

УДК 597:612.112:577.3

Г. В. Макарская¹, С. В. Тарских²

**ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ РЫБ СРЕДНЕЙ
ЧАСТИ КРАСНОЯРСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА В
ЛЕТНИЙ ПЕРИОД**

Представлены результаты мониторинга количественных и функциональных характеристик клеток периферической крови разных видов рыб средней части Красноярского водохранилища в 2000—2009 гг. Сезонная динамика кислородного метаболизма клеток крови разных видов рыб характеризуется однотипными изменениями их неспецифической резистентности в нерестовый и посленерестовый периоды в условиях разного уровня водонаполнения водохранилища.

Ключевые слова: рыбы, кровь, неспецифическая резистентность, активные формы кислорода, функциональная активность, фагоцитоз, хемиллюминесценция.

За 30—40-летний период функционирования Красноярского водохранилища сформировался достаточно устойчивый режим минерального и органического состава воды, численности и функциональной активности отдельных составляющих трофической цепи экосистемы [3, 9], регулируемый сезонными климатическими изменениями и гидрологическими сбросами Саяно-Шушенской и Красноярской ГЭС [4]. При этом сохраняется повышенный уровень концентрации нефтепродуктов и таких микроэлементов, как марганец, медь, железо [5], и продолжается изменение соотношения численности отдельных видов рыб [9].

Принадлежность рыб к разряду пойкилотермных определяет зависимость метаболизма всех систем организма от температурных условий места обитания, влияющих на формирование кормовой базы, растворение и миграцию поступающих в водоем органических и неорганических веществ. Однако даже в одинаковых условиях рыбы разных видов и семейств различаются по показателям иммуногематологического статуса [9, 13—15].

Сохранение целостности организма и стабильности его функционирования в условиях воздействия изменяющихся природных и антропогенных факторов обеспечивается гомеостатическими свойствами, включающими и механизмы неспецифической резистентности. Одним из информативных показателей последней является функциональная активность фагоцитирующе-

© Макарская Г. В., Тарских С. В., 2011

щих клеток крови, позволяющая судить о степени напряженности иммунитета, стабильности или критическом изменении адаптивных свойств организма. Эту активность оценивают по кинетике генерации активных форм кислорода (АФК) [10, 11, 14, 16],

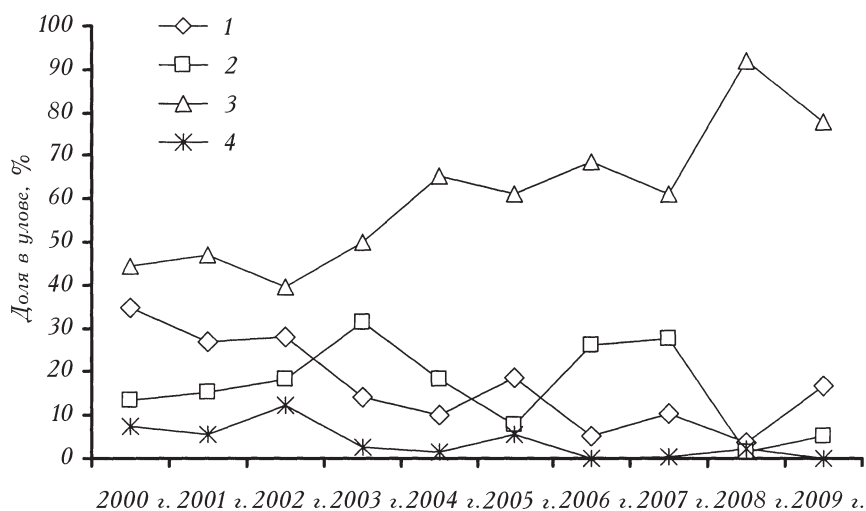
Цель работы — на основании оценки функциональной активности клеток крови изучить адаптивные возможности разных видов рыб Красноярского водохранилища в условиях изменения гидрологического режима.

