

**ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО И ТРАНСПОРТНОГО СТРЕССОВ НА
КЛЕТОЧНЫЕ И ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА
СТЕРЛЯДИ *ACIPENSER RUTHENUS***

© 2011 г. Т.А. Суворова, Л.В. Балабанова, Н.И. Силкина

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

Поступила в редакцию 16.12.2010 г.

Окончательный вариант получен 07.04.2011 г.

Приведены результаты сравнительного анализа показателей клеточного и гуморального иммунитета под воздействием гормона дексаметазон-фосфата и транспортировки. Показано, что у стерляди при исследуемых воздействиях изменяется иммунный статус. Интенсивность и направленность происходящих в иммунной системе изменений определяются временем и природой стресс-фактора.

Ключевые слова: рыба, стерлядь, иммунитет, дексаметазон-фосфат, транспортировка.

ВВЕДЕНИЕ

В условиях искусственного воспроизводства рыбы часто подвергаются воздействию различных по природе стресс-факторов. Любая стрессовая реакция сопровождается активацией синтеза хромаффинными и интерреналовыми клетками гормонов стресса: катехоламинов и кортизола и его производных (Баюнова и др., 2000; Селье, 1960). Исследованиями на позвоночных установлено, что при стрессах кортизол и его производные являются одними из основных гормонов, осуществляющих повреждение структуры и функции иммунной системы. Кортизол и его производные вызывают лизис тимико-лимфоидной ткани, активацию аутоиммунных процессов, лимфопению, нейтрофилию, подавление специфического и неспецифического иммунного ответа и увеличение восприимчивости животных, в том числе и рыб, к заболеваниям (Горизонтов, 1981; Розен, 1994; Д.В. Микряков, 2004). Мишенью гормонов стресса служит лимфоидная ткань, а на уровне клеток – лимфоциты, являющиеся основными клетками иммунной системы. Лимфоциты осуществляют распознавание и разрушение антигенов, синтез антител и медиаторов иммунного ответа, регуляцию взаимодействия между нейроэндокринной и иммунной системами, обеспечение индивидуальной целостности организма, оптимального роста, развития, процессов регенерации и формирования адаптивного иммунитета и т.д. (В.Р. Микряков, Балабанова, 1979; Кондратьева и др., 2001; Van Muiswinkel, Vervoorn-Van Der Wal, 2006).

Одной из важных технологических операций в рыбоводном хозяйстве является транспортировка. Перевозка оказывает стрессирующее воздействие на рыб, вызывая повышение концентрации глюкокортикоидных гормонов (Barton et al., 1980), глюкозы (Wardle, 1972), приводя к сдвигу гематологических параметров (Fletcher, 1986), дестабилизации структурной организации состава лейкоцитов (Терещенко и др., 2007), инволюции иммунокомпетентных органов, изменению содержания антиоксидантов и накоплению продуктов перекисного окисления липидов (Силкина и др., 2006), снижению иммунитета к инфекционным и инвазионным болезням (Ведемейер и др., 1981) и т.д.

Ранее сотрудниками нашей лаборатории было показано, что под влиянием аналога кортизола и перевозки у карасей *Carassius carassius* и карпов *Ciprinus carpio* происходит дестабилизация процессов лейкопоэза: подавляется лимфопоэз, а миелопоэз активизируется. Показана зависимость интенсивности происходящих в составе лейкоцитов изменений от содержания в органах иммунной системы гормончувствительных и гормонрезистентных лимфоцитов (Д.В. Микряков, В.Р. Микряков, 2005; В.Р. Микряков и др., 2007). Исходя из этого, представляло интерес изучить влияние гормонального и транспортного стрессов на клеточные и гуморальные факторы иммунитета стерляди *Acipenser ruthenus*.

Целью работы было обобщение результатов экспериментальных исследований по влиянию различных по происхождению стресс-факторов на гуморальные и клеточные факторы иммунитета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была проведена в лаборатории иммунологии ИБВВ РАН. Объектом исследования служила стерлядь в возрасте 2+ средней массой 250-300 г, средняя длина тела составляла 38-40 см. Всего была исследована 51 особь, по 4-5 экз. в каждой пробе. На протяжении опыта рыб содержали в аквариумах при температуре воды 16-18 °С. В емкостях была обеспечена аэрация и механическая фильтрация воды. Условия содержания и кормления были стабильными в течение всего периода наблюдения.

