

УДК 639.3: 57.577

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СЕГОЛЕТОК И ДВУХЛЕТОК КРОССА КАРПА «ПЕТРОВСКИЙ»

Г. И. Пронина, д-р биол. наук, ГНУ «Всероссийский НИИ ирригационного рыбоводства», Россия, Московская обл., пос. Воровского, e-mail: gidrobiont4@yandex.ru

Д. В. Микряков, канд. биол. наук, Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН, Ярославская обл., пос. Борок

Н. И. Силкина, канд. биол. наук, Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН, Ярославская обл., пос. Борок

А. Б. Петрушин, канд. с.-х. наук, ГНУ «Всероссийский НИИ ирригационного рыбоводства», Россия, Московская обл., пос. Воровского

Аннотация. Целью работы было сравнительное исследование возрастных изменений иммунобиохимических показателей сыворотки крови, печени и почек у карпа кросса «Петровский». В сыворотке крови, печени и туловищной почке рыб определяли содержание малонового диальдегида, иммунных комплексов (ИК) и уровень антиокислительной защиты. Содержание ИК в сыворотке крови и исследуемых паренхиматозных органах у двухлеток было выше, чем у сеголеток. Наиболее высокие показатели ИК отмечены в сыворотке крови, а уровень МДА и КОС в сыворотке крови и почках был выше по сравнению с печенью. Увеличенное содержание МДА и повышенный уровень КОС во всех тканях двухлеток по сравнению с сеголетками свидетельствует о более высокой скорости окислительно-восстановительных процессов у кросса «Петровский».

Ключевые слова: карп, кросс, иммунокомпетентные органы, иммунные комплексы, перекисное окисление липидов, антиокислительная активность.

IMMUNO-PHYSIOLOGICAL ASSESSMENT OF YEARLINGS AND TWO-YEAR CARP CROSS "PETROVSKY"

G. I. Pronina, D. V. Mikryakov, N. I. Silkina, A. B. Petrushin

Summary. The aim was a comparative study of the age-related changes of immunobiochemical indicators of blood serum, liver and kidney in carp. In the blood serum, liver and trunk kidney, there were determined the content of non-specific immune complexes (IC), the content of malondialdehyde (MDA) and level of antioxidant activity (KOS). The content of IC in blood serum, liver and kidney of two-year carp was higher than that of yearlings. The highest rates of IC was observed in blood serum. Levels of MDA and KOS were higher in the serum and kidneys compared with the liver. Larger MDA content and an increased level of KOS in two-year carp compared with yearlings indicate an age-dependent increase in oxidative processes in the studied fish.

Key words: a carp, cross-country, immunocompetent organs, immune complexes, peroxide oxidation of lipids, anti-oxidizing activity.

ВВЕДЕНИЕ

Кроссами в рыбоводстве принято называть межпородные и межлинейные гибриды. Высокая продуктивность, получаемая при неродственном скрещивании, обусловлена эффектом гетерозиса, степень проявления которого может быть различной. Для получения высокопродуктивных кроссов необходимо выявление наиболее эффективных комбинаций промышленного скрещивания [2; 7; 11; 16; 21].

Кросс «Петровский» — рецiproкный гибрид чувашской чешуйчатой и анишской зеркальной пород карпа — является селекционным достижением, патент №4805 от 22.06.2009, и обладает высоким потенциалом роста. Однако особенности иммунофизиологического и биохимического статуса полученного кросса изучены слабо [8; 15]. Между тем это важно для оценки состояния здоровья рыб. В настоящей рабо-

те исследованы интегральные показатели, отражающие функциональное состояние иммунологических и биохимических механизмов, обеспечивающих оптимальный рост, развитие и иммунитет рыб к инфекционным и инвазионным заболеваниям и возможным неблагоприятным условиям выращивания.

Целью работы было сравнительное исследование возрастных изменений иммунобиохимических показателей сыворотки крови, печени и почек у карпа кросса «Петровский».