Материал и методика исследований. Исследование биологических компонентов рыб (плотвы *Rutilus rutilus* L., леща *Abramis brama* L., окуня *Perca fluviatilis* L. и щуки *Esox lucius* L.), обитающих в средней части Красноярского водохранилища, проводили в 2000—2009 гг. в летние сезоны, включающие период нереста и посленерестового нагула. Пробы крови получали из сосудов жабр путем их рассечения. Кровь собирали на часовом стекле, смоченном в гепарине, затем переносили в пробирку Эппендорфа и разводили двукратно раствором Хенкса. Состояние системы гемоиммуногенеза рыб оценивали гематологическими методами (содержание гемоглобина, численность эритроцитов и лейкоцитов) [8] и по кинетике генерации АФК клетками крови при антигенной стимуляции *in vitro* частицами монодисперсного латекса (Научно-исследовательский институт синтетического каучука им. С. В. Лебедева, С-Петербург), регистрируемой методом люминоусиленной хемилюминесценции с использованием 36-канального аппаратно-программного комплекса «Хемилюминометр CL-3604 — ПЭВМ» (СКТБ «Наука», Красноярск) [11]. Хемилюминесцентная кинетика генерации АФК при респираторном взрыве в суспензии клеток крови в ответ на введение антигена представляет собой куполообразную кривую, характеризующуюся параметрами: I_{\max} (имп/с) — амплитуда максимальной активности хемилюминесцентной реакции, T_{\max} (мин) — время достижения максимума и S (имп) — площадь под кривой хемилюминесценции за 120 мин, определяющая общее количество АФК, генерируемое клетками за время записи хемилюминесцентной кривой. Кинетика процесса генерации АФК (супероксиданиона, гидроперекиси, гидроксила, гипохлоританиона) в ответ на антигенное внедрение *in vitro* характеризует физиологически обусловленный потенциал реакции системы неспецифической резистентности на чужеродные агенты и отражает активность функционирования не только каскадно включающихся про- и антиоксидантных ферментов клеточных мембран фагоцитирующих клеток, но и всей совокупности про- и антиоксидантных факторов периферической крови [1, 2, 11, 14, 16].

Сравнивали результаты исследований, полученные в годы с разным уровнем наполнения водохранилища водой (м). Маловодными годами (максимальный уровень воды у плотины (H_{\max}) до 236 м) были 2002, 2003, 2008-й, средневодными (H_{\max} до 238 м) — 2000, 2005, 2007, 2009-й и многоводными (H_{\max} до 246 м) — 2001, 2004 и 2006-й. Концентрацию растворенного в воде кислорода определяли методом Винклера [12]. Полученные результаты обработаны статистически по общепринятым методикам [6] в программе Excel.

Результаты исследований и их обсуждение

В Красноярском водохранилище доминируют рыбы семейства окуневых — окунь *Perca fluviatilis* и карповых — лещ *Abramis brama* и плотва *Rutilus ru-*

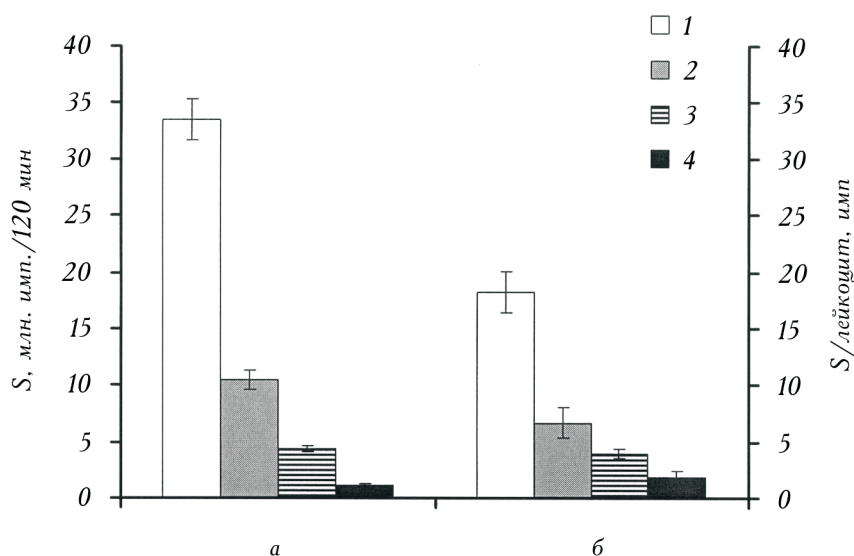


1. Динамика доли (по численности) разных видов рыб в уловах в средней части Красноярского водохранилища. Здесь и на рис. 2—4: 1 — лещ; 2 — плотва; 3 — окунь; 4 — щука.

tilus [9]. В последнее десятилетие средний участок водохранилища характеризуется сезонно стабильным органо-минеральным режимом, видовым составом и биомассой фито-, бактерио- и зоопланктона [9]. В то же время вклад различных видов рыб в ихтиоценоз этой части водохранилища заметно изменяется (рис. 1).

