

На правах рукописи

Микряков Даниил Вениаминович

**ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ КОРТИКОСТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ
НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЫБ**

03.00.10 - ихтиология,

14.00.36. - аллергология и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2004

Работа выполнена в лаборатории иммунологии рыб Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

Научный руководитель:

Доктор биологических наук
Кузьмина Виктория Вадимовна

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор
Решетников Юрий Степанович

Доктор биологических наук, профессор
Галактионов Вадим Гелиевич

Ведущая организация: Московский Государственный Университет
им. М.В. Ломоносова, биологический факультет

Защита диссертации состоится 15 декабря 2004 г. в 14 часов на заседании диссертационного Д 002.213.02 при Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН по адресу: 119071 Москва, Ленинский проспект, 33. Тел./факс: 952-35-84.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Отделения биологических наук РАН

Автореферат разослан « _____ » _____ 2004г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

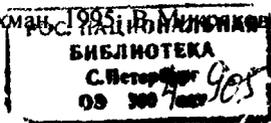
Л.Т. КАПРАЛОВА

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы: Согласно современным представлениям кортикостероидным гормонам принадлежит важная роль в реализации процесса адаптации позвоночных животных к стресс-факторам, а также в регуляции метаболических и иммунологических функций (Розен, 1994; Ярилин, 1999; Хаитов, Лесков, 2001; Schreck, 1996).

Кортикостероидные гормоны относятся к биологически активным соединениям и вырабатываются корой надпочечников. Из более чем 50 соединений стероидной структуры, выделенных из коры надпочечников, наибольшей физиологической активностью обладают кортизол, кортизон, кортикостерон и альдостерон (Розен, 1994). В зависимости от характера их влияния на метаболические функции кортикостероиды подразделяются на глюкокортикоиды и минералокортикоиды (Плисецкая, 1975; Розен, 1994; Чернышева, 1995), а на иммунологические функции - на иммуносупрессивные и иммуностимулирующие (Здродовский, 1969; Утешев, Бабишев, 1974; Шрейбер, 1987; Розен, 1994). При исследовании высших позвоночных установлено, что иммунорегуляторная функция этих гормонов обусловлена их тропностью к иммунокомпетентным клеткам и тканям (Розен, 1994; Зенков и др., 1999; Хаитов, Лесков, 2001). Под влиянием глюкокортикоидных гормонов нарушается иммунный гомеостаз, повреждаются основные структуры, ответственные за распознавание «своего» и «чужого», снижается иммунитет к инфекционным и инвазионным болезням.

Несмотря на достигнутые успехи по изучению особенностей структурно-функциональной организации иммунной системы рыб в плане сравнительной иммунологии (Лукьяненко, 1971; Купер, 1980; Галактионов, 1986, 1995, 1998; Кондратьева и др., 2001), механизмов антиинфекционного иммунитета (Гончаров и др., 1966; В. Микряков и др., 1974; В Микряков, 1991 и др.), закономерностей функционирования иммунной системы под влиянием антигена, иммуностимуляторов, токсических и температурных факторов и т.д. (Лукьяненко, 1971; В Микряков, 1991 Вихман, 1995; В. Микряков и др., 2001 и



др.) иммунорегуляторная функция кортикостероидов слабо разработан; Данные, имеющиеся в литературе, касающиеся влияния кортикостероидных гормонов на иммунную систему рыб носят фрагментарный характер. При этом они связаны или с изучением характера влияния гормонов на иммунитет рыб-паразитам, вызывающим инфекционные и инвазионные болезни (В. Микряков 1979, 1981, 1984; Воронин, В. Микряков, 1992; Pickering, Duston, 1983; Maule *et al.*, 1987; Schreck, 1996), или со специфическим гуморальным ответом (Е. Микряков, 1984), или с функциональным состоянием лейкоцитов (Stave Roberson, 1985; Junko, Takaji, 1999; V. Mikryakov *et al.*, 2002). Вместе с тем сведения о характере реагирования иммунной системы на кортикостероидные гормоны, охватывающие одновременно многие уровни организации (клеточный, гуморальный, тканевой и органный) отсутствуют. Вследствие этого имеющиеся данные не позволяют ответить на вопрос о механизмах влияния гормонов на структурную организацию и функциональное состояние иммунной системы рыб, а также характере и направлении де- и рестабилизационных процессов, происходящих под влиянием стресс-гормона при воздействии на рыб стресс-факторов.

Исходя из вышеизложенного, представляется весьма важным изучение характера влияния кортикостероидных гормонов на структуру и функции иммунной системы рыб, одновременно охватывающее разные уровни организации, и выявление закономерностей формирования адаптивного иммунитета. Последнее позволит подойти к пониманию роли гормонов стресса в регуляции иммунореактивности рыб, механизмов взаимодействия эндокринной и иммунной систем в норме и при воздействии на рыб стресс-факторов.

Цель и задачи исследования. Основной целью работы являлось установление характера влияния кортикостероидных гормонов на структурно-функциональное состояние иммунной системы рыб, а также определение направления де- и рестабилизационных процессов, происходящих в иммунной

системе, и выявление закономерностей формирования специфического иммунного ответа.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи.

1. Изучить влияние кортикостероидных гормонов на закономерности и интенсивность образования антител рыб.
2. Определить реакцию неспецифического гуморального ответа рыб на воздействие кортикостероидов.
3. Исследовать характер изменения структурно-функционального состояния лейкоцитов рыб под влиянием глюкокортикоидов.
4. Изучить влияние гормонов стресса на функциональное состояние иммунокомпетентных тканей и органов рыб.

Научная новизна: Впервые в рамках единого методического подхода проведено исследование реакции иммунной системы рыб на воздействие различных по структуре и функциональному значению кортикостероидных гормонов. Получены новые данные об общих закономерностях характера реагирования клеточного и гуморального звена иммунной системы на воздействие гидрокортизона, кортизона и дезоксикортикостерон-ацетата. Впервые показано, что кортикостероидные гормоны в организме рыб вызывают дестабилизационные процессы, которые связаны с изменением закономерностей формирования специфического и неспецифического иммунитета, нарушением структурно-функционального состояния лейкоцитов и иммунокомпетентных органов.

