C. Oxygen-binding by haemocyanins from an ecological series of amphipod crustaceans. *Marine Biology*, 1994, 120(2): 231-237.
5. 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): 243-248.
6. Söderhäll K., Johansson M.W., Smith V.J. Internal defense mechanisms. In: *Freshwater crayfish: Biology, management and exploitation* /D.M Holdich, R.S. Lowery (eds.). Croom Helm, London, 1988: 213-235.
7. Johansson M.W., Keyser P., Sritunyalucksana K., Söderhäll K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 2000, 199(1-3): 45-52 (doi: 10.1016/S0044-8486(00)00418-X).
8. Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Ревякин А.О. Сравнительная оценка речных раков разных видов по биохимическим и гематологическим показателям. *Известия Оренбургского ГАУ*, 2009, 4(24): 186-189.
9. Пронина Г.И., Корягина Н.Ю. Влияние неблагоприятных факторов водной среды на состояние клеточного иммунитета речных раков по фагоцитарной активности их гемоцитов. *Известия Оренбургского ГАУ*, 2010, 3(27): 251-253.
10. Chisholm J.R.S., Smith Valerie J. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. *Comp. Biochem. Phys. A*, 1995, 110(1): 39-45.
11. Söderhäll K., Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 1998, 10(1): 23-28 (doi: 10.1016/S0952-7915(98)80026-5).
12. Johansson M.W., Soderhall K. The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 1996, 15: 46-66.
13. Головина Н.А., Тромбицкий И.Д. *Гематология прудовых рыб.* Кишинев, 1989.
14. Chaga O., Lignell M., Söderhäll K. The haemopoietic cells of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus. Anim. Biol.*, 1995, 4: 59-70.
15. Pickering A.D. Introduction: the concept of biological stress. In: *Stress and fish.* Acad. Press, London-NY, 1993: 1-9.
16. Van Rooij J.M., Videler J.J. Estimating oxygen uptake rate from ventilation frequency in the reef fish *Sparisoma viride. Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1996, 132(1-3): 31-41.
17. Иванова Н.Т. *Атлас клеток крови рыб (сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб).* М., 1983.
18. Аминева В.А., Яржомбек А.А. *Физиология рыб.* М., 1984.
19. Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. *Эволюция крови*. Ростов-на-Дону, 2001.
20. Rey Vazquez G., Guerrero G.A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (*Teleostei, Perciformes*). *Tissue Cell*, 2007, 39(3): 151-160 (doi: 10.1016/j.tice.2007.02.004).
21. Hutchins M. *Grzimek's animal life encyclopedia. Vol. 6: Amphibians.* Gale Group, Farmington Hills, 2003.
22. Bagnara T.J., Larsen L.O., Elkan E., Rafferty K.A. Jr., Coopre E.L., Oksche A., Veck M., Ingle D., Capranica R.R., Dodd M.H.I., Dodd J.M. *Physiology of the Amphibia. V. 3* /B. Lofts (ed.). Academic Press, Inc., NY, 2012 (ISBN: 0-12-455403-2).
23. Wei J., Li Y.-Y., Wei L., Ding G.-H., Fan X.-L., Lin Z.H. Evolution of erythrocyte morphology in amphibians (*Amphibia*: *Anura*). *Zoologia (Curitiba)*, 32(5): 360-370 (doi: 10.1590/S1984-46702015000500005).
24. Arikan H., Çiçek K. Haematology of amphibians and reptiles: a review. *North-West. J. Zool.*, 2014, 10(1): 190-209.
25. Любин Н.А., Конова Л.Б. *Методические рекомендации к определению и выведению гемограммы у сельскохозяйственных и лабораторных животных при патологиях.* Ульяновск, 2005.
26. Иванов А.А., Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Петрушин А.Б. *Клиническая лабораторная диагностика в аквакультур*е. М., 2013: 6-34.
27. Шубич М.Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего. *Цитология*, 1974, 10: 1321-1322.
28. Пронина Г.И. Использование цитохимических методов для определения фагоцитарной активности клеток крови или гемолимфы разных видов гидробионтов для оценки состояния их здоровья, *Известия Оренбургского ГАУ*, 2008, 4(20): 160-163.

[1]ГБУ Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии, филиал Клиника им. В.Г. Короленко,
107106 Россия, г. Москва, ул. Короленко, 3,
e-mail: adjiev-dd@mail.ru ✉, clin.korolenko@mail.ru;
[2]ФГБНУ Всероссийский НИИ ирригационного рыбоводства,
142460 Россия, Московская обл., Ногинский р-н, пос. им. Воровского,
e-mail: gidrobiont4@mail.ru;
[3]ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет—МСХА им. К.А. Тимирязева,
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
e-mail: ayvanov@timacad.ru, fomich52@gmail.com

Поступила в редакцию 12 мая 2016 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2018, V. 53, № 2, pp. 337-347

FUNCTIONAL INDICATORS OF POIKILOTHERMIC AQUATIC SPECIES FROM NATURAL AND ARTIFICIAL WATER BIOCENOSES

D.D. Adzhiev[1], G.I. Pronina[2], A.A. Ivanov[3], N.Yu. Koriagina[2]