В качестве гормонального препарата был использован дексаметазон-фосфат фирмы КРКА, Novo mesto, Slovenia. Дексаметазон-фосфат – синтетический аналог природного гормона стресса кортизола, отличающегося от него прочностью связи со специфическими гормонсвязывающими рецепторами клеток-мишеней (Шрейбер, 1987), который широко используется при исследовании процессов реализации иммунологических функций при стрессах. Обработку рыб гормоном проводили путем парентеральных инъекций в дозе 0,2 мл, или 0,8 мг активного вещества дексаметазон-фосфата на особь, что соответствует уровню кортизола стрессированных осетровых рыб (Баюнова и др., 2000).

Влияние транспортного стресса оценивали после перевозки стерляди в течение 10 ч. из тепловодного хозяйства «Кадуй» Вологодской области до экспериментальной аквариальной ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН в пластиковых мешках. Материал для исследований собирали через 1, 3, 7, 14 и 21 сут. после введения гормона и начала перевозки. Контролем служили данные, полученные до начала опытов.

О влиянии дексаметазон-фосфата и перевозки на клеточные факторы судили по данным анализа содержания завершивших процесс дифференцировки лейкоцитов в лейкограммах периферической крови. Состав лейкоцитов определяли в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимза. В каждом мазке определяли процентный состав лимфоцитов, палочко- и сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов и бластных форм клеток под световым микроскопом МБИ-15 (окуляр х7; объектив х90), просчитывая по 200 клеток. Гуморальное звено иммунитета стерляди оценивали по данным анализа бактериостатических свойств сыворотки крови (БАСК), которая отражает функциональное состояние иммунной защиты или естественной резистентности. БАСК определяли методом фотонейфелометрического колориметрирования согласно методике, адаптированной

для рыб (В.Р. Микряков, 1991). Опыты по определению БАСК ставили на 3-5 сутки от момента отбора крови.

Результаты исследований подвергали статистической обработке при помощи стандартного пакета программ (приложение Statistica 6.0) с использованием t-теста при уровне значимости 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ лейкограмм опытных и контрольных рыб показал, что стерлядь, отличающаяся от рыб других семейств составом лейкоцитов, особенностями структурно-функциональной организации и топографией расположения кроветворных и иммунокомпетентных тканей и органов (Горышина, Чага, 1990; Флоренсов, Пестова, 1990; Fange, 1986), на введение гормона стресса и транспортировку реагировала изменением количественных характеристик разных по функциональному значению клеток и размахом изменчивости исследуемых показателей (табл. 1, 2).

Таблица 1. Содержание лейкоцитов в периферической крови стерляди после гормонального воздействия, %.

Table 1. The maintenance of leukocytes in peripheral blood of a sterlet after hormonal influence, %.

| Время, сут. | Лимфоциты | Моноциты | Нейтрофилы | | Эозинофилы | Бластные формы |
|-------------|------------|-----------|------------|------------|------------|----------------|
| | | | ПЯ | СЯ | | |
| Контроль | 74,5±1,21 | 2,3±0,33 | 5,8±0,75 | 6,5±0,74 | 1,7±0,56 | 9,2±1,55 |
| 1 | 46,1±3,29* | 4,1±0,43* | 34,2±3,39* | 11,1±1,13* | 0,5±0,15 | 4,0±0,31* |
| 3 | 45,8±2,53* | 5,2±0,58* | 28,0±3,16* | 15,5±1,82* | 0,2±0,12* | 5,3±0,43* |
| 7 | 43,7±3,25* | 5,4±0,48* | 22,3±1,47* | 22,4±2,75* | 0,6±0,18 | 5,6±1,07 |
| 14 | 56,5±4,53* | 3,8±0,66 | 8,6±2,33 | 25,3±4,91* | 0,6±0,33 | 5,0±1,25 |
| 21 | 69,5±1,79* | 3,2±0,62 | 7,3±0,96 | 11,1±1,43* | 2,0±1,06 | 6,7±0,14 |

Примечание: здесь и далее в табл.: ПЯ – палочкоядерные, СЯ – сегментоядерные; * отмечены достоверные отличия от контроля.

Note: hereinafter in tab.: ПЯ – banded, СЯ – segmented; * authentic differences from the control are noted.

Таблица 2. Содержание лейкоцитов в периферической крови стерляди после транспортировки, %.