На основе наших опытов установлено, что под влиянием кортикостероидных гормонов нарушается процесс образования антител и изменяются функциональные свойства неспецифических факторов иммунитета. Выявлена зависимость наблюдаемых изменений от структуры и срока введения гормона. Гидрокортизон в организме рыб вызывает увеличение сроков индуктивного и продуктивного периодов образования антител и снижение функций неспецифического иммунитета, а дезоксикортикостерон-ацетат, наоборот, - активацию гуморального иммунного ответа.

Впервые показано, что под влиянием дексаметазон-фосфата нарушаются процессы лейкопоэза, снижаются индексы иммунокомпетентных органов, активизируются процессы перекисного окисления липидов и уменьшается содержание антиоксидантов.

Высказано предположение, что под влиянием иммуносупрессивных гормонов повреждаются короткоживущие лимфоциты, ответственные за распознавание «своего» и «чужого», нарушается синтез цитокинов, выполняющих функции привлечения и активации макрофагов, презентацию антигена В-клеткам и нарушается процесс нейтрализации и разрушения чужеродных тел.

Сформулировано положение, что гормоны стресса стимулируют в иммунокомпетентных органах процессы перекисного окисления липидов и приводят к снижению содержания антиоксидантов.

Теоретическая и практическая значимость работы: Полученные результаты расширяют представления о роли кортикостероидных гормонов в регуляции структурно-функционального состояния иммунной системы рыб.

Установленные закономерности в реакции иммунной системы рыб на воздействие кортикостероидных гормонов имеют существенное значение при разработке общей теории иммунитета, вопросов регуляции процесса формирования адаптивного иммунитета, а также управления механизмом протективного иммунитета к паразитам, вызывающим инфекционные и инвазионные болезни, путем направленного изменения гормонального статуса. Материалы исследований представляют интерес для выявления механизмов адаптации рыб к стресс-факторам и создании средств профилактики последствий их влияния на организм рыб, основанных на применении гормональных препаратов.

Результаты работы могут быть использованы при разработке гормональных средств повышения естественного иммунитета и могут служить основой управления иммунитетом рыб к паразитам. Многие из полученных в ходе выполнения данной работы выводов имеют приоритетное значение и

существенно дополняют наши представления об иммунитете у рыб, поэтому они могут быть использованы в курсах лекций по ихтиологии, экологической иммунологии, паразитологии, ихтиопатологии, физиологии.

Апробация работы: Основные положения работы были представлены и обсуждены на IX Всероссийской конференции «Экологическая физиология и биохимия осетровых рыб» (Ярославль, 2000), Всероссийской конференции «Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре» (Москва, 2000), XII Международной конференции молодых ученых «Биология внутренних вод: проблемы экологии и биоразнообразия» (Борок, 2002), Всероссийской конференции «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов» (Борок, 2003), 6th International Veterinary Immunology Symposium (Uppsala, Sweden, 2001), Tenth International Conference "Disease of fish and shellfish" (Trinity College Dublin, Ireland, 2001), Fourth International Symposium on Aquatic Animal Health (New Orleans, Louisiana USA, 2002), на заседаниях ученого совета и лаборатории иммунологии института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, а также на научном коллоквиуме лаборатории экологии низших позвоночных ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 работ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения и выводов. Общий объем диссертации составляет 127 страниц машинописного текста, в том числе таблиц - 7, рисунков - 10. Список литературы включает 212 источников, из них 96 на иностранных языках.

Благодарность. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ. Проект № 03-04-49309.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования проводили на базе аквариальной лаборатории иммунологии Института биологии внутренних вод им И.Д. Папанина РАН в 1999 - 2002 гг. Опыты ставились на золотых карасях *Carassius*

Таблица 1. Объекты исследования и условия постановки опытов.

Объект исследования	Масса, г	Число экземпляров	Сроки отбора, сутки	Гормон	Исследуемые показатели
золотой карась <i>Carassius carassius</i>	30-40	75	1,3,7,15, 18	Дексаметазон-фосфат	лейкоцитарная формула хемилюминесцентная активность лейкоцитов индексы иммунокомпетентных органов; перекисное окисление липидов; общая антиокислительная активность.
обыкновенный карп <i>Cyprinus carpio</i>	50-70	100	5,10,20,30,40	Гидрокортизон, дезоксикортикостерон-ацетат	Антителообразовательная функция
	50-70	100	1,5,7,11,15	Гидрокортизон, дезоксикортикостерон-ацетат	Бактерицидная активность сыворотки крови.

carassius (L.) и карпах *Cyprinus carpio* L. в возрасте 1+ и 2+. Масса тела карасей составляла 30-40 г, а карпов - 50-70 г. Рыб содержали при температуре воды $20 \pm 1-2^\circ\text{C}$ в принудительно аэрируемых аквариумах. Реакцию иммунной системы рыб на воздействие гормонов оценивали по показателям антителообразовательной функции, бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК), а также структурно-функциональному состоянию лейкоцитов в иммунокомпетентных органах (табл. 1). В качестве гормональных препаратов использовали гидрокортизон (аналог кортизола), выпускаемый венгерской фирмой «Рихтер», дексаметазон-фосфат (аналог кортизона), фирмы КРКА Novo mesto, Slovenia и масляный раствор дезоксикортикостерон-ацетата (ДОКСИ-Н). Рыбам гормоны вводили путем внутривентральных инъекций гидрокортизон в дозе 25 мг/особь, дексаметазон-фосфата 0.8 - мг/особь ДОКСИ-II - 0.2 мл/особь.

Антителообразовательную функцию изучали у иммунных и неиммунных карпов. Гормоны вводили внутривентрально до и после иммунизации рыб суточной ослабленной культурой *Aeromonas hydrophila*, выращенной на рыбо-

пептонном агаре, в дозе 500 млн. бактериальных тел на особь. Бактерий инактивировали путем нагревания при температуре 56 - 60°C в течение 30 мин. Антитела определяли в сыворотке крови рыб реакцией агглютинации через 5, 10, 20, 30 и 40 сут после иммунизации по методу Г.Д. Гончарова (1973). Влияние гормонов на специфический иммунитет оценивали по характеру проявления латентной и продуктивной фаз антителообразования.

