





# РЕАКЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЫБ

на загрязнение воды  
токсикантами  
и закисление среды



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД им. И.Д. ПАПАНИНА

**РЕАКЦИЯ  
ИММУННОЙ  
СИСТЕМЫ РЫБ  
на загрязнение воды  
токсикантами  
и закисление среды**



МОСКВА «НАУКА» 2001

Рецензенты:

доктор биологических наук *Г.А. Виноградов*,  
доктор биологических наук *Т.П. Евгеньева*

Авторы:

*В.Р. Микряков, Л.В. Балабанова, Е.А. Заботкина,*  
*Т.Б. Латерова, А.В. Попов, Н.И. Силкина*

Ответственный редактор

*В.Р. Микряков*

**Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды.** – М.: Наука, 2001. – 126 с.  
ISBN 5-02-005196-9

Монография посвящена вопросам влияния солей тяжелых металлов, фосфорорганических пестицидов, фенолов, полиароматических углеводородов, техногенного загрязнения и закисления воды на структурно-функциональное состояние иммунной системы рыб. Приводятся данные изменений показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета, ультраструктурной организации иммуноцитов, тканей и органов иммунной системы рыб на антропогенные воздействия. Выдвинуто положение, объясняющее механизм взаимодействия иммунной системы рыб с токсическими факторами среды.

Для иммунологов, экологов, биологов и специалистов, работающих в области охраны окружающей среды, ветеринарии и медицины.

ТП 2001-II

**Reaction of fish immune system to acidification and contamination of water by toxicants.** – Moscow: Nauka, 2001 – 126 p.  
ISBN 5-02-005196-9

The monography presents a generalized work on the effect of salts of heavy metals, phospho-organic pesticides, phenols, polyaromatic hydrocarbons, technogenic contamination and acidification of water on a structure-functional state of fish immune system. On a basis of the analysis of parameters cell of and humoral parts of immunity, ultrastructural organization of immunocytes, tissues and organs the reaction of fish immune system to the influence of different by nature anthropogenic factors is analyzed.

The position explaining the mechanism of fish immune system interreaction with the toxic factors of the environment is advanced.

The monography will be interesting not only for immunologists, ecologists, biologists, but also experts working in the area of environmental protection, veterinary medicine and medicine.

ISBN 5-02-005196-9

© Издательство "Наука", 2001

# ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
<i>Глава первая</i>	
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ИМУННОЙ СИСТЕМЫ РЫБ .....	6
Клетки, ткани и органы иммунной системы рыб .....	6
Гуморальные факторы иммунитета .....	12
Современные представления о характере реагирования иммунной системы рыб на токсические факторы .....	15
<i>Глава вторая</i>	
РЕАКЦИЯ ИМУННОЙ СИСТЕМЫ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ПЕСТИЦИДОВ И СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ .....	18
Материалы, методы и условия постановки опытов .....	18
Влияние карбофоса на структурно-функциональное состояние иммунной системы рыб .....	20
Влияние некоторых солей тяжелых металлов на клеточные и гуморальные факторы иммунитета .....	64
<i>Глава третья</i>	
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕНОЛА НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ ИМУННОЙ СИСТЕМЫ РЫБ .....	79
Влияние фенола на гуморальные факторы иммунитета рыб .....	79
Реакция клеточного звена иммунитета рыб на воздействие фенола .....	81
Влияние фенола на состояние антиоксидантной системы и процессы свободнорадикального перекисного окисления липидов в тканях и органах лимфоидного комплекса .....	88



РЕАКЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЫБ НА ТЕХНОГЕННОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ВЕРХНЕЙ ВОЛГИ И ЗАКИСЛЕНИЕ ОЗЕР ДАР- ВИНСКОГО ЗАПОВЕДНИКА .....	94
Реакция иммунной системы рыб на аварийное поступление сточных вод промышленных предприятий г. Череповца .....	94
Оценка отдаленных последствий влияния загрязнения на иммунный статус рыб .....	98
Иммунофизиологическое состояние рыб из закисленных водоемов Дар- винского заповедника .....	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	111
Литература .....	113

## ВВЕДЕНИЕ

В 1987 г. произошла катастрофа на металлургическом комбинате в г. Череповце, которая привела к массовой гибели рыб в Рыбинском водохранилище. Загрязнение токсикантами экосистемы водохранилища и его последствия были столь значительными, что, в 1990 г. на базе Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН была проведена школа-семинар по экологической и эволюционной иммунологии. В ее работе приняли участие многие ведущие специалисты в области иммунологии, токсикологии и экологии. Ученые составили программы по преодолению последствий катастрофы. Результаты работ по этим программам обобщены в книге.

Стремительный рост антропогенных нагрузок и возрастающее загрязнение водоемов отрицательно сказываются на физиологическом состоянии рыб, степени устойчивости их к инфекционным и инвазионным болезням, вследствие чего снижаются темпы роста рыб, а случаи массовых заболеваний и гибели, наоборот, учащаются. Все это свидетельствует о глубоких изменениях в иммунной системе, приводящих к появлению в популяциях рыб иммунодефицитных особей.

Разработка природоохранных мероприятий, мониторинг состояния здоровья рыб, оценка последствий влияния отходов промышленных предприятий на иммунный статус рыб, индикация содержания загрязняющих веществ в тканях и органах невозможны без всестороннего исследования влияния токсических веществ на иммунную систему. Такое исследование представляет существенный интерес для понимания роли иммунной системы в адаптации к меняющимся условиям среды обитания.

Настоящая работа посвящена обобщению результатов многолетних исследований лаборатории иммунологии по изучению влияния солей тяжелых металлов (на примере  $Cd$ ), фосфорорганических пестицидов (на примере карбофоса), фенола. Исследовались концентрации токсичных соединений, влияющие на ихтиофауну вод Рыбинского водохранилища, загрязненных отходами промышленных предприятий г. Череповца и на ихтиофауну закисленных вод озер Дарвинского заповедника.