Table 2. The maintenance of leukocytes in peripheral blood of a sterlet after transportation, %.

| Время, сут. | Лимфоциты | Моноциты | Нейтрофилы | | Эозинофилы | Бластные формы |
|-------------|------------|-----------|------------|------------|------------|----------------|
| | | | ПЯ | СЯ | | |
| Контроль | 74,5±1,21 | 2,3±0,33 | 5,8±0,75 | 6,5±0,74 | 1,7±0,56 | 9,2±1,55 |
| 1 сут | 42,3±3,86* | 4,0±0,41* | 35,0±4,28* | 12,3±0,99* | 0,4±0,18 | 6,0±1,59 |
| 3 сут | 68,6±2,49 | 3,4±0,29* | 16,2±1,88* | 8,5±1,27 | 0,7±0,30 | 2,6±0,36* |
| 7 сут | 69,3±2,13 | 3,4±0,29* | 12,2±1,17* | 9,1±1,69 | 0,8±0,25 | 5,2±0,60* |
| 14 сут | 71,7±1,94 | 2,7±0,32 | 9,7±0,85* | 9,2±1,04 | 1,7±0,59 | 4,8±0,65 |
| 21 сут | 75,1±1,65 | 3,1±0,55 | 5,6±0,51 | 6,0±1,06 | 2,7±0,75 | 7,3±0,42 |

У опытной стерляди при гормональном воздействии отмечено снижение доли содержания лимфоцитов, эозинофилов и бластных форм клеток и повышение количества нейтрофилов и моноцитов (табл. 1). По уровню содержания лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов опытные рыбы по сравнению с контрольными достоверно отличались во все сроки наблюдения. Различия между опытными и контрольными особями по величине содержания палочкоядерных нейтрофилов и моноцитов выявлены через 1, 3 и 7 суток, эозинофилов – через 3 суток, бластных форм – через 1 и 3 сутки наблюдения. Также следует отметить, что на 1-е и 3-и

сутки опыта процентное содержание палочкоядерных нейтрофилов было в 2-3 раза выше, чем сегментоядерных нейтрофилов. На 7-е сутки количественные показатели этих клеток у опытных и контрольных рыб не отличались, а в последующие сроки количество сегментоядерных нейтрофилов у опытных особей превышало содержание палочкоядерных у контрольных.

В лейкограммах периферической крови рыб после транспортировки основные изменения зафиксированы в течение первой недели: лимфо- и эозинопения, моноцито- и нейтрофилия и уменьшение количества бластных форм клеток (табл. 2). В конце срока наблюдения достоверные различия между количественными характеристиками лейкоцитов в лейкограммах сравниваемых групп уже отсутствовали.

Анализ показателя БАСК свидетельствует, что исследуемые рыбы на транспортировку и введение гормона реагировали неоднозначно (табл. 3). На первых этапах опыта дексаметазон-фосфат приводил к повышению уровня БАСК в организме стерляди. Достоверное увеличение показателя до 36% по сравнению с 29% в контроле отмечено через трое суток после введения гормона. Однако через 7 сут. и в последующие сроки наблюдения величины БАСК резко снижались до 1,3-1,8%.

Таблица 3. Уровень БАСК стерляди после транспортировки и гормонального воздействия, %.
Table 3. Level the BASCK of a sterlet after transportation and hormonal influence, %.

| Дата отбора проб | Транспортировка | Гормон |
|-------------------|-----------------|------------|
| Контроль до опыта | 29,0±1,04 | 29,0±1,04 |
| Через 1 сут. | 28,8±1,28 | 33,0±0,44* |
| Через 3 сут. | 27,2±1,01 | 36,0±0,89* |
| Через 7 сут. | 16,2±2,69* | 1,8±1,20* |
| Через 14 сут. | 12,0±1,22* | 1,3±1,25* |
| Через 21 сут. | 8,5±1,25* | 1,3±1,25* |

После перевозки БАСК снижалась относительно контрольных показателей: через неделю зафиксировано достоверное отличие от контроля, а на 21 сут. отмечены самые низкие показатели. Тенденции к стабилизации показателей до конца опыта у стерляди не было.

Установленные изменения свидетельствуют о подавлении защитной функции сыворотки крови. Это скорее всего связано с тем, что стрессовая реакция у рыб, как и у высших позвоночных, сопровождается активацией синтеза гормона стресса – кортизола, подавляющего функции гуморального и клеточного звена иммунной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, стерлядь на введение аналога кортизола и перевозку реагирует изменением иммунного статуса. Меняются количественные характеристики лейкоцитов: число агранулоцитов снижается, гранулоцитов – возрастает. Показатели лейкограмм рыб после транспортировки к концу наблюдения возвращались к контрольным, а после инъекции гормона на протяжении опыта оставались необратимыми. Под влиянием транспортного стресса подавляется активность неспецифических факторов гуморального иммунитета: снижается функция антимикробных свойств сыворотки крови. Процессы, происходящие в иммунной системе при исследуемых стрессовых воздействиях,

отражают развитие общего адаптационного синдрома по Селье (Селье, 1960): на первых этапах рыбы реагируют дестабилизацией структурно-функционального состояния, затем наступает период стабилизации, а на последнем этапе происходит либо процесс восстановления иммунного статуса, либо его необратимое нарушение. Интенсивность и направленность происходящих в иммунной системе изменений определяется временем и природой стресс-фактора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баянова Л.В., Баранникова И.А., Дюбин В.П., Семенова Т.Б. Гормональные характеристики осетровых в условиях стресса. Междунар. конф. «Осетровые на рубеже 21 века»: Тезисы докладов. Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2000. С. 122-123.
- Ведемейер Г.А., Мейер Ф.П., Смит Л. Стресс и болезни рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. 128 с.
- Горизонтов П.Д. Гомеостаз. М.: Медицина, 1981. С. 538-570.
- Горышина Е.Н., Чага О.Ю. Сравнительная гистология тканей внутренней среды с основами иммунологии; учеб. пособие / Под ред. А.А. Заварзина. Л.: Изд-во Ленингр. Университета, 1990. 320 с.
- Кондратьева И.А., Киташова А.А., Ланге М.А. Современные представления об иммунной системе рыб // Вест. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2001. №4. С. 11-20.
- Микряков Д.В. Влияние некоторых кортикостероидных гормонов на структуру и функцию иммунной системы рыб: Автореф. диссерт. на соиск. уч. степени кандидата биол. наук. М., 2004. 24 с.
- Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние гормона стресса кортизона на лейкоциты крови карася *Carassius carassius* L. // Биология внутренних вод. 2005. №4. С. 90-94.
- Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск, 1991. 153 с.
- Микряков В.Р., Балабанова Л.В. Клеточные основы иммунитета у рыб. Сб. Физиология и паразитология пресноводных животных. Л.: Наука, 1979. С. 57-64.
- Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Микряков Д.В. Влияние транспортировки на состав лейкоцитов периферической крови карпа *Cyprinus carpio* // Вопросы рыболовства. 2007. Т. 8. №2(30). С. 209-214.
- Розен В.Б. Основы эндокринологии. М.: Изд-во МГУ, 1994. 384 с.
- Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М.: Медгиз, 1960. 254 с.
- Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Механизм действия аналога кортизона на окислительные процессы при адаптации рыб к стресс-факторам. Сб. мат. II Всерос. науч. конф. Принципы и способы сохранения биоразнообразия. 28-31 января 2006 г. Йошкар-Ола, 2006. С. 332-333.
- Тереженко В.Г., Балабанова Л.В., Микряков В.Р. Сравнительный анализ влияния гормона стресса и транспортировки на структурную организацию лейкоцитов различных видов рыб // Расширенные мат-лы междунар. научно-практ. конф. Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. Борок-Москва, 17-20 июля 2007 г. М.: Россельхозакадемия, 2007. С. 278-283.
- Флоренсов В.А., Пестова И.М. Очерки эволюционной иммуноморфологии. Иркутск: ИГУ, 1990. 244 с.
- Шрейбер В. Патология желез внутренней секреции. Прага: Авиценум, 1987. 493 с.

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.

Fange R. Lymphoid organs in sturgeons (Acipenseridae) // Vet. Immunol. and Immunopathol. 1986. V. 12. №4. Pp. 153-161.

Fletcher T.C. Modulation of nonspecific host defenses in fish // Vet. Immunol. and Immunopathol. 1986. №1-4. Pp. 59-67.

Van Muiswinkel W., Vervoorn-Van Der Wal B. The immune system of fish // Fish Diseases and Disorders. 2006. V. 1. Pp. 678-701.

Wardle C.S. The changes in blood glucose in *Pleuronectes platessa* following capture from the wild: a stress reaction // J. Mar. Biol. Ass. U.K. 1972. V. 52. №3. Pp. 561-635.

INFLUENCE OF HORMONAL AND TRANSPORT STRESSES ON CELLULAR AND HUMORAL FACTORS OF IMMUNITY OF STERLET *ACIPENSER RUTHENUS*

© 2011 y. T.A. Suvorova, L.V. Balabanova, N.I. Silkina

*I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences,
Borok, Yaroslavl province*

Results of the comparative analysis of indicators cellular and humoral immunity under the influence of a dexamethasone-phosphate and transportation hormone are resulted. It is shown, that at a sterlet at investigated influences the immune status changes. Intensity and an orientation of changes occurring in immune system is defined by time and the stress-factor nature.

Key words: fish, a sterlet, immunity, dexamethasone-phosphate, transportation.