Бактерицидную активность сыворотки крови, отражающую функциональное состояние неспецифических факторов иммунитета, определяли с помощью фотонепелометрического колориметрирования согласно методике, описанной О.В. Смирновой и Т.А. Кузьминой (1966), адаптированной для рыб (В. Микряков и др., 1991). Кровь брали из хвостовых сосудов через 1, 5, 7, 11 и 15 сут после введения гормонов.

Структурно-функциональное состояние лейкоцитов оценивали по составу и их функциональной активности. Состав лейкоцитов определяли в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимза. Последние готовили по методике, описанной Г.Д. Гончаровым (1973) и Н.Т. Ивановой (1983). В каждой мазке определяли относительное количество лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов, базофилов и тромбоцитов с помощью светового микроскопа МБИ-15.

Функциональное состояние лейкоцитов определяли по спонтанной и зимозанстимулированной хемилюминесцентной активности. Измерение хемилюминесцентной активности проводили с помощью автоматизированной системы "Люцифер-Б" А/О "Мир-Диалог" (Попов, 1995; В. Микряков и др. 2001).

Состояние иммунокомпетентных органов (печени, селезенки и почки) оценивали по величине морфо-физиологических индексов, содержанию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и общей антиокислительной активности (ОАА). Индексы органов рассчитывали по процентному отношению массы исследуемого органа к массе рыбы (Правдин, 1966). Интенсивность ПОЛ определяли по концентрации малонового диальдегида

(МДА), которую измеряли на спектрофотометре при длине волны 535 нм (Андреева и др., 1988). Общую антиокислительную активность (ОАА) тканей оценивали по кинетике окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха в присутствии тканевых экстрактов по общепринятой методике (Семенов, Ярош, 1985).

Результаты исследований подвергали статистически при помощи стандартного пакета программ (Microsoft Office 97, приложение Excel) с последующей оценкой различий с использованием t-теста, $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

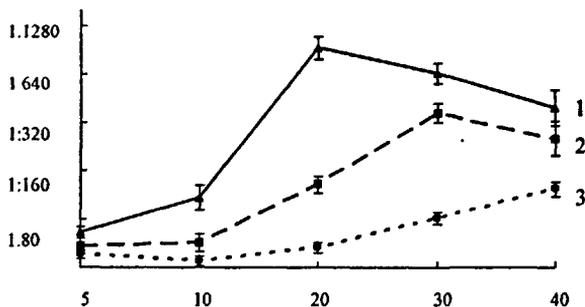
1. Влияние гормонов на гуморальные факторы иммунитета

Динамика и интенсивность образования антител. Согласно существующим представлениям (Лукияненко, 1970; Гурви, 1978; Петров, 1987; Галактионов, 1995, 1998; Ярилин, 1999, Хаитов и др., 2002 и др.), процесс образования антител в организме позвоночных животных в норме связан с деятельностью клеточного звена иммунной системы на действие чужеродных тел и состоит из латентного и продуктивного периодов.

Согласно результатам наших экспериментов кортикостероидные гормоны оказывают либо супрессивное, либо стимулирующее влияние на специфический иммунный ответ рыб. Об этом свидетельствуют особенности динамики образования антител. Динамика образования антител у рыб, подвергнутых воздействию разными гормонами, отличается величиной латентного и продуктивного периодов, а также интенсивностью поступления антител в кровяное русло. Латентный период у рыб, подвергнутых обработке гидрокортизоном (ГДН), за сутки до введения антигена возрастает более чем в 2 раза по сравнению с контрольными, а интенсивность образования антител, наоборот, снижается (рис. 1). У карпов, получающих инъекции ДОКСИ-П за 1 сут до иммунизации, период индуктивной фазы сокращается до 5 сут, против более 10 - у контрольных.

Однако супрессивный эффект аналога кортизола на индуктивный период образования антител ослабевает в случае введения ГДН в организм рыб через

Рис. 1. Влияние гормонов на первичный иммунный ответ у карпа.

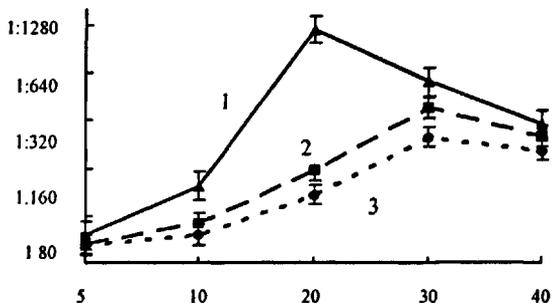


Примечание: по оси абсцисс - время, сут., по оси ординат - титры антител.

1 - ДОКСИ-И, 2 - контроль, 3 - ГДН; Гормоны вводили за 24 ч до иммунизации

3 сут после иммунизации (рис. 2). В соответствии с характером влияния исследуемых гормонов на индуктивный период или лаг-фазу изменяется и интенсивность поступления специфических антител в циркулирующую кровь (рис. 1, 2). Длительность периода интенсивного образования антител, определенная от момента появления их в кровяном русле и достижения ими максимального уровня у карпов, инъецированных ДОКСИ-П за 1 сут до иммунизации, сокращается на 10 сут по сравнению с контрольными, и на 20 сут по сравнению с особями, получившими инъекцию ГДН.

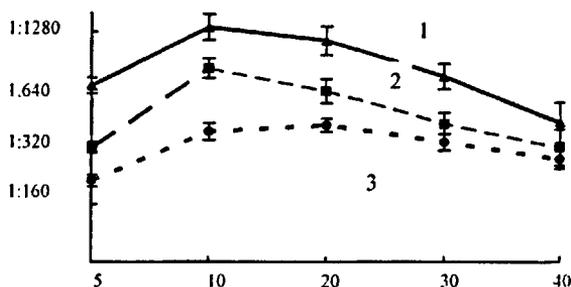
Рис. 2. Влияние гормонов на синтез антител у карпа.