При наличии межвидовых особенностей продукции АФК в крови при антигенной активации *in vitro* (рис. 2) у исследованных рыб выявлена слабо выраженная межгодовая динамика кислородного метаболизма клеток крови. Общий объем генерации АФК (S , млн. имп/120 мин) в летний сезон 2000—2009 гг. у леща изменялся от $10,22 \pm 2,31$ до $41,55 \pm 5,45$, плотвы — от $1,89 \pm 0,39$ до $18,2 \pm 2,26$, окуня — от $1,02 \pm 0,14$ до $7,51 \pm 0,59$, щуки — от $0,38 \pm 0,06$ до $3,98 \pm 1,23$. Исключение составляли 2000 и 2005 гг., когда наблюдали резкий всплеск генерации АФК (в 2000 г. у леща до $60,66 \pm 13,37$, плотвы — $33,69 \pm 7,20$, в 2005 г. у плотвы — до $32,25 \pm 7,91$, окуня — $19,59 \pm 2,00$, щуки — $9,35 \pm 1,92$).

Более выраженной является сезонная, ежегодно повторяющаяся динамика параметров кинетики генерации АФК антигенактивированными клетками, характерная для всех обследованных видов рыб (рис. 3). Ее особенностью является достоверно ($P < 0,01$ при расчетных значениях критерия Стьюдента 3,25—10,70 против табличных 2,01—1,96 [6]) низкий уровень продукции АФК (у плотвы $1,02 \pm 0,14$ млн. имп/120 мин, леща — $10,22 \pm 2,31$, окуня — $1,99 \pm 0,39$ и щуки $0,38 \pm 0,06$ млн. имп/120 мин) в первой половине июня, совпадающий с наиболее низкими температурами летнего сезона и периодом нереста. Аналогичное снижение защитных показателей иммунитета в период нереста, а именно бактерицидной активности сыворотки крови, отмечается и у других видов рыб [13], что является одной из основных причин их подверженности заражению в это время. В период завершения



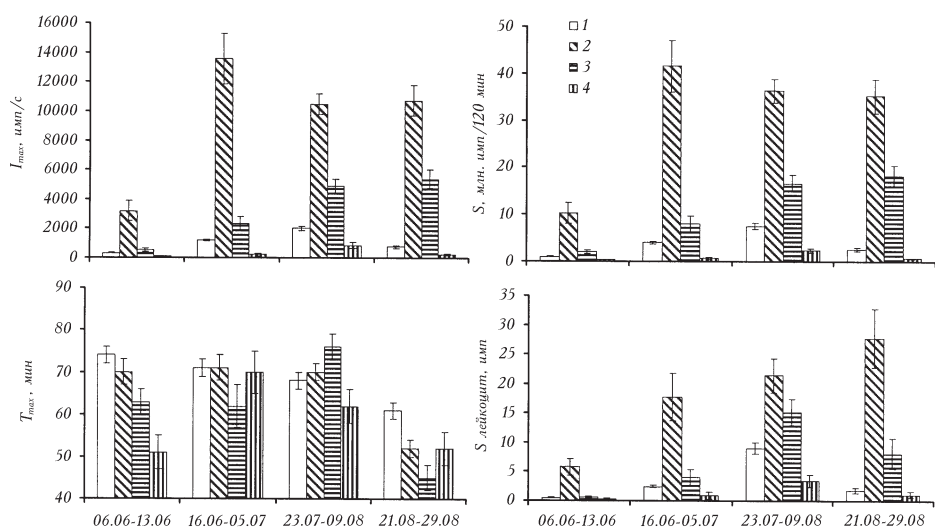
2. Общий (а) и удельный (б) объем продукции АФК антигенактивированными *in vitro* клетками периферической крови рыб.

нереста, в конце июня — начале июля, наблюдалось 2—3-кратное увеличение продукции АФК, у плотвы, окуня и щуки этот показатель приближался к среднемноголетнему значению (соответственно $10,5 \pm 0,9$, $4,4 \pm 0,3$ и $1,1 \pm 0,2$), у леща — превышал его ($34,1 \pm 1,9$). Возрастание продолжалось в течение июля, у плотвы — и августа, с характерным сокращением времени достижения максимума хемилюминесцентной кривой у карповых рыб к концу лета, что свидетельствует об увеличении активности прооксидантных факторов клеток крови.

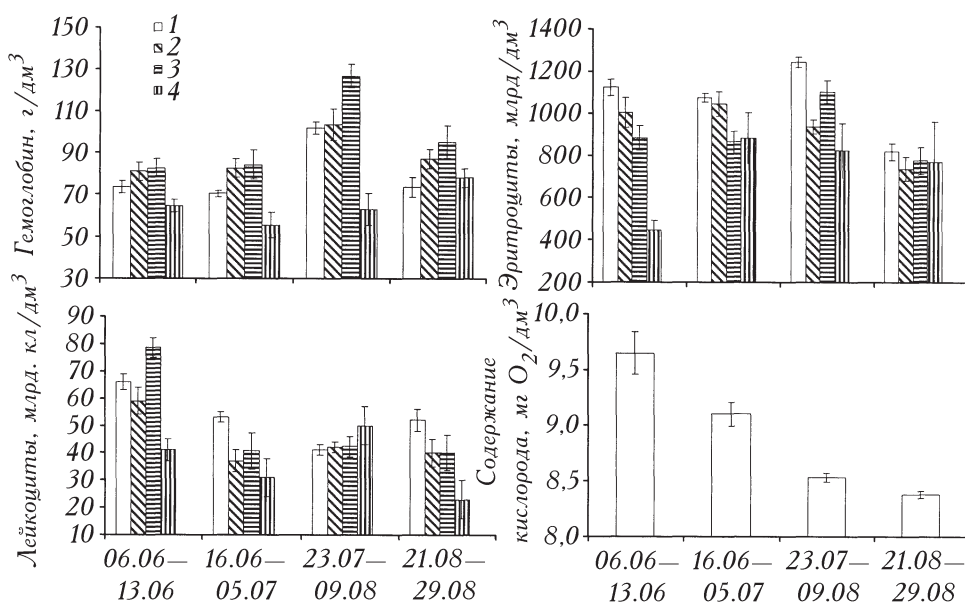
Содержание гемоглобина в периферической крови плотвы, леща и окуня в летний период достоверно увеличивалось в конце июля — начале августа (рис. 4), что совпадало с периодом максимального прогрева воды (до 22°C в поверхностном слое, на мелководье — до $24\text{—}26^\circ\text{C}$ [4]), а также снижением содержания растворенного кислорода в воде.

Численность эритроцитов у окуня и плотвы достигала наибольших значений также в июле — августе, у леща и щуки — в начале июля. Эта закономерность отмечается у разных видов рыб в период нагула и характеризуется как гомеостатический механизм повышения потребления кислорода за счет увеличения количества эритроцитов и дыхательного пигмента в них [9] на фоне снижения содержания кислорода в воде (см. рис. 4, таблицу). Очевидно, возрастание содержания кислородтранспортного белка и его клеток-носителей вносит свой вклад в увеличение объема продукции АФК. У обследованных видов рыб, кроме щуки, к концу августа отмечалось уменьшение численности эритроцитов ниже среднемноголетних в летний сезон.

Наибольшие значения численности лейкоцитарной фракции периферической крови окуня, леща и плотвы отмечены в начале июня в период нере-



3. Динамика кинетики генерации АФК антигенактивированными *in vitro* клетками крови рыб.



4. Динамика среднегодовых гематологических показателей рыб и содержания растворенного в воде кислорода средней части Красноярского водохранилища в летний период.

ста (см. рис. 4). Однако удельная активность генерации АФК ($S/\text{лейкоцит}$) в это время была минимальной и повышалась до максимальной только к концу июля — августу (см. рис. 3). При этом у всех особей окуня внутрисезонная динамика продукции АФК коррелирует ($r = 0,87$ против $r_{\text{табл}} = 0,8$ при

Содержание растворенного кислорода в воде Красноярского водохранилища в летний период при различных уровнях водонаполненности