Целью работы было обобщение результатов экспериментальных и полевых исследований по влиянию различных по происхождению антропогенных факторов на иммунный статус рыб, по данным анализа специфических и неспецифических реакций: гуморальных, клеточных факторов иммунитета, а также по состоянию иммунокомпетентных органов.

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЫБ

### КЛЕТКИ, ТКАНИ И ОРГАНЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЫБ

Функцию защиты организма рыб от генетически чужеродных тел, в том числе возбудителей инфекционных и инвазионных болезней и видоизмененных тканей собственного организма, выполняет иммунная система. От функционального состояния механизмов иммунитета зависят биологическое постоянство внутренней среды, структурная целостность организма и степень сопротивляемости рыб к возбудителям инфекционных и инвазионных болезней. Выживаемость рыб в онтогенезе при воздействии на них неблагоприятных факторов среды обеспечивается благодаря деятельности иммунной системы. Функцию распознавания "своего" и "чужого" в организме рыб выполняют клеточные и гуморальные звенья иммунной системы (Лукьяненко, 1971, 1987; Микряков и др., 1974; Микряков, Балабанова, 1979; Микряков, 1978, 1991; Галактионов, 1995; Купер, 1980 и др.).

Местом образования защитных структур являются: тимус, селезенка, печень, скопления лимфоидной ткани в области головного (пронефроса) и туловищного (мезонефроса) отделов почек, черепной коробки, перикарда, вдоль стенки кишечника, Лейдигова и эпигонального органов.

Морфо-функциональными исследованиями показано, что рыбы, занимающие разное систематическое положение, отличаются между собой по характеру расположения лимфоидной, лимфомиелоидной ткани и органов (Рис. 1). У хрящевых рыб скопления лимфомиелоидной ткани, в основном, встречаются в Лейдиговом и эпигональном органах, в области почек и черепной полости, у хрящевых и костных ганоидов – в черепной коробке, почках, области перикарда и кишечника, тогда как у костистых – в головной и туловищной почках, печени и кишечнике. Тимус у высших позвоночных, считается одним из центральных органов иммунной системы, контролирующей и регулирующий функционирование клеточного звена иммунитета (Петров, 1987; Галактионов, 1995). Эволюция тимуса у рыб проходила в сторону морфологического обособления органа от скоплений лимфоцитоподобных клеток в мышцах заднего неба у круглоротых (Купер, 1980; Ланге и др., 1990; Good et al., 1966) к хорошо развитому отдельному органу у челюстноротых (Good et al., 1966; Fange, Sundell, 1969), хрящевых (Галактионов, 1995) и кости-

стых (Secombes, Manning, 1982; Secombes et al., 1983; Fange, 1984). Форма, размеры и функции тимуса зависят от возраста и вида рыб. По данным Пейджа и Ровлея (Page, Rowley, 1984) тимусэктомия у взрослых костистых не оказывает влияния на отторжение аллотранспланта, тогда как у мальков тилапии 4- и 2-месячного возраста удаление тимуса задерживает или полностью подавляет отторжение аллотранспланта. Тимус считают ответственным за созревание Т-лимфоцитов, но отмечают и способность его к продукции антител (Zapata, 1981; Pulsford, Fange, 1983).

Почки – один из основных компактных органов иммунной системы, которые присутствуют у всех видов рыб. Это место активного гемопоэза у круглоротых (Ardavin, Zapata, 1987), хрящевых и костных ганоидов (Gambarian, 1988). У костистых почки состоят из двух отделов: переднего (головного) и туловищного, расположенных дорсально в виде полосы ткани, прикрепленной мезотелием к стенке полости тела. Обе части обладают гемопоэтической активностью, но в передней почке она выражена наиболее сильно, к тому же в этом отделе отмечают полное исчезновение ренальных тубул (Румянцев, 1939; Суворов, 1948; Лозовой, Шергин, 1981; Заварзин, 1985; Temmink, Bayne, 1987; Gambarian, 1988). В почках костистых не отмечено четкого разделения на красную и белую пульпу, хотя отмечают тенденцию скоплений лимфоидных клеток занимать определенные области. Паренхиму органа образуют разветвленные ретикулярные клетки, некоторые из которых обладают фагоцитарной способностью (Zapata, 1979, 1981; Finco-Kent, Thune, 1987; Sovenyi, Kusuda, 1987; Temmink, Bayne, 1987; Gambarian, 1988; Meseguer et al., 1990; Temmink, 1985). Головная почка участвует в производстве всех типов иммунокомпетентных клеток, поскольку в ткани органа присутствуют все типы клеток лимфо-миелоидной ткани на разных стадиях развития (Микряков, 1991; Secombes et al., 1983).

Туловищная почка, наряду с иммунной, выполняет мочевыделительную функцию, и клетки гемопоэтической ткани расположены в синцитии ретикулярной ткани между петлями нефронов и выделительными каналами. Нефрон костистых рыб мезонефрический и состоит из Боуменовой капсулы и почечных канальцев, в которых отчетливо выделяются проксимальный и дистальный отделы (Румянцев, 1939; Gambarian, 1988).