Примечание: обозначения как на рис. 1.

Гормоны вводили через 3 сут после иммунизации рыб.

Рис. 3. Влияние гормонов на вторичный иммунный ответ карпа.



Обозначения как на рис. 1.

Поскольку известно, что рыбы на первичную иммунизацию бактериальным антигеном реагируют увеличением интенсивности антителогенеза (Гончаров, Микряков, 1972) представлялось целесообразным определить характер влияния исследуемых гормонов на динамику образования антител при вторичном иммунном ответе.

Вторичный иммунный ответ по сравнению с первичным в норме характеризуется более интенсивным образованием антител и снижением сроков латентного и продуктивного периодов синтеза антител. Установлено, что при воздействии на иммунизированных рыб аналогом кортизола подавляется стимулирующий эффект проявления вторичного иммунного ответа (рис. 3).

Супрессивное влияние ГДН на вторичный иммунный ответ слабее, чем на первичный. ДОКСИ-П на интенсивность вторичного иммунного ответа по сравнению с первичным существенного влияния не оказывает. Обнаруженное в наших опытах снижение эффекта влияния ГДН на вторичный иммунный ответ позволяет полагать, что иммунизация стимулирует образование гормонрезистентных предшественников иммунокомпетентных клеток, ответственных за распознавание, разрушение, презентацию антигена и синтез антител.

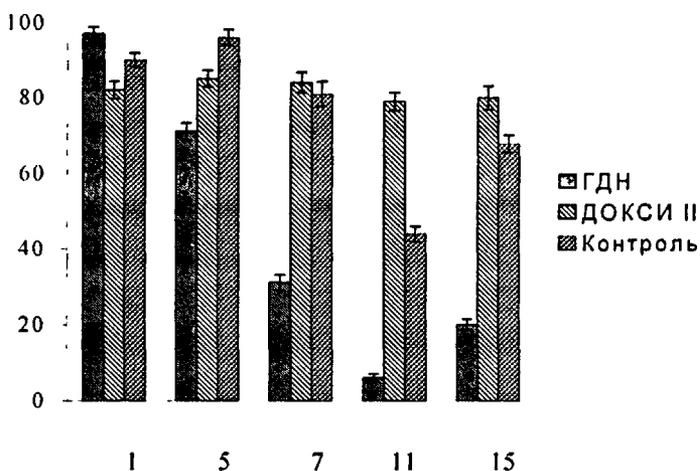
Установленное различие в динамике и интенсивности образования антител у рыб, обработанных разными гормонами, видимо, обусловлено изменением эффекторных функций клеточного звена иммунитета по распознаванию, разрушению и трансформации антигена в иммуногенную форму.

Бактериостатические свойства сыворотки крови. БАСК является интегральным показателем функционального состояния гуморальных факторов врожденного иммунитета и результатом совместного действия неспецифических факторов иммунной защиты (лизоцима, комплемента, пропердина, лейкинов, бета-лизинов, дефензинов и т.д.) от патогенных раздражителей (Лукьяненко, 1971, 1989, Вихман, 1996, Микряков, 1984, 1991; Микряков и др., 2001). БАСК в настоящее время широко применяется при оценке последствий влияния паразитарных и токсических агентов на естественную резистентность и иммунный статус, а также определение адаптивного потенциала рыб к меняющимся условиям среды (Микряков и др., 1974, 1999, 2001; Лапинова, 1998; Балабанова и др., 2003; Mikryakov, 1999; Soltani et al., 2003). При воздействии неблагоприятных для рыб факторов киллерная функция сыворотки крови по отношению к патогенным микроорганизмам снижается (Микряков и др., 1990, 2000, 2001; Mikryakov, 1999). В целях установления характера изменения функциональных свойств неспецифических факторов иммунитета под влиянием ГДН и ДОКСИ нами проведено исследование антимикробных свойств сыворотки крови рыб.

Исследованиями установлено, что у рыб, подвергнутых инъекциям ГДН, снижается протективная функция неспецифических факторов иммунитета, по сравнению с контрольными в 1.5-10 раз, тогда как у рыб, получивших инъекции ДОКСИ-Н, БАСК существенно не меняется (рис. 4).

Динамика показателей БАСК после введения аналога кортизола носит фазовый характер. В течение первых 5 сут величины БАСК колеблются в пределах 79-90% у опытных и 90-98% у контрольных карпов. У опытных рыб через 7 и 11 сут наблюдается снижение величины исследуемого показателя.

Рис. 4. Уровень БАСК после воздействия гормонов, %.



Примечание: по оси абсцисс - время, сут, по оси ординат - БАСК, %.

При этом более, чем у 50% особей защитные свойства неспецифического иммунитета отсутствуют. Максимальное различие (>70 %) в уровне БАСК между опытными и контрольными рыбами установлено на 11 сут с момента введения ГДН. По истечении 15 сут у опытных рыб отмечено постепенное возрастание исследуемого показателя, что, вероятно, обусловлено снижением содержания экзогенных гормонов в организме и восстановлением синтеза неспецифических факторов иммунитета. У рыб, инъецированных ДОКСИ-И, показатели БАСК на протяжении всего периода наблюдения были выше по сравнению с карпами, получившими инъекции ГДН.

Из материалов исследований следует, что иммунная система рыб на введение кортикостероидных гормонов реагирует изменением общей функциональной активности неспецифических факторов гуморального иммунитета.

Установленное различие в характере изменения интегрального показателя естественного иммунитета под влиянием разных гормонов свидетельствует о том, что введение рыбам ГДН приводит к подавлению протективной функции сыворотки крови, тогда как ДОКСИ-II оказывает активизирующее действие на

неспецифическое звено иммунной системы. Вполне вероятно, что под влиянием ГДН подавляется или блокируется функция структур, ответственных за синтез врожденных факторов естественного иммунитета, а под воздействием провоспалительного гормона ДОКСИ - активизируется.

2. Влияние гормонов на клеточное звено иммунной системы.