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования использовали 28 особей — сеголеток и двухлеток из рыбоводного хозяйства «Киря» Чувашской Республики (2-я зона рыбоводства). Кросс «Петровский» — гибрид чувашской чешуйчатой и анишской зеркальной пород карпа



(патент РФ №4805, 2009), обладает высоким потенциалом роста. Все исследуемые рыбы содержались в рыбоводных прудах. Гидрохимический режим прудов соответствовал нормативам рыбоводной зоны. Отбор проб проводили осенью после облова нагульных и выростных прудов. Пробы крови отбирали с соблюдением правил асептики из хвостовой вены, оставляли на 1 час при комнатной температуре и отделяли сыворотку. Навески печени и туловищной почки отбирали из средней части органа. Образцы проб замораживали в морозильной камере (при температуре минус 15–20°C) и транспортировали в специальных термоконтейнерах со льдом в лабораторию для исследования.

Анализ иммунологических и биохимических показателей осуществляли в исследуемых иммунокомпетентных тканях по содержанию неспецифических иммунных комплексов (ИК), продуктов перекисного окисления липидов и уровню антиоксидантной защиты.



Содержание ИК в сыворотке крови устанавливали спектрофотометрически при длине волны 280 нм методом селективной преципитации с 7% полиэтиленгликолем [6]. Для определения содержания ИК в печени и почках предварительно получали гомогенат. Для этого навеску 0,25 мг исследуемой ткани помещали в пробирку, добавляли 0,5 мл физиологического раствора и помещали в морозильную камеру при минус 20°C на 1 сут., затем размораживали при комнатной температуре и снова морозили в течение 1 сут. в морозильной камере. После чего, разморозив, гомогенизировали и центрифугировали 30 мин при 10 тыс. об. Следующая операция заключалась в получении супернатанта, для этого из пробирки отбиралась жидкая часть. Далее работа продолжалась с супернатантом согласно методики [6].

Об интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях судили по накоплению малонового диальдегида (МДА) — одного из конечных продуктов перекисного окисления. Концентрацию МДА определяли по количеству продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой и дающих с ней окрашенный комплекс. Интенсивность окрашивания оценивали спектрофотометрически по изменению максимума поглощения при 532 нм [1]. Содержание МДА вычисляли с учетом коэффициента молярной экстинкции МДА ($1,56 \times 10^5 / \text{M см}$) и выражали в наномолях на 1 г ткани.

Уровень антиоксидантной защиты оценивали по кинетике окисления субстрата — восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха по методике [18], адаптированной нами для рыб. Сущность метода заключается в том, что чем выше скорость окисления субстрата в присутствии биологического материала, тем ниже содержание антиоксидантов в тканях. Гомогенат получали пу-

тем растирания тканей с физиологическим раствором в соотношении 1:1. Степень ингибирования окисления субстрата (КОС), как показатель антиокислительной активности ткани, определяли относительно контроля по формуле: $КОС = (K_{кон} - K_{оп})/C$, где $K_{кон}$ и $K_{оп}$ — константы скорости окисления субстрата соответственно в контроле и в опыте; C — концентрация биологического материала (плазмы крови, надснадочной жидкости) в кювете.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ проведенных исследований позволил установить черты сходства и отличия исследуемых показателей у сеголеток и двухлеток кросса «Петровский» (табл.).

Количественные характеристики ИК в сыворотке крови и в исследуемых паренхиматозных органах двухлеток значительно превышали параметры сеголеток. Аналогичные данные зафиксированы при исследовании показателей МДА и КОС. Наиболее высокие показатели ИК отмечены в сыворотке крови, а содержание МДА и уровень КОС в сыворотке крови и почках выше по сравнению с печенью.

Различия исследуемых показателей между двухлетками и сеголетками, вероятно, связаны как с возрастными особенностями рыб, так и возможными нарушениями оптимальных условий выращивания. Известно, что у рыб в зависимости от возраста изменяются иммунологические показатели и биохимические процессы [10; 13; 20].

Количественные характеристики ИК исследуемых тканей двухлеток значительно превышали аналогичные показатели у однолеток. Это свидетельствует о возрастном изменении характера протекания иммунологических процессов. Известно, что ИК состоят из антигена, антител и связанных с ними компонентов системы комплемента. Данные комплексы выполняют важную роль в процессах регуляции иммунных реакций, элиминации ксенобиотиков из организма и поддержании иммунофизиологического гомеостаза. Избыточное содержание ИК наблюдают при насыщении организма чужеродными компонентами, в том числе инфекционными и токсическими агентами, и обусловлено снижением клиринговой функции фагоцитов [9; 17; 22]. Повышенные показатели ИК двухлеток исследуемых кар-

Таблица. Иммунологические и биохимические показатели

Показатель	Сеголетки		Двухлетки	
	чешуйчатые (n=7)	зеркальные (n=7)	чешуйчатые (n=7)	зеркальные (n=7)
	А	Б	В	Г
Масса тела, г	34,9±7,3	26,1±5,1	1348±61	1366±71
Длина тела, см	10,8±0,7	9,8±0,6	36,9±0,9	37,0±0,4
Сыворотка				
ИК, усл. ед.	18,65±0,05	17,4±0,07 ^а	19,06±0,05 ^{аб}	18,59±0,03 ^{бв}
МДА, нмоль/г	4,86±0,02	4,51±0,09 ^а	5,02±0,03 ^{аб}	4,70±0,03 ^{аб}
КОС, л/(мл·мин)	2,70±0,03	2,56±0,04 ^а	2,80±0,04 ^б	2,85±0,03 ^{аб}
Печень				
ИК, усл. ед.	11,70±0,09	11,90±0,06	13,78±0,06 ^{аб}	13,53±0,06 ^{абв}
МДА, нмоль/г	3,35±0,01	3,21±0,03 ^а	3,48±0,04 ^{аб}	3,42±0,02 ^{абв}
КОС, л/(мл·мин)	1,53±0,03	1,41±0,03 ^а	2,01±0,02 ^{аб}	2,02±0,03 ^{аб}
Почки				
ИК, усл. ед.	13,20±0,07	13,32±0,03	15,02±0,04 ^{аб}	14,94±0,13 ^{аб}
МДА, нмоль/г	4,16±0,01	4,16±0,05	5,11±0,02 ^{аб}	5,00±0,02 ^{абв}
КОС, л/(мл·мин)	2,77±0,03	2,63±0,05	2,81±0,02 ^б	2,67±0,02 ^б

Примечание: ^{абв} — $P < 0,05$ по критерию при сравнении соответствующих групп.

пов по сравнению с однолетками могут отражать возрастные особенности, условия содержания рыб, качество воды, сбалансированность кормов и т.д.

Количественные характеристики показателей окислительно-восстановительных процессов в разных тканях исследуемых рыб отличались, что связано с различиями в структуре и функциях в организме иммунокомпетентных тканей. Увеличенное содержание МДА и уровень КОС во всех тканях двухлеток по сравнению с сеголетками указывает на возрастное изменение баланса окислительно-восстановительных процессов в организме рыб. Известно, что у рыб с возрастом меняются показатели липидного обмена, включая окислительно-восстановительные процессы [5]. Известно, что изменение соотношения между ПОЛ и активностью антиокислительной защиты тканей считается одним из чувствительных индикаторов, отражающих влияние неблагоприятных стресс-факторов на метаболические процессы и состояние здоровья рыб. Важный механизм регуляции метаболических процессов в любом организме — динамическое равновесие окислительно-восстановительного баланса, обеспечиваемое прооксидант-антиоксидантной системой [3; 4]. При оптимальных условиях соотношение этих систем жизнеобеспечения поддерживается на стационарном минимальном уровне [12; 23; 27]. При действии негативных стресс-факторов происходит активация процессов окислительного стресса, которая связана с избыточным накоплением АФК и снижением активности ферментных и неферментных антиоксидантов [14; 19; 24–27]. Выявленные отличия исследованных показателей в разных иммунокомпетентных тканях связаны с их структурно-функциональными особенностями.

Таким образом, сравнительная иммунофизиологическая оценка двухлеток и сего-

леток карпа кросса «Петровский» показала различия по иммунобиохимическим параметрам, отражающим возрастные изменения в организме рыб. Полученные данные могут служить основой для осуществления мониторинга состояния здоровья рыб при индустриальных способах выращивания, получения жизнестойких особей и увеличения рыбопродуктивности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лабораторное дело. — 1988. — № 11. — С. 41–43.
2. Андрияшева М.А. Проявление гетерозиса у рыб и его использование в рыбоводстве // Известия ГосНИОРХ, 1971. — Т. 75. — С. 100–113.
3. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов в сыворотке крови хрящевых и костистых рыб Черного моря // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. — 1995. — Т. 31. — № 1. — С.14–20.
4. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г. и др. Перекисное окисление и стресс. — СПб.: Наука, 1992. — 148 с.
5. Гершанович А.Д., Лапин В.И., Шатуновский М.И. Особенности обмена липидов у рыб // Успехи соврем. Биол, 1991. — Т. 3. — Вып. 2. — С. 207–219.
6. Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лабораторное дело. — 1981. — № 8. — С. 493–496.
7. Катасонов В.Я., Поддубная А.В., Дементьев В.Н., Демкина Н.В. Основные итоги селекции среднерусского карпа // Сб. научн. тр. ВНИ-ИПРХ. Вопросы генетики, селекции и племенного дела в рыбоводстве. — М.: ВНИРО, 2001. — Вып. 76. — С. 39–48.
8. Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. — Л.: Наука, 1987. — 520 с.

9. Койко Р., Саншайн Д., Бенджамини Э. Иммунология: учебное пособие. — М.: Изд. центр «Академия», 2008. — 368 с.
10. Лапин В.И., Шатуновский М.И. Особенности состава, физиологическое и экологическое значение липидов рыб // Успехи современной биологии, 1981. — Т. 1. — С. 380–394.
11. Маслова Н.И., Загорянский К.Ю., Петрушин А.Б. Зависимость гетерозисного эффекта от методов разведения племенных групп карпов // Вестник РАСХН. — 1996. — № 4. — С. 64–66.
12. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. — Новосибирск: АРТА, 2008. — 284 с.
13. Микряков В.Р. Закономерности функционирования иммунной системы пресноводных рыб: Автореф. дис. докт. биол. наук. — М.: ИМЭЖ РАН, 1984. — 37 с.
14. Микряков Д.В., Микряков В.Р., Силкина Н.И. Влияние дексаметазона на окислительные процессы в иммунокомпетентных органах стерляди *Acipenser ruthenus* // Биология внутренних вод. — 2014. — № 4. — С. 86–90.
15. Пронина Г.И. 2011. Сравнительная физиологическая оценка кроссов карпа разного происхождения // Материалы II съезда NACEE (Сети Центров по аквакультуре в Центральной и Восточной Европе) «Аквакультура Центральной и Восточной Европы: настоящее и будущее» и семинара о роли аквакультуры в развитии села. — Кишинев: Pontos. — С. 211–218.
16. Пронина Г.И., Лабенец А.В. Гематологические особенности помесных карпов на фоне проявления эффекта гетерозиса // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. — 2013. — Т. 40. — № 2. — Ч. 2. — С. 264–267.
17. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. — М.: Мир, 2000. — 592 с.
18. Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала. Украинский биохимический журнал. — 1985. — Т. 57. — № 3. — С. 50–52.
19. Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние антропогенного загрязнения на окислительные процессы в печени рыб Рыбинского водохранилища // Экология. — 2012. — № 5. — С. 361–365.
20. Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. — М.: Наука, 1980. — 238 с.
21. Bialowas H., Irnazarow I., Pruszyński T., Gaj C. The effect of heterosis in inter-line crossing of common carp // Arch. Rybactwa pol. 1997. — Vol. 5, fasc. 1: 13–20.
22. Cohen S., Ward P.A., McCluskey R. T. (Eds) Mechanisms of Immunopathology., New York, Chichester, Brisbane, Toronto: John Wiley and Sons, 1979. — 358 p.
23. Fiho W.D. Fish antioxidant defences — A comparative approach // Braz.J. Med. and Biol. Res. — 1996. — Vol. 29. — № 12. — P. 1735–1742.
24. Kuzminova N., Rudneva I.I., Salekhova L. et al. State of Black Scorpion fish (*Scorpaena porcus* L., 1758) inhabited coastal area of Sevastopol region (Black Sea) in 1998–2008 // Turkish J. Fish. Aquat. Sci. — 2011. — № 11. — P. 101–111.
25. Moseley R., Hilton J. R., Waddington R. J. et al. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments // Wound Repair Regen. — 2004. — Vol. 12, — № 4. — P. 419–429.
26. Rudneva I.I., Kuzminova N.S. Effect of chronic pollution on hepatic antioxidant system of Black Sea fish species // Int.J. Sci. Nature. — 2011. — Vol. 2. — № 2. — P. 279–286.
27. Winston G. W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Comp. Biochem. and Physiol. — 1991. — Vol. 100. — № 1–2. — P. 173–176.