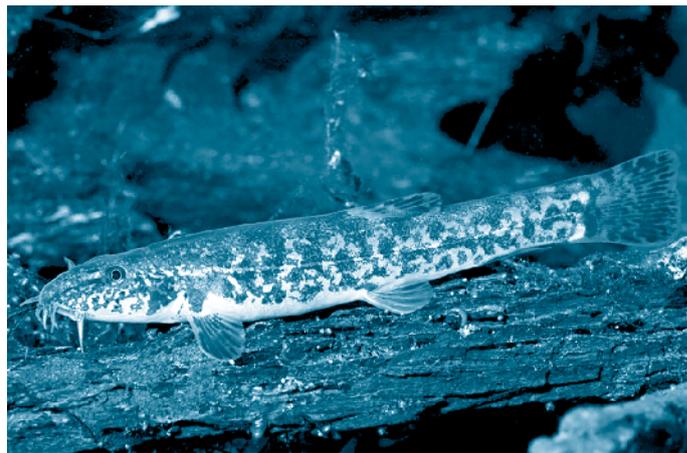


ВЛИЯНИЕ ИОНОВ кадмия на МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ **УСАТОГО ГОЛЬЦА** *Barbatula barbatula* (L.)

Рассматриваются результаты исследования действия ионов кадмия на иммунофизиологические показатели усатого гольца в хроническом эксперименте.

Полученные данные свидетельствуют о проявлении неспецифической стрессовой реакции, затрагивающей как клеточное, так и гуморальное звенья иммунитета. На ультраструктурном уровне выявлены изменения лейкоцитов, приводящие к гибели клеток уже на ранних сроках воздействия.



Введение

В последние десятилетия индустриализация идет все более высокими темпами, при этом ускоряется и деградация окружающей среды, вызванная антропогенным влиянием. Одними из приоритетных загрязняющих веществ водных экосистем считаются соли тяжелых металлов, из которых, в свою очередь, наиболее токсичными признаны соединения ртути и кадмия [1, 2].

Привносимый с водным потоком, кадмий может осаждаться в виде органоминеральных комплексов в илах. Накапливаясь в бентосных организмах, являющихся кормовой базой для многих рыб [3], кадмий даже в малых концентрациях способен вызвать нарушение структуры популяций и общей резистентности рыб [1, 2].

В настоящее время достаточно хорошо изучено влияние кадмия на состав и соот-

Е.А. Флерова*,
кандидат биологических наук,
заведующая химико-аналитическим отделом,
доцент кафедры биотехнологии,
ФГБОУ ВПО Ярославская государственная сельскохозяйственная академия

ношение лейкоцитов крови и кроветворных органов [4-6], в меньшей степени — на структуру лейкоцитов [7-9] и совсем слабо изучена реакция гуморальных неспецифических факторов иммунитета. При этом имеющиеся сведения относятся, в основном, к промысловым видам. В то же время большой интерес представляет реакция на действие кадмия малоизученных представителей ихтиофауны средней полосы России. К таким видам относится, например, усатый голец *Barbatula barbatula* (L.), отряд карпообразные (Cypriniformes), достаточно часто встречающийся в небольших речках Волжского бассейна. Он ведет придонный образ жизни и по способу питания относится к типичным бентофагам [10]. Сведения о строении и функциях иммунной системы этих рыб и ее реакции на токсические воздействия в литературе отсутствуют.

Цель работы — изучение некоторых морфофизиологических показателей крови и иммунокомпетентных органов усатого гольца и анализ их изменения под действием ионов кадмия.

*Адрес для корреспонденции: katarinum@mail.ru

Материалы и методы исследования

Работу проводили в октябре на 40 особях усатого гольца с массой $4,2 \pm 0,2$ г и длиной тела $8,6 \pm 1,2$ см. Рыб отлавливали в р. Ильдь (Ярославская обл.) на участке, не подверженном антропогенному воздействию [11]. Рыбы были помещены в 50-литровые аэрируемые пластиковые аквариумы с водопроводной водой по 5 особей. До начала эксперимента они проходили акклимацию в течение месяца. Рыб ежедневно кормили тонущими хлопьями для мелких карповых рыб (Tropical, Польша).