Реакция лейкоцитов периферической крови. Лейкоциты рыб, подобно таковым теплокровных животных, относятся к основным компонентам иммунной системы (Лукьяненко, 1972, 1989; Микряков, 1991; Иванова, 1995; Балабанова, 1996; Галактионов, 1986, 1996, 2000; Кондратьева и др., 2001; Микряков и др., 2001; Степанова, 2002; Maning, Nakanishi, 1996; Secombs, 1996 и др.). Они выполняют разнообразные иммунологические функции: распознавание, разрушение антигена, синтез медиаторов иммунного ответа и другие.

На основании результатов исследования влияния гормонов на специфический иммунный ответ нами было выдвинуто положение, что у рыб, подвергнутых инъекциям гормонами стресса, в частности ГДН, снижается содержание гормончувствительных лимфоцитов, ответственных за распознавание и разрушение антигена (Микряков, Микряков, 2002). В целях проверки этого положения, нами проведено исследование состава лейкоцитов в периферической крови карася и их функционального состояния под влиянием дексаметазон-фосфата (ДФ).

Известно, что состав клеток белой крови карася, как и у других видов рыб, отличается от такового высших позвоночных (Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989). В норме лейкоциты карася, в отличие от лейкоцитов высших позвоночных, в основном представлены лимфоцитами, на долю которых приходится 85-90% клеток от общего числа лейкоцитов, а на долю гранулоцитов, представителями которых являются нейтро-, эозино- и базофилы - 8-10%, 1-2%, 1-2% соответственно (табл. 1).

У рыб, инъекцируемых ДФ, отмечено снижение количества лимфоцитов и повышение количества других клеток, особенно нейтрофилов и моноцитов.

Таблица 2. Изменение количества лейкоцитов и тромбоцитов под влиянием дексаметазон-фосфата, %

Форма клеток крови		Время, сут				
		1	3	7	15	18
Лимфоциты		<u>88.0±2.02</u> 34.6±8.36*	<u>88.2±0.58</u> 52.6±7.67*	<u>89.4±1.07</u> 72.6±6.83*	<u>89.2±1.46</u> 88.6±2.50	<u>89.8±0.66</u> 89.75±1.43
Базофилы		<u>1.0±0.31</u> 5,6±1,69*	<u>1,2±0,20</u> 4,0±1,30	<u>1,0±0,31</u> 2,8±0,86	<u>1,0±0,31</u> 2,0±0,44	<u>1,0±0,31</u> 1,0±0,40
Эозинофилы		<u>0,4±0,24</u> 1,6±0,74	<u>0,6±0,40</u> 2,8±0,37*	<u>0,6±0,24</u> 0,6±0,40	<u>0,4±0,24</u> 1,4±0,97	<u>0,4±0,24</u> 0,25±0,25
Моноциты		<u>1,2±0,73</u> 6,8±3,23	<u>1,0±0,44</u> 7,8±3,48	<u>0,4±0,24</u> 6,2±4,29	<u>0,4±0,24</u> 1,6±0,60	<u>0,4±0,24</u> 1,75±0,47*
Тромбоциты		<u>3,4±0,74</u> 15,6±3,31*	<u>3,6±0,67</u> 11,6±2,50*	<u>2,6±0,24</u> 6,4±1,96	<u>2,2±0,20</u> 3,0±1,41	<u>2,2±0,20</u> 1,75±0,75
Н е й т р о ф и л ы	Юные	<u>1,2±0,58</u> 11,4±1,96*	<u>2,2±0,58</u> 5,0±1,30	<u>1,8±0,37</u> 2,2±0,73	<u>1,8±0,58</u> 0,8±0,20	<u>1,8±0,20</u> 1,0±0,57
	Палочко- ядерные	<u>1,8±0,37</u> 13,2±1,82*	<u>1,8±0,37</u> 6,4±1,20*	<u>1,6±0,40</u> 4,4±0,92*	<u>2,2±0,20</u> 0,8±0,37*	<u>2,0±0,44</u> 1,75±0,85
	Сегменто- ядер- ные	<u>3,0±1,37</u> 11,2±2,37*	<u>1,4±0,67</u> 9,8±2,24*	<u>2,6±0,24</u> 4,8±0,58*	<u>2,8±0,37</u> 1,8±0,73	<u>2,4±0,24</u> 2,75±0,85

Примечание: над чертой - контроль; под чертой - опыт. Звездочкой отмечены данные, достоверно отличающиеся от контроля, уровень $p > 0,05$.

Достоверные изменения в составе лейкоцитов установлены через 1 сут после начала опыта. Количество лимфоцитов у рыб опытной группы уменьшается по сравнению с контрольной до 30-40% от общего числа клеток. Содержание других типов клеток, особенно нейтрофилов и моноцитов, напротив, увеличивается до 30% и 5-7% соответственно. Параллельно с нейтрофилами в крови рыб более, чем в 4 раза возрастает содержание тромбоцитов. Через 3 сут степень разбалансированности состава лейкоцитов у опытных и контрольных рыб уменьшается, показатели содержания лимфоцитов постепенно повышаются, а гранулоцитов и тромбоцитов снижаются. В последующие дни

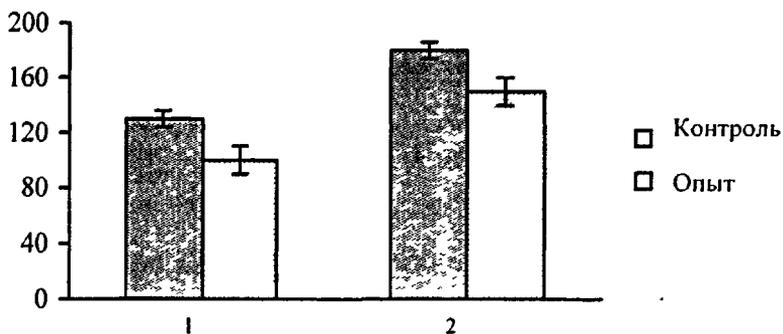
различия между количеством отдельных типов клеток в опыте и контроле сглаживаются.