Селезенка рыб является основным органом иммунной системы. У круглоротых она присутствует как отдельная структура в подслизистой кишечника, содержащей гемопоэтическую ткань (Ardavin, Zapata, 1987; Галактионов, 1995), у пластиножаберных и костистых – как отдельный компактный орган, форма и размеры которого видоспецифичны. У некоторых видов рыб ткань селезенки разделена на красную и белую пульпу, эллипсоиды, но белая пульпа недостаточно развита и расположена преимущественно диффузно или вокруг артериол (Ellis, 1980; Zapata, 1981; Agius, Roberts, 1981; Fange, 1984; Fange, Nilsson, 1985; Herraez, Zapata, 1986; Micali, Perdichizzi, 1990; Quesada et al., 1990; Espen-ses et al., 1995). Бесспорно, присутствие в селезенке Т- и В-клеточных популяций лимфоцитов, что показано опытами с митогенами на раз-

личных видах рыб (Blaxhall, 1983; Микряков, Степанова, 1983). В селезенке плотвы и пескаря были обнаружены скопления макрофагов, лимфоцитов и плазматических клеток. Подобные скопления у млекопитающих считают важными для клеточной кооперации в иммунном ответе (Бернет, 1980; Азнаурян, Бахшиян, 1985; Манько, Хайтов, 1985; Маянский, 1986; Пестова, Четвертных, 1990). Запата (Zapata, 1983) отмечал, что некоторые авторы не считают селезенку необходимым органом иммунной системы рыб, мотивируя это тем, что сплинэктомия, по их наблюдениям, не влияет на антителопродуцирование против БСА у некоторых видов рыб. Антигенсвязывающие и антителопродуцирующие клетки были обнаружены в селезенке радужной форели, золотой рыбки, ушастого окуня и тилапии (Blaxhall, 1983). Селезенку считают основным местом эритро- и тромбопоэза у рыб, но отмечают ее слабую лимфо-, грануло- и плазмопоэтическую активность (Микряков, Балабанова, 1979). У большинства рыб селезенка обладает фагоцитарной активностью в отношении микробов и старых клеток крови, служит "депо" эритроцитов (Fänge, Nillssen, 1985). Ряд авторов отмечают изменение индекса селезенки и размеров мелано-макрофагальных центров в зависимости от стадии жизненного цикла, сезона, питания и качества вод (Agius, Roberts, 1981; Микряков, 1991; Балабанова, Лапинова, 1994; Naaranta et al., 1995).

Печень рыб в виде отдельного органа присутствует у всех видов рыб. Как у млекопитающих, она многофункциональна и принимает активное участие в процессах переваривания пищи, синтезе белков плазмы крови, сохранения гомеостатического баланса, детоксикации, аккумуляции антигенов и выведения их из организма (Хэм, Кормак, 1983; Микряков, 1991; Арцимович и др., 1992; Маянский, 1992).

Соединительная ткань присутствует в печени в очень незначительных количествах. Гепатоциты составляют 95% от массы органа.

Гепатоциты печени рыб, подобно таковым млекопитающих, организованы как тубулы (Hampton et al., 1988). При этом базальные части гепатоцитов направлены к синусоидам, а апикальные образуют стенки начальной части билиарной системы – желчных канальцев. Синусоиды выстланы фенестрированным эндотелием. Лимфомиелоидная ткань располагается в виде прослойки по ходу желчных протоков и вокруг стенок более крупных венозных веток (Румянцев, 1939; Хэм, Кормак, 1983; Hinton, Pool, 1976; Kon et al., 1987; March, Reisman, 1995; Rocha et al., 1994 a, b, 1995, 1996, 1997). У карповых по ходу более крупных желчных протоков располагаются участки поджелудочной железы, врастая в печень (Румянцев, 1939).

Кроме описанных выше органов, иммунная система представлена диффузными скоплениями лимфомиелоидной и лимфоидной ткани.

Небольшие некапсулированные кишечные скопления лимфомиелоидной ткани костистых находятся в области базальной части интестинального эпителия и состоят из малых и средних лимфоцитов, незрелых и зрелых плазматических клеток, некоторого количества базофилов, гетерофилов, ПАС-положительных гранулоцитов и многочисленных макрофагов (Гаряева, 1979; Goldstine et al., 1975; Hart et al., 1987; Van den Berg, 1989).

Отдельные скопления лимфоидной ткани встречаются у круглоротых, хрящевых и хрящевых ганоидов в черепной полости и над хордой. У взрослых миног описан супраневральный орган, образованный тяжем лимфомиелоидной ткани над спинной хордой (Good et al., 1977). У хрящевых и костных ганоидов обнаружены скопления гранулопоэтической ткани, подобной костному мозгу высших позвоночных, над и вокруг передней части спинного и продолговатого мозга (Fänge, 1984).

У многих хрящевых рыб (например, у больших акул) стенка пищевода содержит обширные скопления лимфоидной ткани, достигающие, иногда веса 1–2 кг. Эти разросшиеся ткани называются – Лейдигов орган. Клетки, составляющие этот орган, относятся к гетеро- и эозинофилам на разных стадиях развития.

Скопления лимфомиелоидной ткани у хрящевых находятся около гонад и называются эпигональным органом, который онтогенетически развивается в генитальной складке, а у взрослых рыб располагается в гонадном мезентерии (Fänge, Mattison, 1981). Эпигональный орган имеет обильное венозное кровоснабжение и обладает грануло- и лимфопоэтической активностью (Zapata, 1981).

Значительные лимфоидные образования присутствуют на поверхности сердца осетровых и состоят главным образом из лимфоцитов, макрофагов, отдельных эозинофилов. По данным Клаусона с соавторами (Clawson et al., 1966) установлено, что объем перикардиальных лимфомиелоидных скоплений увеличивается при повторных инъекциях рыбам антигенного материала бактериальной или паразитарной природы. Данные наблюдения позволили авторам сделать вывод о возможной антителообразовательной способности этого органа.

Структурная организация иммунной системы рыб отличается от таковой высших позвоночных. У них нет лимфатических узлов, костного мозга и Фабрицевой сумки (как это имеет место у птиц). Функцию лимфатических узлов и костного мозга у рыб выполняют скопления лимфоидной и лимфо-миелоидной ткани, расположенные в области proneфроса, мезонефроса, черепной коробки и селезенки, а также эпигональный и Лейдигов органы. В иммунокомпетентных тканях и органах рыб происходит образование клеток, выполняющих функции распознавания "своего" и "чужого", разрушение и нейтрализация чужеродных тел, синтеза антител, медиаторов иммунного ответа, неспецифических механизмов защиты и т.д. Исследованиями показано, что клетки иммунной системы рыб неоднородны, также по их структурной организации и характеру выполняемых ими функций (Лукьяненко, 1971; Микряков, 1991; Микряков, Балабанова, 1979; Zapata, 1981 и др.). К иммунокомпетентным клеткам рыб принято относить все клетки лимфоидно-макрофагальной системы: лимфоциты, плазмоциты, гранулоциты, макрофаги, эндотелиоциты, клетки Купфера, естественные киллеры и т.д.

По характеру выполняемой ими функции они подразделяются на антигенраспознающие, антигенразрушающие, антителосинтезирующие, клетки "памяти". Иммунокомпетентные клетки также осуществляют синтез медиаторов иммунного ответа, цитокинов, интерферона,



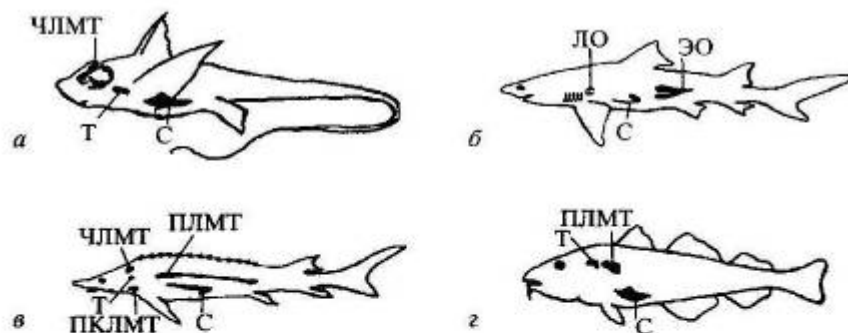


Рис. 1. Расположение лимфоидной ткани у челюстноротых рыб *Gnathostomata* (по Fänge, 1982)

А – Химеры, Б – Пластинкожаберные, В – Ганоидные, Г – Костистые. ЛО – Лейдигов орган, ПКЛМТ – перикардальная лимфоидная ткань, ПЛМТ – почечная лимфоидная ткань, С – селезенка, Т – тимус, ЧЛМТ – черепная лимфоидная ткань, ЭО – эпигональный орган.

лизосома и лизосомальных ферментов и т.д. Основными клетками организма рыб, определяющими работу иммунной системы и синтезирующими большинство иммунологических молекул, в том числе специфических антител, являются лейкоциты, во всем многообразии их популяций и субпопуляций. Лейкоциты рыб представлены разнообразными по структуре и характеру выполняемой функции клетками: лимфоцитами, моноцитами, нейтрофилами, эозино- и базофилами (Иванова, 1983, 1995). Состав лейкоцитов у различных видов отличается в зависимости от высоты организации и экологии в которой существуют особи (Иванова, 1983, 1985; Головина, Тромбицкий, 1989; Балабанова, 1997 и др.). Лейкоциты рыб, в отличие от высших позвоночных, в основном представлены лимфоцитами, тогда как у теплокровных – клетками нейтрофильного ряда. У рыб на долю лимфоцитов приходится 45–99% клеток от общего числа лейкоцитов, а у высших позвоночных – 25–30%. Соответственно, у рыб в 1 мл крови лимфоцитов содержится в 5–10 раз больше, чем у человека и животных (Иванова, 1983, 1995; Головина, Тромбицкий, 1989), тогда как на долю гранулоцитов, представителями которых являются нейтро-, эозино- и базофилы, приходится гораздо меньшее число клеток (в пределах 1–45%).

Центральной фигурой иммунной системы рыб, как и представителей других классов позвоночных, является лимфоцит. Лимфоциты рыб по характеру выполняемых функций, содержанию мембранных иммуноглобулиновых рецепторов, продолжительности жизни, гистогенезу, гетерогенны и подразделяются на две субпопуляции. Условно их обозначают как Т- и В-лимфоциты (Микряков, 1991).

Т-лимфоциты в организме рыб осуществляют распознавание “своего” и “чужого”, участвуют в отторжении трансплантата, презентации антигена макрофагам, обладают цитотоксической активностью и т.д. Эти клетки образуются в тимусе и относятся к долгоживущим клеткам.

Популяция В-лимфоцитов выполняет функцию синтеза антител и образования предшественников антителообразующих клеток. Они относятся к короткоживущим клеткам. Т- и В-лимфоциты отличаются между собой и характером взаимодействия с митогенами и чужеродными телами.

Субпопуляционная структура Т-лимфоцитов по сравнению с таковыми у высших позвоночных разработана недостаточно. Важную роль в реализации иммунологических функций выполняют и другие типы или популяции лейкоцитов: гранулоциты и моноциты. Они участвуют в фагоцитозе микроорганизмов, синтезе цитокинов, медиаторов иммунного ответа, неспецифических факторов иммунитета: лизоцима, интерферона, гемолизина, хитиназы и т.д. (Маянский, Маянский, 1983; Галактионов, 1986, 1998 и др.). Морфологическими исследованиями установлено, что лимфоциты рыб по размеру подразделяются на малые и большие, размеры которых колеблются от 4,80 до 9,70 мкм. Весь объем клетки занимает округлое или слегка овальное ядро с ядрышком. Цитоплазма представлена узким ободком. Отличительные черты малых лимфоцитов – небольшие размеры и высокое ядерно-цитоплазмическое соотношение. У больших лимфоцитов меньшее, чем у малых, ядерно-цитоплазматическое отношение и менее плотные скопления гетерохроматина в ядре.

Особое место среди иммунокомпетентных клеток рыб занимают плазматические клетки, основной функцией которых являются синтез и секреция иммуноглобулинов. В цитоплазме этих клеток хорошо развита сеть гранулярного эндоплазматического ретикулума, на рибосомах которого происходит синтез иммуноглобулинов. Для макрофагов характерно наличие крупных фагосом и крупных гранул типа лизосом в цитоплазме.

Лимфоциты, плазматические клетки и макрофаги имеют сходное строение у всех видов рыб, различаясь только размерами.

Полного соответствия гранулоцитов у разных видов рыб и млекопитающих нет. У карпа были обнаружены 3 типа гранулоцитов, как у млекопитающих. Все другие виды рыб, изученные нами, имели 2 типа гранулоцитов, I и II типов. Гранулоциты I типа наиболее многочисленны, по аналогии с млекопитающими они обычно называются нейтрофилами. У разных видов рыб нейтрофилы отличаются тонким строением нейтрофилов и формой эксцентрично расположенного ядра, а также формой и структурой гранул. Гранулы у всех видов рыб, кроме караса, удлиненные, длина превышает ширину в 2,5–3,5 раза. Гранулы нейтрофилов карповых рыб имеют палочковидное включение, состоящее из чередующихся темных и светлых волос. Гранулоциты рыб, – это, вероятно, не сформировавшиеся до конца типы клеток, которые претерпевают в процессе формирования морфологические и функциональные изменения. Морфологическое разнообразие этих клеток у разных видов рыб: неодинаковое количество типов гранулоцитов, некоторые различия в строении гранул нейтрофилов, наличие у карпа гранулоцитов с эозинофильными и базофильными гранулами, – подтверждает наши предположения.

Непосредственное участие в защите рыб от патогенных факторов среды и в поддержании биологического постоянства внутренней среды принимают гуморальные компоненты иммунной системы. К гуморальным иммунным компонентам относятся самые разнообразные иммунологически активные молекулы, от простейших до весьма сложных. Они вырабатываются иммунокомпетентными и другими клетками, и принимают активное участие в защите организма от чужеродного или дефектного "своего". Среди них особо выделяют вещества белковой природы – иммуноглобулины, систему комплемента, ферменты: лизоцим, интерферон, острофазные белки (С-реактивный белок – СРБ), хитиназу, трансферрин, пропердин, лектины и т.д. (Лукьяненко, 1971, 1989; Купер, 1980; Микряков, 1991; Вихман, 1996; Галактионов, 1995; Козиненко и др., 1999; Ellis, 1980; Rijkers, 1982 и др.).

Важная роль в защите рыб от патогенных раздражителей и возбудителей болезней принадлежит клеткам кожи, слизи, покровов тела, жабр и кишечного тракта. Гуморальные факторы защиты от генетически чужеродных субстанций подразделяются на специфические и неспецифические – врожденные. Функционально последние отличаются своей активностью по отношению к разным по специфичности и происхождению патогенным и непатогенным организмам и субстанциям. Неспецифические факторы защиты в организме выполняют функции нейтрализации и лизиса чужеродных тел. Наиболее полно среди рыб Верхней Волги изучены особенности содержания комплемента, пропердина, лизоцима, естественных антител и бактерицидные свойства сыворотки крови.

Комплемент представляет собой многокомпонентный комплекс белков сыворотки крови и участвует в реализации многих иммунологических функций: активации иммунокомпетентных клеток, цитолизе и опсонизации чужеродных клеток, взаимодействии антигена с антителом и т.д. Структурно комплемент рыб состоит не менее чем из 9 компонентов: C1, C2, C3, C4 и т.д. (Козиненко с соавт., 1999). В макрофагах синтезируется большая часть из 12 компонентов комплемента. Под влиянием компонентов комплемента осуществляется лизис эритроцитов и грамотрицательных бактерий.

Активация гемолитических свойств комплемента осуществляется классическим или альтернативными путями.

Классический путь всегда антителозависимый. Активация комплемента по классическому пути инициируется образованием комплекса антиген – антитело.

Активации комплемента по альтернативному пути осуществляется без присутствия антител и происходит под действием липополисахаридов, эритроцитов кролика, зимозана, инсулина и других факторов.

Комплементарная активность гуморальных факторов иммунитета, как правило, оценивается по гемолитической активности сыворотки крови. В качестве тест-объекта, для определения активности комплемента по классическому пути, используются эритроциты барана, а по

альтернативному – эритроциты кролика. Сравнительный анализ уровня содержания комплемента, проведенный Лукьяненко (1971, 1989), позволял выявить снижение активности комплемента по мере филогенетического развития рыб на уровне крупных таксономических категорий. Вместе с тем, активность комплемента у различных отрядов рыб, расположенных в верхней половине филогенетического ряда (карповые, тресковые и окуневые) сходна. Для рыб, обитающих в водоемах Верхней Волги, отмечен чрезвычайно большой диапазон индивидуальной изменчивости (Лукьяненко, 1989). Индивидуальная изменчивость активности комплемента среди карповых рыб между максимумом и минимумом колебалась от 4,5 до 10-кратной величины, а у окуневых различие между кратными величинами оказалось равным 11 и 20. Рядом исследований показано, что сыворотка крови рыб обладает высокими литическими свойствами против эритроцитов многих видов позвоночных и имеет бактерицидную активность (Legler et al., 1967, цит. по Козиненко с соавт., 1999). Комплементарная активность сыворотки крови рыб подвержена онтогенетической и сезонной изменчивости (Лукьяненко, 1989). При воздействии неблагоприятных для жизнедеятельности рыб факторов, таких как инфекционные болезни (Балахнин, Куровская, 1995) и пестициды (Зимин, 1981) содержание комплемента в сыворотке крови снижается. Биологическая активность комплемента после обработки сыворотки крови при температуре 40°C и выше полностью исчезает. Его активность зависит также от присутствия в среде ионов кальция и магния (Козиненко и др., 1999). Обработка сыворотки крови проназой, липополисахаридом или зимозаном приводит к существенному снижению активности комплемента (Naka, Yano, 1988, цит. по Козиненко и др., 1999).

Одним из важных факторов врожденного иммунитета, определяющих биологическую активность сыворотки, является пропердин (Лукьяненко, 1989; Козиненко и др., 1999). Пропердин определяет бактерицидное и вирусолитическое действие сыворотки крови и отражает напряженность естественного иммунитета. Биологическая активность данного фактора иммунитета зависит от присутствия 4-х компонентов (C1, C2, C3, C4) и ионов магния. Содержание пропердина у рыб и уровень его активности подвержены индивидуальной изменчивости. На примере 14 видов костистых рыб В.И. Лукьяненко (1989) выявлено, что исследуемые виды отличаются по содержанию пропердина и подразделяются на три условные группы. Пропердинсодержащих рыб в 1-й группе было меньше всего среди окуней и судаков – 8,1–16,6%, у рыб 2-й группы – щуки, плотвы, карпа, леща, карася, ручьевой и радужной форели и густеры – он обнаружен в пределах 20,6–35,4%. Частота встречаемости данного фактора иммунитета среди синца, пикши, язя и налима (3-я группа) равнялась 41,6–50%. Исследуемые виды рыб отличались между собой также активностью пропердиновой системы отдельных особей (Лукьяненко, 1989).

Существенная роль в защите организма рыб от чужеродных тел принадлежит лизоциму. Лизоцим – это антибактериальный фермент, относящийся к группе гликозидаз. Биологическое действие на бактерии



лизосом осуществляет путем гидролиза гликозидных связей полисахаридных комплексов на стенках бактерий, вызывая разрушение муреинового слоя и лизис клетки. Функция лизосима в организме животных не ограничивается защитой от бактериальной инфекции. Он участвует в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки клеток, стимулирует функцию антителообразования и т.д. (Бухарин, Васильев, 1974). Клетки гранулоцитарного ряда – нейтрофилы поставляют лизосим в ткани, органы и в кровь. На основе анализа содержания лизосима в кишечном тракте карпа Ястюгинене Р.М. и Лубянскинене В.М. (1986) высказано предположение, что лизосим, видимо, принимает активное участие в пищеварении и формировании микробного биоценоза. Содержание данного фермента в организме рыб зависит от исходного состояния особи, от видовых, экологических особенностей и сезона года (Субботкина, 1990; Вихман, 1996). При воздействии на рыб токсических факторов, в частности сублетальных концентраций кадмия, меди и ртути, интенсивность образования лизосима колеблется (Лапирова с соавт., 2000).

Другие факторы неспецифического гуморального иммунитета: С-реактивный белок, трансферрины, интерферон, хитиназа, лектины, лизины на представителях рыб, обитающих в водоемах Верхней Волги, совсем не изучены.

Основная роль в реализации функций защиты от “чужого”, сохранения иммунологической “памяти” среди гуморальных факторов иммунитета принадлежит иммуноглобулинам, снабженным специфическими рецепторами к антигену. Биохимической основой иммуноглобулинов рыб является растворимая фракция  $\gamma$ -глобулинов. Однако, не следует исключать роль и значение  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов в реализации иммунологических функций.

Иммуноглобулины в организме рыб синтезируются плазматическими клетками (В-лимфоцитами) и секретируются в кровь или тканевые жидкости. Иммуноглобулины рыб отличаются между собой физико-химическими свойствами и структурной организацией. Они гетерогенны по молекулярной массе, константе седиментации, электрофоретической подвижности. По числу субъединиц, образующих молекулу иммуноглобулинов, они подразделяются на моно-, ди-, тетра- и пентамеры. Пентамеры и димеры характерны для элазмобранхий и двоякодышащих, а тетрамеры – для хрящевых, костных ганоидов и костистых рыб (Галактионов, 1995; Marchalonis, 1977; Clem et al., 1998). Иммуноглобулины рыб, несмотря на их гетерогенность, по физико-химическим свойствам и структурной организации, в отличие от высших позвоночных, представлены одним классом, соответствующим IgM антителам высших позвоночных. В отличие от рыб, иммуноглобулины у теплокровных подразделяются на 5 основных классов: IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. Иммуноглобулины рыб выполняют разнообразные функции по защите организма от чужеродных тел. Они также являются основной структурной единицей мембранных рецепторов иммуноцитов, осуществляющих распознавание “своего” и “чужого”. Из вышеизложенного следует, что иммунная система рыб – это сложно организованная система, которая

состоит из совокупностей структур, включающих молекулярные, клеточные, тканевые и органы компоненты. Активность функционирования иммунной системы и ее составляющих определяется наличием и силой возмущающих факторов, поступающих из внутренней и внешней сред, а также возрастными, экологическими и видовыми особенностями рыб (Микряков и др., 1990, 1991; Микряков и др., 1999).

#### СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ХАРАКТЕРЕ РЕАГИРОВАНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЫБ НА ТОКСИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

В настоящее время проблема иммунитета рыб привлекает большое внимание многих исследователей. Повышенный интерес к этому вопросу обусловлен рядом причин: а) необходимостью познания процессов развития специфического иммунитета на разных этапах филогенеза; б) целенаправленным поиском эффективных способов регуляции численности паразитов-возбудителей заразных болезней на хозяевах; в) оценкой роли иммунной системы в адаптационных процессах, в связи с повышением антропогенных нагрузок, загрязнением водоемов разного рода токсикантами и разработкой иммуногестов для оценки качества вод и токсического эффекта поллютантов на рыб.

Если иммунологические исследования в сравнительном плане и в области иммунопрофилактики ведутся широко, то работ по изучению влияния антропогенных факторов в литературе встречается мало.

Из анализа литературных данных следует, что авторами в большинстве случаев рассматривались отдельные аспекты иммунологических реакций на воздействие антропогенных факторов. Эти работы посвящены выяснению функционального состояния либо клеточных, либо гуморальных факторов специфического и неспецифического иммунитета (Микряков, 1970, 1984, 1988, 1991; Leeman, Brindey, 1981; Walczak et al., 1987; Лукьяненко, 1989; Thuvander, 1989; Anderson, 1990; Микряков и др., 1991, 1992; Степанова и др., 1992; Балабанова, Лапирова, 1994; Pulsford et al., 1994; Arroosh et al., 1996; Балабанова, 1997, 1998; Заботкина, Микряков, 1997 а, б). Поводом для проведения исследований по выяснению характера реагирования механизмов иммунитета послужили данные наблюдений за эпизоотиями инфекционных и инвазионных болезней, появившихся среди рыб, обитающих в естественных и искусственных условиях (Schaperclaus, 1979; Ведемейер и др., 1981; Канаев, 1985; Флеров, 1989; Anderson, 1990; Ларцева и др., 1992; Ларцева, 1998).

На основе полевых наблюдений за состоянием здоровья рыб и данных экспериментальных исследований установлено, что рыбы из районов постоянного поступления промышленных, сельскохозяйственных и коммунально-бытовых стоков чаще болеют инфекционными и инвазионными болезнями. В результате было высказано предположение, что экотоксиканты оказывают угнетающее действие на механизмы естественного иммунитета, и у подвергшихся их воздействию рыб резко падает напряженность иммунитета к возбудителям болезней.



Эти наблюдения послужили основой для проведения иммунотоксикологических исследований на рыбах, с целью выяснения повреждающего эффекта поллютантов на механизмы специфического и неспецифического иммунитета.

Первые иммунотоксикологические работы были посвящены исследованию влияния фенола (Гончаров, Микряков, 1970), радионуклидов (Шлейфер, 1976, 1978; Шлейфер, Шеханова, 1977), солей тяжелых металлов (Sarot, 1977; Roales, Perlmutter, 1977; O'Neill, 1981; Robohm, 1986), пестицидов и бифенилов (Зимин, 1981; Spitsbergen et al., 1986; Anderson, 1990; Микряков, Половков, 1997) на гуморальные факторы специфического иммунитета. Данные показатели тестировали по результатам анализа антителообразовательной функции, для чего отравленных рыб подвергали антигенной стимуляции с последующим определением содержания специфических антител в сыворотке крови. Многими исследователями отмечено, что используемые в опытах токсические соединения оказывали либо иммуностимулирующее, либо иммуносупрессивное действие (Saxena et al., 1992). Различный характер проявления данной функции в основном определялся количеством введенного в опыт токсиканта и условиями проведения эксперимента. Показано, что низкие концентрации токсических веществ могут оказывать стимулирующее действие на иммунный ответ, а высокие, напротив, подавляющее.

При изучении характера реагирования клеточных факторов иммунитета на поллютанты основное внимание было уделено анализу состава и количества лейкоцитов, их фагоцитарной активности (Микряков, Флеров, 1971; Крылов, 1974; Scott, Klesius, 1981; Попова, 1982; Stave et al., 1984; Spitsbergen et al., 1986; Микряков, Лапирова, 1997 а, б; Попов и др., 1997). Был установлен различный характер действия загрязняющих веществ на состав и функциональное состояние лейкоцитов. В ответ на влияние возмущающих факторов, как правило, отмечались лимфопения, нейтрофилия, моноцитоз (Метелев и др., 1969; Wlasow, 1985). Изменение фагоцитарной активности лейкоцитов при воздействии радионуклидов носит фазовый характер (Шлейфер, 1978). Степень изменчивости клеточных и гуморальных факторов иммунитета при воздействии фенола определяется условиями содержания рыб и концентрацией токсиканта (Гончаров, Микряков, 1970; Микряков, Флеров, 1971; Микряков, 1991). Было показано, что при одних и тех же концентрациях фенола интенсивность синтеза антител зависела от режима кормления. Токсическое влияние на иммунную систему голодающих рыб оказалось более выраженным, чем на таковую особей, ежедневно получающих подкормку. Из анализа литературных данных следует, что очень мало работ посвящено изучению реакции иммунной системы рыб на воздействие различных групп загрязняющих веществ. Имеющиеся в ряде работ (Roales, Perlmutter, 1977; O'Neil, 1981; Robohm, 1986; Stave et al., 1984) сведения по изучению токсического влияния ионов металлов (кадмия, ртути, алюминия, цинка и меди) на иммунную систему рыб направлены на определение отдельных показателей, отражающих функциональное состояние клеточного или гуморального иммунитета.

Как видно из анализа литературных источников, исследования в данной области не носили систематического характера, а опыты ставились при разных условиях. Опыты по выяснению иммунотоксического эффекта проводились либо *in vitro* на уровне клеток, либо на уровне организма. Нами не обнаружены сведения о характере изменения структуры иммунокомпетентных клеток, тканей и органов как после воздействия токсикантов в экспериментальных условиях. Нет достоверной информации и для рыб, обитающих в зоне поступления отходов промышленных предприятий крупных индустриальных центров и в условиях acidификации водоемов. Данное положение мы объясняем отсутствием целенаправленных и систематических исследований, а также малым числом специалистов, занимающихся проблемами иммунотоксикологии. Кроме того, проводимые до сих пор иммунотоксикологические исследования в значительной части направлены на выяснение причин и факторов, регулирующих интенсивность иммуногенеза, эффективность иммунопрофилактических мероприятий и устойчивость рыб к паразитам, вызывающим массовые заболевания. В литературе также мало работ, связанных с возможностью использования иммунологических показателей в практике экотоксикологических исследований при оценке качества и нормировании вод для целей рыбохозяйственного использования, диагностике отравлений и экспертизе рыб на содержание токсических продуктов.

Исходя из вышеизложенного, нами впервые предпринято проведение систематического и всестороннего исследования по изучению влияния различных по происхождению антропогенных факторов: токсических веществ, загрязненных отходами промышленных предприятий г. Череповца вод, закисленных вод озер Дарвинского заповедника — на структуру и функцию иммунной системы рыб. Конечной целью этих работ мы считаем установление роли иммунной системы в процессах адаптации, в обеспечении антигенно-структурного гомеостаза и нейтрализации и детоксикации экотоксикантов, выяснение механизмов повреждающего эффекта загрязняющих веществ на разных уровнях организации иммунной системы рыб и разработку иммунологических основ биотестирования и контроля за качеством воды.

Оценка влияния антропогенных факторов на иммунную систему рыб осуществлялась по тестам, отражающим функциональное и структурное состояние механизмов естественного и специфического иммунитета и характер иммунопатологических процессов, возникающих при взаимодействии иммунной системы с экотоксикантами.

С учетом существующих литературных данных и результатов собственных многолетних наблюдений за реакцией иммунологических механизмов гомеостаза на токсические факторы нами проведено исследование влияния различных концентраций карбофоса, солей тяжелых металлов, фенола, загрязненных вод Рыбинского водохранилища и acidификации вод на структурно-функциональное состояние иммунной системы рыб.

# РЕАКЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ПЕСТИЦИДОВ И СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

## МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ ПОСТАНОВКИ ОПЫТОВ

*Условия постановки иммунотоксикологических экспериментов.* Объектами исследования служили лещ (*Abramis brama* L.), карп (*Cyprinus carpio* L.), карась (*Carassius carassius* L.), окунь (*Perca fluviatilis* L.) и молодь сибирского осетра (*Acipenser baeri* L.). По состоянию иммунной системы указанных видов рыб оценивали последствия влияния сброса сточных вод промышленного узла г. Череповца (на примере леща), карбофоса (на примере карпа), фенола (на примере карася) и солей тяжелых металлов (на примере сибирского осетра), закисления слабоминерализованных водоемов Дарвинского заповедника (на примере окуня).

Лещей отлавливали траловым способом в разных плесах Рыбинского водохранилища: Шекснинском, Моложском и Волжском.

Исследование влияния карбофоса на иммунную систему рыб проводили на двухлетках карпа средней массой 60 г в 2 вариантах. Изучали влияние различных концентраций токсиканта (1, 5 и 10 мг/л) в течение 7 сут и хроническое воздействие сублетальной концентрации карбофоса (2 мг/л) в течение 3 мес. Применяли коммерческий препарат карбофоса, концентрации рассчитывали по действующему веществу. В первом варианте часть рыб после 7 сут экспозиции в токсиканте помещали в чистую воду на 7 недель ("отмывка").

Во 2-м варианте опытов иммунизированных и неиммунизированных рыб помещали в чистую воду или раствор пестицида сублетальной концентрации. Рыб иммунизировали внутрибрюшинной инъекцией суспензии инактивированных бактерий *Aeromonas hydrophila* (250 млн мкрб. тсл/особь).

Исследование последствий влияния тяжелых металлов на иммунную систему рыб изучали на примере воздействия ионов кадмия ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ) на молодь осетра *Acipenser baeri* Brandt и сеголетков и двухлетков карпа *Cyprinus carpio* L. Опыты проводили в проточных условиях, используя дилутер (Виноградов, Тагунов, 1989). Токсичность кадмия оценивали по величине  $\text{LC}_{50}$ , установленной по общепринятой в ихтиотоксикологии методике (Лукьяненко, 1987), при 96-час. экспозиции и общей жесткости воды 1,9 ммоль/л, температуре воды 16°C, pH 7,6–8,2 и полном насыщении кислородом. Для оценки токсического эффекта ионов кадмия в хронических опытах использовали  $1/10 \text{ LC}_{50}$ , что

составило 0,03 мг/л. Перед началом опытов рыб адаптировали к условиям эксперимента в течение 10–15 дней. Контрольных рыб содержали в чистой проточной воде.

Опыты по изучению влияния фенола проводили на карасе обыкновенном средней массой  $5,8 \pm 0,25$  г. Были поставлены две серии опытов, в 1-й – рыбы находились 3 сут при концентрации фенола 3 мг/л. Во 2-й – рыб помещали на 4 сут в раствор фенола той же концентрации, затем на 1 сут в чистую воду, контрольных рыб содержали в чистой воде.

*Методики определения гуморальных факторов иммунитета.* Общеизвестно, что защита организма от воздействия патогенных микроорганизмов осуществляется гуморальным и клеточным звеньями иммунитета. Функциональное состояние гуморального звена оценивали по показателям бактериостатической активности сыворотки крови (БАСК), перекисному гемолизу эритроцитов (ПГЭ) и перекисному окислению липидов (ПОЛ), образованию неспецифических иммунных комплексов (НИК), уровню содержания лизоцима и антител (Сура и др., 1980).

Определение БАСК проводили с помощью фотонейтриметрического метода по схеме, предложенной О.В. Смирновой и Т.Ф. Кузьминой (Смирнова, Кузьмина, 1966) для исследования защитных функций гуморального звена иммунной системы теплокровных животных и адаптированной нами для рыб.

Содержание лизоцима в надосадочной жидкости определяли нефелометрическим методом (Блумберг, Дундуре, 1987). Гомогенаты тканей готовили по общепринятой методике (Каграманова, Ермольева, 1966).

Неспецифические иммунные комплексы определяли в сыворотке крови по стандартной методике (Покровский и др., 1979).

Содержание антител в сыворотке крови определяли с помощью реакции агглютинации. Результаты оценивали по 4-балльной шкале.

*Методы оценки состояния клеточных факторов иммунитета.* Клеточные факторы иммунитета оценивали на основе регистрации состава и количества иммуноцитов, их функциональных характеристик, таких как фагоцитарная активность лейкоцитов, бласттрансформация, антителогенез и т.д.

Мазки крови обрабатывали по стандартной методике и подсчитывали лейкоцитарную формулу крови (Гончаров, 1973; Канась и др., 1986; Головина, Тромбляцкий, 1989).

Иммунограмму и показатели физиологической активности клеток (фагоцитарную активность нейтрофилов и адгезивную активность лимфоцитов) оценивали с помощью дискретно-динамического подхода, показавшего свою эффективность при анализе иммунного статуса организма людей и млекопитающих (Лебедев, