

Комплексная прижизненная физиологическая оценка речных раков в аквакультуре

Г. И. Пронина, Н. Ю. Корягина

Всероссийский научно-исследовательский институт
ирригационного рыбоводства Россельхозакадемии,
Gidrobiont4@yandex.ru

При разведении речных раков необходимо оценивать их физиологическое состояние и иммунный статус, представленный в основном неспецифическими факторами иммунитета. На фоне других видов, разводимых человеком, физиология речных раков изучена весьма поверхностно. В работе предложена система прижизненной оценки речных раков и даны ориентировочные нормативы.

Ключевые слова: речные раки, *Astacus astacus*, *Pontastacus leptodactylus*, общее число гемоцитов (ОЧГ), гемоцитарная формула, биохимические показатели, активность ферментов, средний цитохимический коэффициент катионного лизосомального белка в гемоцитах (СЦК).

В процессе культивирования речных раков, так же как и любых живых объектов, встает вопрос об оценке их физиологического состояния. Такая оценка необходима для контроля и прогнозирования технологических процессов раководства, для раннего выявления патологии и адаптационных возможностей при акклиматизации. Кроме того, изучение физиологических особенностей речных раков позволяет понять фундаментальные закономерности физиологии данной систематической группы гидробионтов, в том числе в эволюционном аспекте.

Оценивают физиологическое состояние с помощью разнообразных методических приемов анализа. О состоянии иммунной системы судят на основании регистрации показателей специфических и неспецифических факторов клеточного и гуморального иммунитета.

Наиболее филогенетически древним неспецифическим врожденным фактором иммунной защиты является фагоцитоз. В фагосоме осуществляется сложная интеграция действия самых разнообразных антимикробных факторов и систем. В роли одной из систем, обеспечивающих биоцидность фагоцитов, выступают кислороднезависимые (КНЗ) механизмы. К КНЗ-системе биоцидности нейтрофилов в первую очередь относятся специфические катионные белки — дефенсины (от англ. defense — защита). По своему биологическому действию они весьма разнообразны: могут повреждать мембраны микробов (катепсин G), расщеплять мукопептиды клеточной стенки бактерий (лизоцим), лишать бактерии железа, необходимого для

их пролиферации (лактоферрин), переваривать убитые микробы [1, 2].

Известно, что клеточная система иммунитета речных раков представлена тремя видами циркулирующих в гемолимфе гемоцитов: агранулоциты, полугранулоциты и гранулоциты. Нами выделен еще один тип клеток (прозрачные клетки), предположительно являющихся ювенильными формами гемоцитов [3]. Разные типы гемоцитов выполняют неодинаковые функции в процессе иммунной защиты. Мембраны агранулоцитов содержат распознающие рецепторы. При вторжении чужеродных агентов, например β -1,3-глюканов грибковых или липополисахаридов (LPS) бактериальных клеток, происходят их распознавание по принципу комплементарности и активация каскада ферментов, которые стимулируют выход профенолоксидазной (proPO) системы из полугранулоцитов и гранулоцитов. Фагоцитоз, инкапсуляция слоями гемоцитов, микробный киллинг, агглютинация осуществляются агранулоцитами и полугранулоцитами [4, 5].

При микроскопировании препаратов гемолимфы выявляется ряд особенностей гемоцитов, которые служат объективной базой для их дифференцировки [6].

Агранулоциты (ГЦ I). Клетки размером 3–17 мкм, обычно сферические, содержат только малое число крошечных внутриклеточных включений. Дольше других типов клеток сохраняются на стекле в неизменном виде.

Полугранулоциты (ГЦ II). Имеют размеры в пределах 8–40 мкм. По сравнению с ГЦ I содержат меньшее количество мелких

и менее лучепреломляющих гранул. Встречаются ГЦ II веретенообразной формы с ясно видимым центрально расположенным ядром. *In vitro* на стекле цитоплазма этих клеток разрушается, и через 30–40 мин ГЦ II становятся трудно отличимыми от агранулоцитов.

Гранулоциты (ГЦ III). Это самые крупные клетки гемолимфы, которые могут достигать размеров 50 мкм и выше. Их цитоплазма заполнена многочисленными крупными гранулами с высоким лучепреломлением. Через 15 мин после отбора гемолимфы начинается выброс гранул с последующим растворением цитоплазмы.

Прозрачные клетки (ГЦ IV). Это структуры размером 8–35 мкм. В нативной гемолимфе при световом микроскопировании эти клеточные структуры идентифицируются с трудом, поскольку выглядят прозрачными. Ядра этих клеток не просматриваются, что послужило поводом для названия ГЦ IV прозрачными клетками. Через 15–50 мин становится видимым крупное овальное ядро. ГЦ IV характеризуются наличием большого количества псевдоподий.

Объектами исследования являлись широкопалый (*Astacus astacus*) и длиннопалый (*Pontastacus leptodactylus*) речные раки.

Гемолимфу отбирали прижизненно путем пункции вентрального синуса с соблюдением правил асептики (рис. 1).

Общее число гемоцитов (ОЧГ) и дифференциальный подсчет гемоцитов речных раков проводили в нативной гемолимфе в камере Горяева микроскопически. Биохимические показатели определяли на анализаторе Chem Well Awareness Technology. Гемолимфу перед исследованием центрифугировали при 3000 об/мин и температуре +6°C в течение 5 мин.



Рис. 1. Отбор гемолимфы у длиннопалого речного рака

Оценка фагоцитарной активности гемоцитов гемолимфы речных раков проводилась с помощью цитохимической реакции определения катионного лизосомального белка по М. Г. Шубичу [7].

Исследуемые клетки делились на четыре группы по степени их фагоцитарной активности:

степень 0 — гранулы катионного белка отсутствуют;

степень 1 — единичные гранулы;

степень 2 — гранулы занимают примерно 1/3 цитоплазмы;

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

Средний цитохимический коэффициент (СЦК) рассчитывали по Л. Карлов [8]. Для этого использовали следующую формулу:

$$\text{СЦК} = (0 \times \Gamma_0 + 1 \times \Gamma_1 + 2 \times \Gamma_2 + 3 \times \Gamma_3) / 100,$$

где $\Gamma_0, \Gamma_1, \Gamma_2, \Gamma_3$ — количество гемоцитов с активностью 0, 1, 2 и 3 балла соответственно.

Математическую обработку цифровых материалов проводили с использованием программы Excel пакета Microsoft Office.

Из множества изученных показателей, для речных раков нами был выделен комплекс прижизненной оценки, который включает в себя ряд пунктов.

Гематологические показатели. Выявлены различия в соотношении разных форм гемоцитов в гемолимфе широкопалого и длиннопалого речных раков при изменениях условий среды. В частности, недостаток кальция в воде и повышение содержания нитратов и нитритов вызывают уменьшение доли гранулоцитов и возрастание относительной доли ювенильных форм гемоцитов. Вероятно, при компенсации происходит дегрануляция гранулоцитов с выбросом содержимого гранул в гемолимфу. При транспортном стрессе возрастает доля агранулоцитов на фоне снижения фагоцитов — полугранулоцитов.

Клеточные структуры гемолимфы (гемоциты) речных раков менее дифференцированные, чем клетки крови позвоночных гидробионтов. Гемоциты быстро разрушаются на стекле *in vitro* (через 30–60 мин после отбора гемолимфы). На рис. 2 представлены фотографии гемоцитов речных раков в нативном виде. На рис. 3 представлено изображение гемоцитов раков в мазках гемолимфы, окрашенных по методу Паппенгейма.

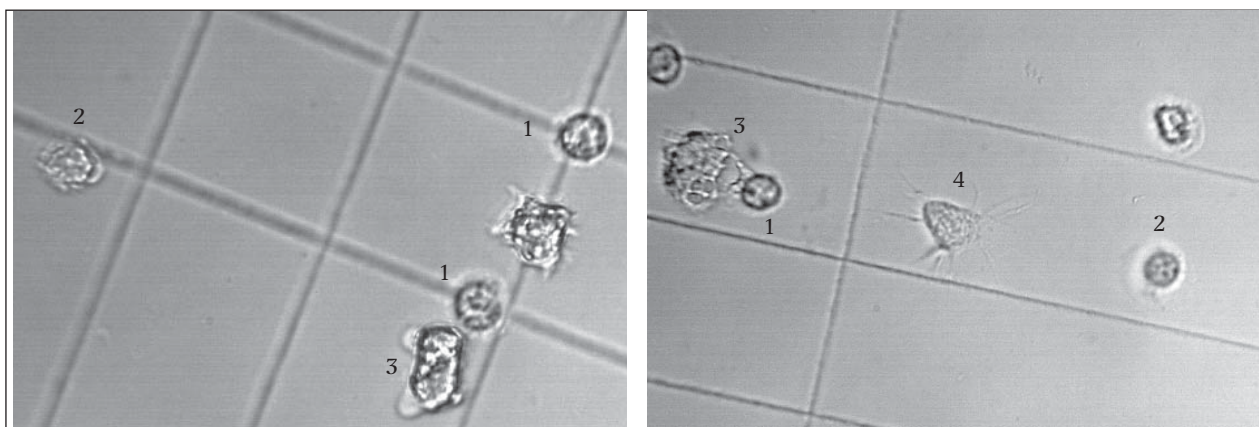


Рис. 2. Гемоциты длиннопалого речного рака через 10–20 мин после отбора гемолимфы (увеличение $\times 160$): 1 — агранулоциты; 2 — полугранулоциты; 3 — гранулоциты; 4 — прозрачные клетки (представлены разные участки гемолимфы)

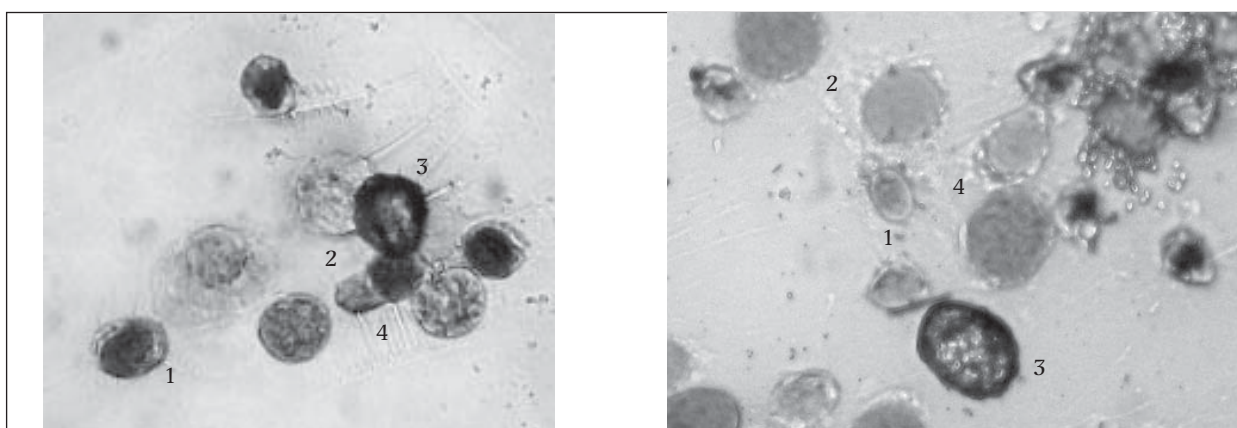


Рис. 3. Микроскопическая картина гемолимфы широкопалого речного рака (а) и длиннопалого речного рака (б) (увеличение $\times 900$; окраска по Паппенгейму, обозначения — см. рис. 2)

Биохимические показатели гемолимфы. Показателями гомеостаза, характеризующими разные стороны метаболизма раков, нами признаны следующие: активность ферментов переаминирования АЛТ и АСТ, ЩФ, концентрация общего белка и альбуминов

в гемолимфе, а также концентрация в ней глюкозы и холестерина.

Цитохимические показатели. СЦК является объективным критерием фагоцитарной активности гемоцитов раков. Нами установлено, что СЦК неферментного лизосомаль-

| Ориентировочные гематологические, биохимические и цитохимические показатели гемолимфы речных раков | | |
|--|------------------------|----------------------------------|
| Показатели | <i>Astacus astacus</i> | <i>Pontastacus leptodactylus</i> |
| Гемоцитарная формула, % | | |
| Агранулоциты | 20–45 | 20–45 |
| Полугранулоциты | 20–50 | 20–50 |
| Гранулоциты | 20–45 | 20–45 |
| Прозрачные клетки | 0,5–15 | 0,3–15 |
| Биохимические показатели | | |
| Глюкоза, ммоль/л | 2–7 | 0,2–3 |
| АЛТ, Ед/л | 50–170 | 50–170 |
| АСТ, Ед/л | 50–170 | 50–170 |
| ЩФ, Ед/л | 10–25 | 30–90 |
| Фагоцитарная активность | | |
| СЦК, ед | 1,5–2,0 | 1,5–2,0 |

ного катионного белка в гемоцитах увеличивается при заболеваниях раков грибковой этиологии.

Учитывая быструю агглютинацию гемоцитов, сложность хранения и транспортировки гемолимфы речных раков, можно опустить биохимические исследования для отбора производителей в племенное ядро и при лабораторных исследованиях ограничиться гематологическими показателями и СЦК лизосомального катионного белка в гемоцитах.

Таким образом, предлагаемый набор тестов объективно отражает адаптивные возможности гидробионтов, объективизирует диагностику заболеваний, позволяет вести ускоренный селекционный отбор гидробионтов на резистентность.

В процессе исследований были определены референтные значения оценочных показателей для речных раков. В таблице приведены ориентировочные нормативы гематологических, биохимических и цитохимических показателей.

Литература

1. Маянский А. Н., Маянский Д. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. — Новосибирск: Наука. 1989. — 343 с.
2. Маянский Д. Н., Маянская Н. Н. Биохимия воспаления // Учебно-методическое пособие для студентов мединститутов и врачей. — Новосибирск, 1995. — 31 с.
3. Пронина Г. И., Корягина Н. Ю. Некоторые видовые особенности состава форменных элементов крови гидробионтов // Сборник научных трудов: Вопросы рыбного хозяйства Беларуси. Стратегия развития аквакультуры в современных условиях. — Минск, 2008. — Вып. 24. — С. 465–470.
4. Johansson M. W. and Soderhall K. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells // J. Cell Biol. — 1988. — № 106. — P. 1795–1803.
5. Soderhall K., Johansson M. W. and Smith V. J. Internal Defence Mechanisms // Freshwater crayfish: Biology, management and exploitation edited by D. M Holdich and R.S. Lowery, 1988. — P. 213–235.
6. Пронина Г. И., Корягина Н. Ю. Влияние неблагоприятных факторов водной среды на состояние клеточного иммунитета речных раков по фагоцитарной активности их гемоцитов // Известия ОГАУ. — Оренбург, 2010. — №3 (27). — С. 251–253.
7. Шулич М. Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // Цитология. — 1974. — № 10. — С. 1321–1322.
8. Kaplow L. S. A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow // Blood. — 1955. — Vol. 10. — P. 1023–1029.

G. I. Pronina, N. Yu. Koriagina

The State Scientific Institute of Irrigation Fish Breeding of Russian Agricultural Academy
Gidrobiont4@yandex.ru

COMPREHENSIVE INTRAVITAL PHYSIOLOGICAL ASSESSMENT OF CRAYFISHES IN AQUACULTURE

Culture of crayfishes needs to assess their physiological condition and immune status, represented mainly by nonspecific immunity factors. Compared to other species, bred by man, crayfish physiology is studied very superficially. The paper proposed a system of intravital assessment of crayfishes. Approximate standarts are set.

Key words: crayfish, *Astacus astacus*, *Pontastacus leptodactylus*, the total number of hemocytes, biochemical parameters, enzyme activity, average cytochemical coefficient of cationic lysosomal protein in blood cells.