Из материалов исследований следует, что караси на воздействие ДФ реагируют изменением соотношения между отдельными типами лейкоцитов. Обнаруженные изменения носят фазовый характер. Вначале рыбы реагируют разбалансировкой (дестабилизацией) состава клеток, а в последующем - восстановлением соотношения между разными типами клеток, соответствующему уровню контрольных рыб. Изменения, выявленные в составе клеток крови, связаны с лимфоцитопенией, гранулоцитозом и тромбоцитозом, что подтверждает ранее высказанное предположение (Микряков, Микряков, 2002), согласно которому под влиянием глюкокортикоидов поражаются гормончувствительные лимфоциты, выполняющие эффекторную функцию при реализации и запуске иммунного ответа. По-видимому, у рыб, как и у млекопитающих, под влиянием кортизона включается программа апоптоза (саморазрушения) лимфоцитов и гормонзависимая атрофия тканей и органов, ответственных за процессы лейкопоэза.

Уменьшение количества лимфоцитов с одной стороны и увеличение гранулоцитов с другой свидетельствует о том, что под действием ДФ изменяется процесс дифференцировки стволовых кроветворных клеток: лимфопоэз подавляется, а гранулопоэз и миелопоэз активизируются. Из этого следует, что под влиянием ДФ прежде всего погибают клетки, ответственные не только за распознавание «своего» и «чужого», но и за секрецию цитокинов. Вероятно, у рыб, как и у высших позвоночных, основную часть гормончувствительных лимфоцитов составляют Т-лимфоциты, которые продуцируют интерлейкины, участвующие в активации, пролиферации клеток иммунной системы и регуляции лимфопоэза.

Влияние гормонов на функциональное **состояние лейкоцитов**. Принято считать, что фагоцитоз, обеспечивающий нейтрализацию и разрушение чужеродных тел у рыб зависит от функционального состояния лейкоцитов

Рис. 5. Влияние дексаметазон-фосфата на хемилюминесцентную активность лейкоцитов караса в условиях *in vitro*.



Примечание: по оси абсцисс – 1-спонтанная, 2-стимулированная активность, по оси ординат – импульс, сек.

(Микряков, 1991). При этом известно, что усиленная генерация кислородных радикалов в лейкоцитах при их активации и вызванная ими хемилюминесценция коррелирует с повышением киллинга поглощенных микроорганизмов. Последняя может служить косвенным критерием их фагоцитарной активности, поскольку образуемые иммунными клетками кислородные метаболиты обладают выраженными бактерицидными свойствами (Хаитов и др., 1995).

Для оценки характера влияния глюкокортикоидных гормонов на функциональное состояние лейкоцитов нами проведено исследование кислородзависимой хемилюминесцентной активности клеток караса. Характер влияния гормонов на функциональное состояние лейкоцитов определяли по интенсивности спонтанной и зимозанстимулированной хемилюминесценции в условиях *in vitro*. Исследования показали, что при добавлении ДФ в опыте снижается как спонтанная, так и зимозанстимулированная активность лейкоцитов (рис. 5), что свидетельствует о подавлении функциональной

активности лейкоцитов и хорошо согласуется с данными, полученными на клетках других видов рыб (Stave, Roberson, 1985; Junko, Takaji, 1999).

3. Влияние гормонов на функциональное состояние иммунокомпетентных органов.

У карасей, как и у других видов рыб семейства карповых *Cyprinidae*, основными иммунокомпетентными органами, ответственными за реализацию иммунологических функций являются тимус, почка, селезенка и печень, богатые клетками ретикуло-лимфоидной ткани, включающими различного типа иммунциты, эндотелиоциты, клетки Купфера и другие, способные выполнять разнообразные иммунологические функции: нейтрализацию, разрушение и элиминацию чужеродного материала, синтез специфических антител, интерферона, интерлейкинов и цитотоксических факторов (Купер, 1980; Арцимович, 1992; Галактионов, 1995).

В головном и туловищном отделах почки происходит образование всех типов иммунокомпетентных клеток лимфо-миелоидного ряда (Микряков, 1991; Иванова, 1995; Secombes et al., 1983). Селезенка у карповых рыб, являющаяся основным местом эритро- и тромбопоэза, отличается слабой лимфо-, грануло- и плазмопоэтической активностью (Микряков, Балабанова, 1979; Микряков и др., 2001). Печень выполняет разнообразные функции: принимает активное участие в пищеварительных процессах, выработке ововителлина, обмене веществ, реализуя синтез и деградацию гликогена, белков, липидов, а также процессы их неогенеза, детоксикации, разрушения и элиминации чужеродных тел из организма и другие (Плисецкая, 1975; Балабанова, 1978; Микряков, 1991; Арцимович и др., 1992; Маянский, 1992; Чернышева, 1995; Новиков, 1999).

Анализ полученных результатов показал снижение индексов иммунокомпетентных органов у рыб, получивших инъекцию ДФ. Это по-видимому, обусловлено нарушением белкового, липидного, углеводного и водно-солевого обменов, а также усилением катаболических и окислительных процессов.

Таблица 3. Содержание малонового диальдегида (МДА) и общей антиокислительной активности (ОАА) печени карася после инъекции дексаметазон-фосфата.

Сроки отбора проб	МДА, нмоль/г	ОАА (л × мл ⁻¹ × мин ⁻¹)
Через 1 сутки	<u>5.94</u>	<u>18.1</u>
	5.33	18.6
Через 3 суток	<u>6.28*</u>	<u>18.7*</u>
	15.33	34.4
Через 7 суток	<u>5.87*</u>	<u>17.9*</u>
	10.31	31.9
Через 15 суток	<u>6.77*</u>	<u>17.4*</u>
	9.84	25.7
Через 18 суток	<u>5.54</u>	<u>18.4*</u>
	6.93	26.3

Примечание: над чертой - контроль, под чертой - опыт.
Звездочкой отмечены данные, достоверно отличающиеся от контроля.

Известно, что разрушение тканей зависит от интенсивности образования токсических кислородных метаболитов, индуцирующих неконтролируемое перекисное окисление липидов и снижение содержания антиоксидантов, предотвращающие процессы перекисидации липидов путем нейтрализации токсических производных кислорода, генерируемых нейтрофилами и другими клетками иммунной системы (Зенков и др., 1999). Для понимания характера влияния ДФ на окислительные процессы и содержание антиоксидантов в организме рыб проведено исследование интенсивности процессов перекисного окисления липидов и общей антиокислительной активности в печени рыб по содержанию малонового диальдегида и характера влияния экстрактов тканей на кинетику окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолинидофенола кислородом воздуха.