Уровень наполненности	Содержание растворенного кислорода, мг O ₂ /дм ³			
	06.06—13.06	16.06—05.07	23.07—09.08	21.08—29.08
Среднемноголетнее значение	9,65 ± 0,19 (n = 26)	9,10 ± 0,11 (n = 21)	8,53 ± 0,04 (n = 41)	8,38 ± 0,03 (n = 12)
Маловодный	10,06 ± 0,24 (n = 10)	8,90 ± 0,11 (n = 12)	8,53 ± 0,04 (n = 10)	8,42 ± 0,08 (n = 4)
Средневодный	9,39 ± 0,24 (n = 16)	×	8,39 ± 0,09 (n = 14)	8,31 ± 0,08 (n = 7)
Многоводный	×	9,37 ± 0,19 (n = 9)	8,65 ± 0,06 (n = 17)	8,75 (n = 7)

Примечание. × — не определяли.

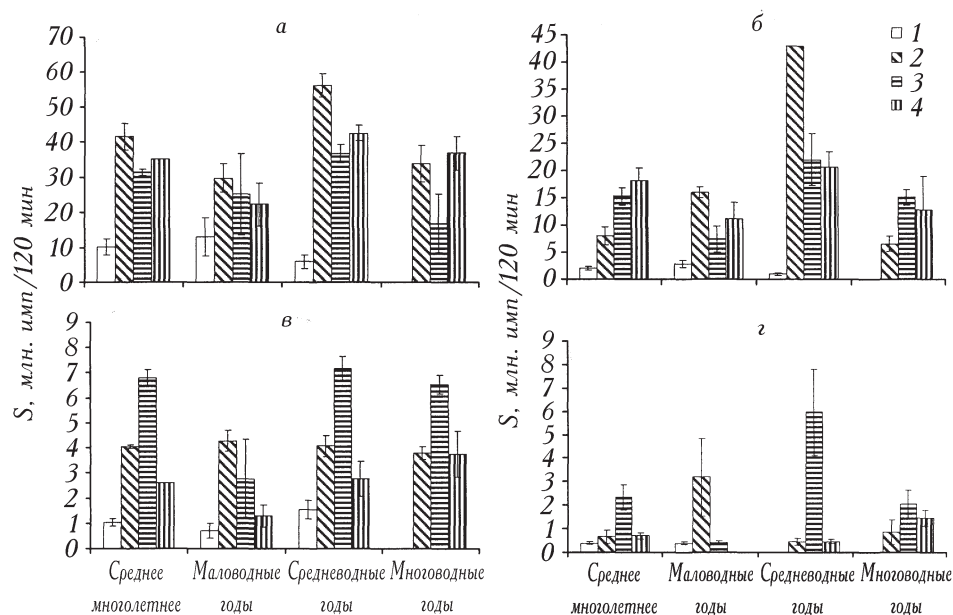
уровне значимости 0,05) с динамикой содержания гемоглобина в крови и с характерным увеличением поставки кислорода в организм с начала июля до середины августа.

Влияние различного режима сброса водохранилищных вод на их качество по гидрологическим, гидрохимическим и биологическим показателям изучено недостаточно. Существенные изменения в колебании уровня воды в водоеме неизменно сказываются на его биологическом и гидрохимическом режиме, закономерно отражаются на поведении рыб, их развитии и размножении [7]. Оценка активности кислородного метаболизма клеток крови различных видов рыб в течение летнего сезона при разных уровнях водонаполненности водохранилища выявила сходные закономерности. Так, при сохранении внутрiletней динамики объема генерации АФК ее значение у карповых рыб было более высоким в средневодные годы начиная с окончания нереста и до конца летнего периода. В маловодные годы для окуня, леща и плотвы характерны заметно более низкие значения *S* (рис. 5), причем у окуня и плотвы в июле — августе они достоверно отличались от таковых в средне- и многоводные годы.

Заключение

Для рыб, обитающих в средней части Красноярского водохранилища, при отсутствии явных токсикантов или экстремальных природных воздействий характерна внутрисезонная динамика кислородного метаболизма клеток неспецифической резистентности. Она определяется эволюционно сложившимися механизмами регуляции физиологического гомеостаза и выражается в интенсификации кислородного метаболизма фагоцитирующих клеток крови в посленерестовый период независимо от содержания растворенного в воде кислорода. Эти закономерности следует учитывать при оценке возможного влияния различных поллютантов.

Уровень водонаполненности водохранилища в летний период не только влияет на сохранение и формирование новых поколений рыб после нереста, но и от-



5. Динамика объема генерации АФК (S) клетками в крови рыб в различные по водности годы: а — лещ; б — плотва; в — окунь; г — щука; 1 — 06.06 — 13.06; 2 — 16.06 — 05.07; 3 — 23.07 — 09.08; 4 — 21.08 — 29.08.

ражается на состоянии неспецифической резистентности половозрелых особей. В средневодные годы в крови карповых рыб отмечена закономерно более высокая продукция АФК, чем в мало- и многоводные, что свидетельствует о повышенной реактивности клеток неспецифической резистентности рыб.

**

Наведено результати моніторингу кількісних і функціональних характеристик клітин периферійної крові рыб середньої частини Красноярського водосховища за період 2000—2009 рр. Сезонна динаміка кисневого метаболізму клітин крові різних видів рыб характеризується подібними змінами їх неспецифічної резистентності у нерестовий та післянерестовий періоди залежно від рівня наповненості водосховища.

**

Paper presents results of monitoring of quantitative and functional characteristics of the peripheral blood cells of different fish species of the middle section of the Krasnoyarsk reservoir over 2000—2009. Intra-seasonal dynamics of the oxygen metabolism of the blood cells of different fishes is characterized by similar changes of their nonspecific resistance in spawning and after spawning periods at different level of water-filling of the reservoir.

**

1. Бахов Н.И., Майчук Ю.Ф., Корнев А.В. Механизмы защиты организма от вирусных инфекций: нейтрофильные лейкоциты // Успехи совр. биологии. — 2000. — Т. 130, № 1. — С. 23—35.
2. Белова Л.А. Биохимия процессов воспаления и поражения сосудов. Роль нейтрофилов // Биохимия. — 1997. — Т. 62, вып. 6. — С. 659—668.
3. Бульон В.В. Первичная продукция и рыбопродуктивность водоемов: моделирование и прогноз // Биология внутр. вод. — 2006. — № 1. — С. 48—56.
4. Вышегородцев А.А., Космаков И.В., Ануфриева Т.Н., Кузнецова О.А. Красноярское водохранилище. — Новосибирск: Наука, 2005. — 212 с.
5. Государственный доклад «О состоянии и охране окружающей среды в Красноярском крае за 2007 год». — Красноярск, 2008. — 266 с.
6. Зайцев Г.Н. Методика биометрических расчетов. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. — М.: Наука, 1973. — 256 с.
7. Заличева И.Н., Волков И.В., Шустова Н.К. и др. Контроль и регламентирование техногенного загрязнения водоемов по индикаторным показателям биоты // Гидробиол. журн. — 2004. — Т. 40, № 2. — С. 48—63.
8. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб (сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб). — М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1982. — 184 с.
9. Красноярское водохранилище: мониторинг, биота, качество вод / Под ред. А.Ф. Алимova, М.Б. Ивановой. — Красноярск: Изд-во Сиб. фед. ун-та, 2008. — 538 с.
10. Лугаськова Н.В. Эколого-физиологические особенности крови сиговых рыб в период нагула в субарктической зоне бассейна реки Оби // Вопр. ихтиологии. — 2003. — Т. 23, № 6. — С. 835—841.
11. Макарская Г.В., Лопатин В.Н., Тарских С.В. Хемилюминесцентный анализ функциональной активности фагоцитирующих клеток крови рыб // Докл. АН. — 2003. — Т. 390, № 3. — С. 420—422.
12. Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов. — М.: Наука, 1975. — 240 с.
13. Микряков В.Р. Актуальные вопросы иммунологии рыб // Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ. — Л.: Наука, 1978. — С. 116—133.
14. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. и др. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. — М.: Наука, 2001. — 126 с.
15. Руднева И.И. Эколого-физиологические особенности антиоксидантной системы рыб и процессов перекисного окисления липидов // Успехи совр. биологии. — 2003. — Т. 123, № 4. — С. 391—400.
16. Stasiak S.A., Baumann P.C. Neutrophil activity as a potential bioindicator for contaminant analysis // Fish & Shellfish Immunology. — 1996. — Vol. 6, N 7. — P. 537—539.

¹ Институт вычислительного моделирования
СО РАН, Красноярск

² Международный научный центр
исследований экстремальных состояний
организма при Президиуме Красноярского
научного центра СО РАН, Красноярск

Поступила 24.03.11