[1]*Moscow Center for Dermatovenerology and Cosmetology, V.G. Korolenko Clinic (Branch),* 3, ul. Korolenko, Moscow, 107106 Russia, e-mail adjiev-dd@mail.ru (✉ corresponding author), clin.korolenko@mail.ru;
[2]*All-Russian Research Institute of Fishery Irrigation,* Federal Agency of Scientific Organizations, pos. im. Vorovskogo, Noginskii Region, Moscow Province, 107106 Russia, e-mail gidrobiont4@mail.ru;
[3]*Timiryazev Russian State Agrarian University—Moscow Agrarian Academy,* 49, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail ayvanov@timacad.ru, fomich52@gmail.com
ORCID:
Adzhiev D.D. orcid.org/0000-0001-6789-4086
Pronina G.I. orcid.org/0000-0002-0805-6784
Koriagina N.Yu. orcid.org/0000-0001-8556-2202
Ivanov A.A. orcid.org/0000-0003-1436-510X
Received May 12, 2016
doi: 10.15389/agrobiology.2018.2.337eng

Abstract

For assessment of sustainability of natural biocenoses and the physiological and immunological state of hydrobionts in aquaculture, it is necessary to know functional parameters of circulating liquids in hydrobionts of different taxonomic groups. The purpose of this study was to analyze the limits of the main indicators of homeostasis in aquatic animals and fish from natural water bodies, i.e. crayfish (*Astacus astacus* and *Pontastacus leptodactylus*), fish (carp Cyprinus caprio L., tench *Tinca tinca* L. and catfish *Silurus glanis* L.), and amphibians (frogs *Rana temporaria* and *Xenopus laevis*). Here, here is the first report on hematologic, cytochemical, biochemical indicators for these species which inhabits natural water bodies or are artificially grown in the conditions of Moscow and Pskov provinces and Chuvashiya region. Hematological investigations included differential count of blood cells of fishes and amphibians in smears stained by the Pappengeim technique; hemolymph of river crayfish was examined in Goryaev chamber. Immunological parameters were evaluated by cytochemical method as an average cytochemical coefficient (CCC) of lysosomal cationic protein in fish blood neutrophils and crayfish haemocytes in the reaction with Bromphenol blue. Biochemical parameters were assessed in blood serum using a biochemical analyzer Chem Well (Awarenes Technology, Inc., USA). The reference constants of homeostasis we found are as follows: the total number of cells in crayfish hemolymph of 700 to 800 per 1 μl; the number of red blood cells in fish of 1-2 million/μl, blood leukocytes in fish of 50-150 thousand per 1 μl. Interspecific differences in haemocyte patterns between *Astacus astacus* and *Pontastacus leptodactylus* were not revealed. Biochemical differences were as follows: glucose concentration in the *Astacus astacus* hemolymph was 64 % higher compared to that in *Pontastacus leptodactylus* whereas the alkaline phosphatase activity was almost 71 % lower. Agranular and semi-agranular haemocytes, along with juvenile forms that we called transparent cells, serve as phagocytes in crayfish. In healthy crayfish, phagocytic activity of these cells, as estimated by the average cytochemical coefficient of the lysosomal cationic protein level, was approximately the same and ranged from 1.5 to 2.0. In fish, we found gender and species-related differences of homeostatic constants. The presence of promyelocytes, the blast forms of leukocytes, in *Tinca tinca* was indicative of more intensive leukopoiesis. The percentage of neutrophils was higher in male *Tinca tinca* due to 2- to 3-fold number of band neutrophils compared to other groups. The level of non-enzyme cationic protein in the lysosomes of neutrophils of female carp, tench and catfish were higher compared to male individuals. The activity of aspartate aminotransferase (AST) in male tench and catfish was almost 3 times higher than that in carp. The carbohydrate metabolism in carp and catfish, in terms of lactate concentration, was more than 3 times higher compared to tench. Among the studied amphibians, we observed interspecific and gender differences. The proportion of segmented neutrophils in *Rana temporaria* was more than 4 times higher than that of *Xenopus laevis.* Gender variations in the number of segmented cells were as follows: the cell number in male *Rana temporaria* and *Xenopus laevis* were 27 and 33 % lower than that of females. The blood lymphocyte counts in *Rana temporaria* were significantly lower than that in *Xenopus laevis.* We found gender differences of *Rana temporaria* on biochemical parameters. As compared to the males, the female *Rana temporaria* showed higher activity of ALT and AST (by 6 and 19 %, respectively), creatine kinase (by 29 %), and alkaline phosphatase (by 60 %). The total blood protein content in amphibians was 2-3 %, blood glucose averaged 1-4 mmol/l, triglycerides varied from 0 to 400 mg%. It is proposed to use parameters of aquatic organisms' homeostasis for ecological monitoring of natural and artificial water biocenoses.

Keywords: natural and artificial water biocenosis, aquatic animals, lower vertebrates, crayfish, *Astacus astacus*, *Pontastacus leptodactylus*, fish, *Cyprinus caprio*, *Tinca tinca*; *Silurus glanis*, amphibians, *Rana temporaria*, *Xenopus laevis*, homeostasis.