В качестве токсического агента использовали хлорид кадмия (CdCl_2). Значение 96 LC_{50} устанавливали в предварительном опыте. В аквариум с подопытными рыбами соль вносили до концентрации 50 мкг/л в расчете по иону металла ($0,002$ от LC_{50}). Раствор токсиканта в аквариумах опытной группы рыб заменяли через сутки. Материал для исследования лейкоцитов крови и иммунокомпетентных органов отбирали через 7, 14, 21 и 28 сут экспозиции, показателей гуморального иммунитета — через 14, 21 и 28 сут от 5 рыб опытной и контрольной групп в каждый срок. Рыб взвешивали, измеряли, отбирали кровь после отсечения хвостового стебля и затем извлекали органы для получения мазков-отпечатков и дальнейшего анализа.

Величину гепатосоматического индекса рассчитывали как отношение массы печени к массе рыбы, выраженное в процентах.

Экстракты ткани печени получали согласно методике [12]. Лизоцим определяли нефелометрическим методом [13], концентрацию фермента рассчитывали в мкг на мг веса ткани.

Содержание иммунных комплексов определяли стандартным методом путем осаждения с полиэтиленгликолем [14].

Оценку фагоцитарной активности нейтрофилов крови проводили методом теста с нитро-синим тетразолиевым (НСТ-тест) [4]. Для этого цельную кровь рыб, собранную в пробирки с антикоагулянтном (20 мкл цитрата натрия. 5мкг/мл), инкубировали: в тесте по спонтанному фагоцитозу — 0,5 мл крови + 0,25 мл 0,3 %-ного водного раствора НСТ + 0,25 мл фосфатного буфера pH 7,0; в тесте по индуцированному фагоцитозу последний заменяли на 0,25 мл 5 %-ного водного раствора продигоизана на том же буфере. Рассчитывали долю активированных нейтрофилов (ДАН, %) и индекс активации нейтрофилов (ИАН) по общепринятой формуле [4].

Т.Б. Лапирова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук

Е.А. Заботкина, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук

Анализ соотношения лейкоцитов проводили на мазках крови и мазках-отпечатках органов, приготовленных по стандартной методике, окрашивали по Романовскому — Гимза [15]. Под световым микроскопом VHX-1000E подсчитывали не менее 200 клеток белой крови.

Материал для электронной микроскопии обрабатывали по стандартной методике [16]. Ультратонкие срезы просматривали под электронным микроскопом JEM 1011.

Результаты и их обсуждение

Лейкоцитарная формула крови. В норме формула крови гольца подобна другим костистым рыбам [17], имеет ярко выраженный лимфоидный профиль с долей лимфоцитов $85,2 \pm 3,82$ %. Экспозиция рыб в токсиканте вызвала достоверное относительно контроля снижение доли лимфоцитов на протяжении всего эксперимента. Наименьшая доля лимфоцитов ($66,8 \pm 3,48$ %) зарегистрирована после 14 сут, к окончанию эксперимента она увеличилась до $71,9 \pm 3,39$ %. Произошло достоверное увеличение моноцитов на 21–28 сут (контроль — $1,22 \pm 0,82$ %; 21 сут — $7,73 \pm 1,70$ %; 28 сут — $7,00 \pm 0,82$ %). Доля палочкоядерных нейтрофилов достоверно изменилась с $5,25 \pm 2,07$ % до $12,98 \pm 2,77$ % на 7 сут и была выше контроля до конца эксперимента. Уровень содержания сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов мало отличался от контроля.