Исследования показали, что караси на введение ДФ реагировали снижением уровня антиоксидантов и повышением перекисного окисления липидов (табл. 3). Максимальное количество продуктов перекисного окисления липидов у опытных рыб выявлено через 3 сут. Одновременно у опытных рыб отмечено снижение уровня антиокислительной активности тканей. В последующие сроки

наблюдения исследуемые показатели существенных изменений не претерпевают. Увеличение значения ОАА, выявленное у опытных рыб, позволяют предположить, что под влиянием ДФ у рыб, как и у высших позвоночных (Зенков и др., 1999) снижается содержание ферментативных антиоксидантов, в частности, глутатионпероксидазы и каталазы (Мецлер, 1980).

Сопоставление результатов наших исследований с таковыми, полученными после воздействия на рыб токсических и паразитарных факторов (Балабанова, Степанова, 2000; Микряков и др., 2001; Силкина, Микряков, 2003; Vosylene, Svecevicus, 1995), позволяет высказать предположение, что иммунокомпетентные ткани и органы реагируют на глюкокортикоидные гормоны и стрессоры сходным образом. В их основе лежит усиление окислительного стресса, вызванного интенсификацией образования высокореактивных активированных кислородных метаболитов и снижение количества антиоксидантов (Зенков и др., 1999).

Заключение

Проведенное в единых методических условиях исследование влияния кортикостероидных гормонов на примере гидрокортизона, дексаметазон-фосфата и дезоксикортикостерон-ацетата впервые позволило оценить реакцию иммунной системы рыб на гуморальном, клеточном, тканевом и органном уровнях организации. На основании анализа характера изменений структурных и функциональных характеристик показателей иммунной системы впервые установлено, что кортикостероидные гормоны вызывают дестабилизационные процессы. Оценка показателей гуморального звена иммунитета свидетельствует о том, что они связаны с изменением индуктивной и продуктивной фаз антителообразования и протективной функции сыворотки крови. Под влиянием кортизола и кортизона подавляется функция специфического иммунного ответа. Дезоксикортикостерон-ацетат, наоборот, стимулирует гуморальный иммунитет. Под его влиянием происходит активизация синтеза антител. Сходные изменения претерпевают показатели

БАСК, что, вероятно, связано с функциональным состоянием системы компонентов комплемента.

Исследование реакции клеточных факторов иммунитета показало нарушение состава и функционального состояния клеток, иммунокомпетентных тканей и органов рыб. Изучение реакции клеточного звена иммунной системы позволило понять механизмы иммуносупрессивного эффекта глюкокортикоидов. Впервые показано, что кортизол и кортизон вызывают лимфоцитолитиз и возможно, апоптоз гормончувствительных лимфоцитов, основной функцией которых является распознавание «своего» и «чужого», синтез цитокинов, регуляция процессов миграции макрофагов, разрушения чужеродных тел, презентация антигена В-лимфоцитам и образование клеток «памяти». Под влиянием этих гормонов изменяется соотношение между лимфоцитами и гранулоцитами, вызванные нарушениями процесса дифференцировки клеток: лимфопоэз подавляется, гранулопоэз и миелопоэз - активируется. На основе сопоставления реакции клеток на воздействие гормона высказано предположение, что лимфоциты у рыб подобно таковым высших позвоночных животных, состоят из кортизолчувствительных и кортизолрезистентных клеток.

Впервые показано, что под влиянием иммуносупрессивных гормонов происходит гормонзависимая инволюция лимфоидной ткани и иммунокомпетентных органов и усиливаются процессы перекисного окисления липидов, обусловленные интенсификацией образования токсических форм кислорода.

Иммунная система рыб реагирует на кортикостероидные гормоны аналогично таковой теплокровных животных (Гурвич, 1962; Здродовский, 1967; 1969; Учитель, Хасман, 1968; Корнева и др., 1978; Лозовой, Шергин, 1981; Хаитов, Лесков, 2001 и др.). Исходя из установленного нами сходства влияния гормонов надпочечников на иммунологическую реактивность рыб с таковой у теплокровных и учитывая ранее найденную аналогию в структуре и функционировании у них эндокринной (Гинецинский, 1964; Лейбсон, Плисецкая 1972; Лейбсон, 1983; Межнин, 1972, 1976, 1979; Плисецкая, 1975) и

иммунной системы, можно предположить, что кортикостероидные гормоны в организме рыб и высших позвоночных выполняют аналогичные функции по регуляции иммунной системы. Проведенное исследование показало, что у рыб, как и у высших позвоночных животных, ингибирующее действие кортикостероидных гормонов (гидрокортизона и кортизона) на иммунный ответ связано с разрушением антигенреагирующих и антигенразрушающих структур. Изменения в характере проявления клеточных и гуморальных факторов иммунной системы рыб, вызванные введением гормонов стресса, приводят к общему угнетению механизмов врожденного и приобретенного иммунитета.

Выводы

1. Кортикостероидные гормоны вызывают дестабилизационные процессы в иммунной системе рыб, изменение структурно-функционального состояния иммунной системы и нарушение процессов формирования специфического иммунитета. По характеру влияния на иммунную систему рыб исследуемые гормоны подразделяются на иммуносупрессивные и иммуностимулирующие.

2. Гидрокортизон подавляет формирование первичного и вторичного специфического иммунитета у рыб. Под влиянием аналога кортизола удлиняется латентный период и интенсивность синтеза антител. Супрессивный эффект гидрокортизона зависит от срока введения антигена. У рыб, которым вводили аналог кортизола до иммунизации, увеличиваются сроки инкубационного и продуктивного периодов образования антител. На вторичный иммунный ответ гидрокортизон влияет слабее, чем на первичный.