Соотношение лейкоцитов на мазках-отпечатках органов. Изменение доли лимфоцитов в тканях происходило аналогично периферической крови, нейтрофилия в той или иной степени отмечена во всех органах, кроме селезенки, но к 28 сут сохранилась лишь

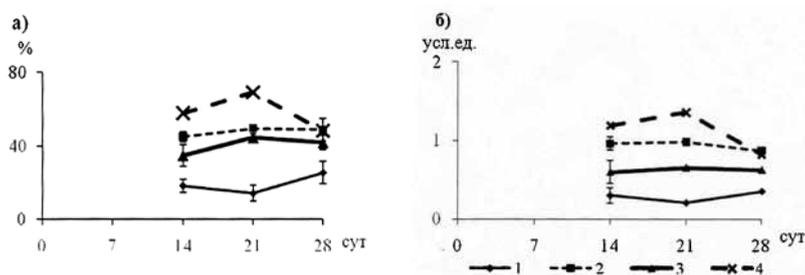


Рис. 1. Фагоцитарная активность нейтрофилов гольца. а) ДАН; б) ИАН. 1 — спонтанная активность нейтрофилов в контрольной группе; 2 — индуцированная активность в контроле; 3 — спонтанная активность клеток в опыте; 4 — индуцированная активность клеток в опыте.

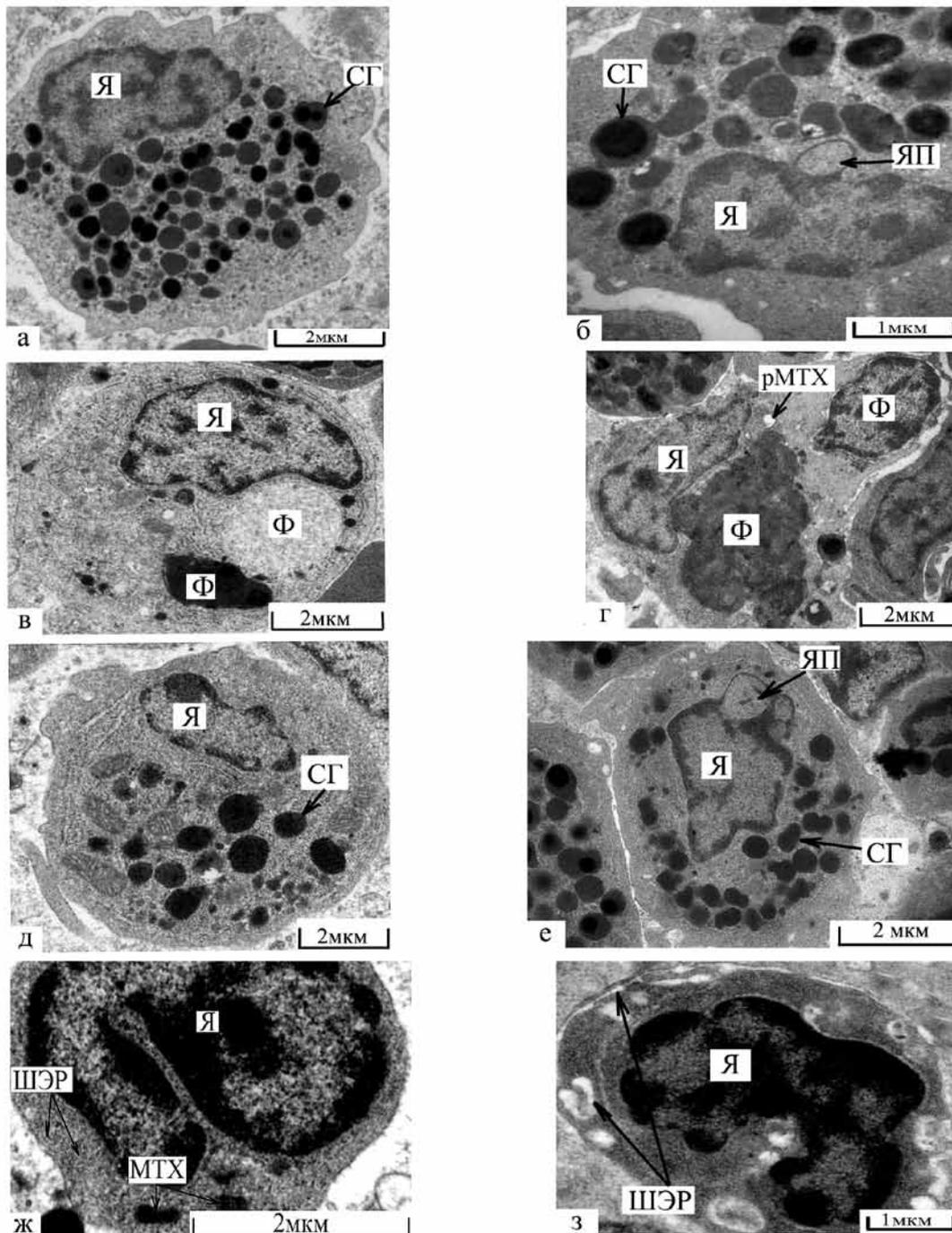


Рис. 2. Ультраструктура лейкоцитов гольца. а – нейтрофил контроль, б – нейтрофил 7 сут, в – макрофаг контроль, г – макрофаг 7 сут, д – эозинофил контроль, е – эозинофил 14 сут, ж – лимфоцит контроль, з – лимфоцит 14 сут. Обозначения: МТХ – митохондрия, рМТХ – разрешенная митохондрия, СГ – специфические гранулы, Ф – фагосомы, ШЭР – шероховатый эндоплазматический ретикулум, ЯП – ядерная петля, Я – ядро.

в головной почке. Значимый рост доли макрофагов выявлен во всех органах с 14–21 сут до конца наблюдений. По эозинофилам отличия с контролем были незначительны, а по плазматическим клеткам достоверный рост произошел лишь в туловищной почке на 7 сут.

Таким образом, при действии токсиканта происходит изменение направленности процессов клеточной дифференцировки в крови и органах в сторону усиления миелопоэза и подавления лимфопоэза. Сдвиг соотношения лейкоцитов, выявленный в данном исследовании, ранее был обнаружен при действии кадмия на другие виды рыб [4, 18].

Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по результатам НСТ-теста. Выявлено достоверное стимулирующее влияние исследуемой концентрации ионов кадмия как на долю

клеток, способных к фагоцитозу, так и на их способность к производству активных форм кислорода в течение всего эксперимента (рис. 1 а, б). Высокий уровень доли активированных нейтрофилов по отношению к контролю совпадает с большей долей палочкоядерных нейтрофилов в крови гольцов в опытной группе и имеет сходную тенденцию изменения (рис. 1 а).

Ультраструктура лейкоцитов. У контрольных особей тонкая структура лимфоцитов, макрофагов, плазматических клеток и эозинофилов подобна описанной для видов сем. Cyprinidae (рис. 2 в, д, ж) [19]. В нейтрофилах усатого гольца выявлены гранулы с электронно-плотной округлой сердцевиной (FF гра-

нулы = 0,8) (рис. 2 а), которые не обнаружены у других видов рыб.

Установлено, что кадмий оказал влияние на структуру лейкоцитов гольца. Через 7 сут в цитоплазме выявлены митохондрии с частичным или полным разрушением крист. В ядрах нейтрофилов произошло образование ядерной петли, которая возникла в результате расслоения ядерной мембраны (рис. 2 б). У группы опытных рыб увеличились размеры макрофагов (от 7,6 x 6,3 мкм в контроле до 11 x 7,9 мкм в опыте) и размеры фагосом в этих клетках (от 2,1 x 1,8 мкм в контроле до 3,6 x 2,5 мкм в опыте). Во многих фагосомах обнаруживались остатки клеток эритроидного, лимфоидного и зернистого рядов (рис. 2 г).

На этапе 14 сут кроме выше описанных изменений наблюдали образование ядерной петли в некоторых эозинофилах (рис. 2 е), расширение цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР) в цитоплазме многих лимфоцитов (рис. 2 з), размеры фагосом выросли до 6,0 x 3,9 мкм по сравнению с 7 сут эксперимента.

После 21 и 28 сут кроме ранее выявленных изменений иных патологий клеток обнаружено не было.

Таким образом, уже на ранних сроках воздействия токсикантом выявлен процесс альтерации клеток белой крови, заключающийся в патологических изменениях митохондрий клеток, ядер гранулоцитов, изменении функционирования ШЭР лимфоцитов, наличии частей клеток в фагосомах макрофагов. Выявленные нами ультраструктурные изменения, приводящие к гибели лейкоцитов, можно рассматривать как систему неспецифических реакций, выявленную и у других видов рыб [8, 18].

Гепатосоматический индекс. Действие кадмия не вызвало резких колебаний показателя, с 14 по 28 сут наблюдений он держался в пределах $1,16 \pm 0,27$ – $1,20 \pm 0,23$ %. Лишь в первый срок отбора значения оказались несколько ниже – $0,85 \pm 0,38$ %. У контрольных рыб уровень средних величин был даже менее однороден – от $1,0 \pm 0,35$ до $1,59 \pm 0,44$ %; значимых различий между показателями опытной и контрольной групп не выявлено.

Как было показано в исследованиях на годовиках карпа, кадмий в концентрации 0,2 от 96 ч LC_{50} привел к достоверному росту гепатосоматического индекса в течение 21 сут с начала эксперимента, далее показатель вернулся к контрольному уровню. Авторы считают это проявлением адаптивного от-

Ключевые слова: гольц усатый, кадмий, гуморальные и клеточные факторы иммунитета

вета, отражающего усиление детоксикационной функции печени в отношении различного рода воздействий [18]. Отсутствие выраженной реакции показателя в случае с гольцами можно отнести за счет большой разницы в используемой концентрации токсиканта.

Иммунные комплексы (ИК) печени. У рыб, экспонированных в кадмии, относительное содержание ИК в органе на 21 сут несколько возросло, но, тем не менее, не превысило трети от контроля. Как указывалось выше, под действием токсиканта не произошло значительного роста доли плазматических клеток в почках и селезенке, в печени эти клетки не были обнаружены ни в опытной, ни в контрольной группах. Таким образом, примененная концентрация кадмия, скорее всего, не повлекла заметного увеличения выработки антител к токсиканту. Но при этом в результате общей мобилизации ресурсов неспецифической защиты могли интенсифицироваться процессы утилизации чужеродного материала. Те ИК, которые присутствуют обычно в кровотоке, и небольшое количество вновь появившихся, видимо, элиминировались в селезенке, являющейся основным местом их переработки, при этом в печени их количество не только не возросло, но даже снизилось.

Лизоцим печени. Известно, что лизоцим играет роль в поддержании гомеостаза в пе-

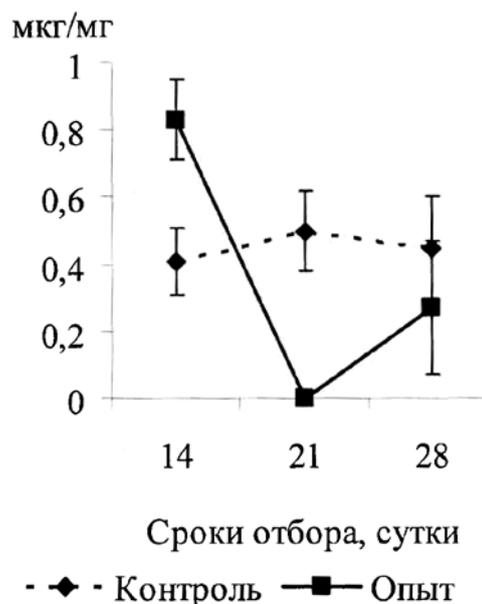


Рис. 3. Концентрация лизоцима в печени, мкг/мг ткани.

риод адаптации рыб к резким изменениям среды [20]. Поскольку фермент синтезируется в макрофагах и нейтрофилах [21], его концентрация выше в органах, имеющих в своем составе больше миелоидной ткани. По этой причине по сравнению с другими иммунокомпетентными органами в печени, как правило, концентрация фермента ниже даже у видов, имеющих в целом высокое содержание лизоцима [22].

Уровень содержания лизоцима в печени гольца составил для контрольных особей 0,4-0,5 мкг/мг ткани. Кадмий вызвал значительные колебания показателя относительно контрольных величин — от двукратного превышения к 14 сут до полного исчезновения активности к 21 сут. К концу эксперимента активность фермента вновь проявилась, но не достигла контрольного уровня (рис. 3). Динамика изменений показателя в целом сходна с таковой, выявленной для осетра при действии тяжелых металлов, и соответствует фазам стрессовой реакции [23].

Изменение уровня содержания лизоцима в органе коррелировало со сдвигом доли нейтрофилов и макрофагов в печени. При просчете мазков-отпечатков был выявлен рост доли палочко- и сегментоядерных нейтрофилов на 7 и 14 сут, соответственно, что совпадает с ростом уровня тканевого лизоцима. После фазы мобилизации наступает резкое снижение выработки фермента, совпадающее с падением доли нейтрофилов. Следующая фаза может рассматриваться как адаптационная, вновь возобновляется выработка лизоцима в органе, вполне вероятно, больше уже за счет макрофагов печени, процент которых остается достаточно высоким относительно контроля.

Заключение

Результаты исследования показывают, что действие кадмия привело к развитию неспецифической стрессовой реакции. По клеточному звену иммунитета это проявилось в сдвиге лейкоцитарной формулы в сторону усиления миелопоэза и подавления лимфопоэза. Увеличение относительного количества нейтрофилов в крови сопровождалось усилением их фагоцитарной активности и способности к производству активных форм кислорода. Вспышка метаболической активности нейтрофилов подтверждается электронно-микроскопическими исследованиями, которые выявили

большое количество макрофагов, содержащих фагосомы с разрушенными остатками гранулоцитов. Ультраструктурные изменения макрофагов сопровождались увеличением доли этих клеток в крови и органах относительно контроля на протяжении всего эксперимента.

Степень выраженности изменений гуморальных факторов врожденного иммунитета была неодинакова. Увеличения количества ИК в печени не произошло, однако экспозиция в токсиканте вызвала фазовые колебания уровня лизоцима в печени, характерные для неспецифической стрессовой реакции. Корреляция сдвигов данного показателя с изменением доли нейтрофилов и макрофагов в органе свидетельствует о взаимосвязи реагирования клеточных и гуморальных факторов неспецифической защиты.

Литература

1. Кашулин Н.А. Рыбы пресных вод Субарктики как биоиндикаторы техногенного загрязнения / Н.А. Кашулин, А.А. Лукин, П.А. Амундсен. Апатиты: КНЦ РАН, 1999. 142 с.
2. Перевозников М.А. Ихтиотоксикологические основы экологического мониторинга пресноводных водоемов (пестициды, тяжелые металлы). Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. С-Пб., 2002. 32 с.
3. Степанова Н.Ю. Некоторые закономерности распределения микроэлементов между абиотическими и биотическими компонентами Куйбышевского водохранилища / Н.Ю. Степанова, В.З. Латыпова, Е.А. Минакова // Тез. докл. конф. «Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем». С.-Пб.: Лема, 2006. С. 143-144.
4. Заботкина Е.А. Влияние ионов кадмия на некоторые морфо-функциональные и иммунофизиологические показатели сеголеток речного окуня *Perca fluviatilis* L. (*Perciformes*, *Percidae*) / Е.А. Заботкина, Т.Б. Лапинова, Е.А. Назарова // Вопр. ихтиол. 2009. Т. 146. № 1. С. 117-124.
5. Murad A. Leucocytes and leucopoiesis capacity in goldfish *Carassius auratus* exposed to sublethal levels of cadmium / A. Murad, A.H. Houston // Aquat. Toxicol. 1988. V. 13. № 1. P. 141.
6. Tejendra S.G.E. August stress — related changes in the hematological profile of the American Eel (*Anguilla rostrata*) // Ecotox. Environ. Safety. 1993. V. 25. P. 227-235.
7. Балабанова Л.В. Влияние кадмия на ультраструктуру иммунокомпетентных клеток селезенки и почек осетра *Acipenser baeri* Brandt // Биол. внутр.вод. 1998. № 2. С. 80-85.