3. Под влиянием гидрокортизона подавляется активность неспецифических факторов гуморального иммунитета: снижается функция антимикробных свойств сыворотки крови и появляются иммунодефицитные особи по бактерицидной активности. Максимальное количество иммунодефицитных особей выявлено на 7 и 11 сут после введения рыбам аналога кортизола.

4. Дезоксикортикостерон-ацетат оказывает стимулирующее влияние на процесс формирования первичного иммунного ответа. Под влиянием

дезоксикортикостерон-ацетата сокращаются сроки инкубационного и продуктивного периодов синтеза антител, а интенсивность образования специфических антител повышается.

5. Введение рыбам дезоксикортикостерон-ацетата приводит к повышению функционального состояния неспецифических факторов гуморального иммунитета.

6. Рыбы на воздействие гормона стресса реагируют изменением структурно-функционального состояния лейкоцитов: содержание лимфоцитов снижается, гранулоцитов - увеличивается, показатели спонтанной и зимозанстимулированной хемилюминесцентной активности лейкоцитов, отражающие кислородзависимую фагоцитарную активность клеток, падают. Обнаружение явления лимфопении свидетельствует о нарушении процессов дифференцировки стволовых кроветворных клеток в сторону лимфоидного ряда.

7. Супрессивные гормоны инициируют атрофию лимфоидной ткани иммунокомпетентных органов и стимулируют процессы перекисного окисления липидов и снижение содержания антиоксидантов в организме рыб.

8. Высказано предположение, что иммуносупрессивные гормоны индуцируют процессы апоптоза гормончувствительных лимфоцитов, ответственных за распознавание «своего» и «чужого», активацию макрофагов, синтез цитокинов, регулирующих процесс дифференцировки стволовых кроветворных клеток в сторону антителообразующих и образования клеток «памяти».

9. Механизмы влияния кортикостероидных гормонов на иммунную систему рыб сходны с таковыми у высших позвоночных животных и человека. Гидрокортизон и дексаметазон-фосфат (аналоги кортизола и кортизона) оказывают супрессивное действие, дезоксикортикостерон-ацетат иммуностимулирующее.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Микряков Д.В., Микряков В.Р. Реакция антителообразовательной функции карпа (*Cyprinus carpio*) на воздействие кортикостероидных гормонов // Экологическая физиология и биохимия осетровых рыб: Тез. докл. IX Всероссийской конф. Ярославль, 2000. Т. 2. С. 59-61.

Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние некоторых кортикостероидов на антителообразовательную функцию карпа // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре. Тез. докл. Москва.: Россельхозакадемия, 2000. С. 87-89.

Микряков В.Р., Микряков Д.В. Влияние гормонов стресса на гуморальные и клеточные факторы иммунитета рыб // Аквакультура начала XXI века: истоки, состояние, стратегия развития. Материалы международной научно-практической конференции, пос. Рыбное 3-6 сентября 2002. С. 234-237.

Микряков Д.В. Влияние аналога кортизона на структурно-функциональное состояние иммунной системы рыб // Биология внутренних вод: проблемы экологии и биоразнообразия. Тез. докл. XII Международной конф. молодых ученых. Борок, Россия, 23-26 сентября 2002. С. 135.

Микряков В.Р., Микряков Д.В. Влияние некоторых глюкокортикоидов на антителообразовательную функцию иммунной системы карпа (*Cyprinus carpio* L.) // Биол. внутр. вод. 2002. № 3. С. 88-92.

Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние гидрокортизона на антителообразовательную функцию иммунной системы карпа (*Cyprinus carpio*) // Вопр. ихтиол. 2002. Т. 42. № 6. С. 820-824.

Микряков В.Р., Терещенко В.Г., Микряков Д.В., Балабанова Л.В. Применение интегральных показателей структуры лейкоцитов для изучения реакции иммунной системы рыб на токсиканты // Биол. внутр. вод. № 4. 2002. С. 84-88.

Микряков Д.В. Роль кортикостероидных гормонов в регуляции иммунореактивности рыб // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. Тез. докл. Всероссийской научно-практической конф. Борок, Россия, 16-18 июля 2003. С. 83-85.

Микряков Д.В., Попов А.В., Микряков В.Р. Влияние дексаметазон-фосфата на состав и функциональную активность лейкоцитов карася (*Carassius carassius*, L) // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. Тез. докл. Всероссийской научно-практической конф. Борок, Россия, 16-18 июля 2003. С. 88-89.

Микряков Д.В., Силкина Н.И., Микряков В.Р. Особенности показателей перекисного окисления липидов печени карасей *Carassius Carassius* L. при воздействии дексаметазон-фосфата // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. Тез. докл. Всероссийской научно-практической конф. Борок, Россия, 16-18 июля 2003. С. 89-91.

Микряков Д.В., Силкина Н.И., Микряков В.Р. Влияние дексаметазон-фосфата на морфофункциональное состояние иммунокомпетентных органов карася (*Carassius carassius*, L) // Вопр. ихтиол. 2004. в печати.

Mikryakov V.R., Mikryakov D.V. The effect of some corticosteroid hormones on protective function of fish immune system to *Aeromonas hydrophila* //6th International Veterinary Immunology Symposium. Uppsala, Sweden, 2001. P. 88-89.

Mikryakov V. R., Mikryakov D.V. The effect of hydrocortisone and desoxycorticosteron-acetate on protective function of fish immune system to *Aeromonas hydrophila* II Disease of fish and shellfish. Abstr. Tenth International Conference. Trinity College Dublin, Ireland September 9-14, 2001. P. 138.

Mikryakov V.R., Tereshchenko V.G., Mikryakov D.V. Using the information indexes of frame of leucocytes to analysis of dynamics of a response of fishes on an operation toxicants // Diseases of Fish and Shellfish. Abstr. EAAP Tenth International Conference. Trinity College Dublin, Ireland September 9-14, 2001. p. 242.

Mikryakov V. R., Mikryakov D.V., Popov A.V. The effect of dexamethason on crucian carp (*Carassius carassius*, L) leukocytes // Abstr. Fourth International Symposium on Aquatic Animal Health, New Orleans, Louisiana USA September 2-6, 2002. P. 227.

#22623