8. Назарова Е.А. Последовательность морфо-патологических изменений в почках пресноводных костистых рыб при хронической интоксикации солями кадмия // Токсикол. вестник. 2011. № 4. С. 46-51.

9. Suchada T. Ultrastructural alterations in the liver and kidney of white sea bass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure / T. Suchada, P. Prayad, C. Kashane, U. Suchart, S. Somphong // Environ. Toxicol. 2004. V. 19. №1. P. 11-19.

10. Решетников Ю.С. Атлас пресноводных рыб России: В 2 т. М.: Наука, 2002. Т. 1. 379 с.

11. Отюкова Н.Г. Влияние количества атмосферных осадков и зарегулирования стока на химический состав воды и зоопланктон малой реки / Н.Г. Отюкова, О.Л. Цельмович, А.В. Крылов // Биол. внутр. вод. 2007. № 3. С. 48–55.

12. Вихман А.А. Методические указания по количественному анализу гуморальных факторов резистентности в органах и тканях рыб / А.А. Вихман, Л.П. Генералова. М.: ВНИИПРХ, 1991. 20 с.

13. Практикум по иммунологии. Учеб. пособие / Под ред. И.А. Кондрагеевой, В.Д. Самуилова. М.: МГУ, 2002. 224 с.

14. Гриневич Ю.А. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных / Ю.А. Гриневич, А.Н. Алферов // Лабораторное дело. 1981. № 8. С. 493-496.

15. Волкова О.В. Основы гистологии с гистологической техникой / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. М.: Медицина, 1971. 272 с.

16. Миронов А.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине / А.А. Миронов, Я.Ю. Комиссарчик, В.А. Миронов. С-Пб.: Наука, 1994. 400 с.

17. Заботкина Е.А. Сравнительная характеристика лейкоцитарного состава периферической крови и иммунокомпетентных органов пресновод-

ных и морских костистых рыб / Е.А. Заботкина, Е.А. Назарова // Мат. докл. конф. «Экологические проблемы уникальных природных и антропогенных ландшафтов». Ярославль:Ремдер, 2006. С. 57-60.

18. Лапирова Т.Б. Сравнительный анализ иммунофизиологических механизмов реагирования молоди осетра сибирского и карпа обыкновенного на действие кадмия / Т.Б. Лапирова, Е.А. Заботкина, Л.В. Балабанова, Е.А. Назарова // Вопр. рыболов.. 2009. Т. 10, № 1 (37). С. 81-91.

19. Флёрва Е.А. Особенности ультраструктуры лейкоцитов рыб отряда Карпообразные (Сугриниформес) // Вест. АПК Верхневолжья. 2011. № 1 (13). С.87-91.

20. Козиненко И.И. Гуморальные факторы неспецифической защиты рыб / И.И. Козиненко, Н.М. Исаева, И.А. Балахнин // Вопр. ихтиол. 1999. Т. 39. № 3. С. 394-400.

21. Грищенко Л.И. Болезни рыб и основы рыбоводства / Л.И. Грищенко, М.Ш. Акбаев, Г.В. Васильков. М.: Колосс, 1999. 464 с.

22. Луценко В.К. Молекулярная патофизиология. М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2004. 270 с.

23. Лапирова Т.Б. Влияние сублетальных концентраций солей ртути, кадмия и меди на содержание лизоцима в тканях молоди ленского осетра (*Acipenser baeri* Brandt) / Т.Б. Лапирова, В.Р. Микряков, А.С. Маврин, Г.А. Виноградов // Ж. эволюц. биохим. и физиол. 2000. Т. 36. № 1. С. 37-41.

Е.А. Флерова, Т.Б. Лапирова, Е.А. Заботкина

INFLUENCE OF CADMIUM IONS ON *morpho-physiological characteristics* of the *Barbatula barbatula* (L.)

This article represents research results on cadmium action on immuno-physiological characteristics of a bearded stone loach in long-term experiment. Obtained data reveal about expression of non-specific stress response affecting humoral and cell factors of immunity. Transformations of leucocyte ultrastructure resulting in cell death were detected in early impact.

Key words: bearded stone loach, cadmium, humoral and cell factors of immunity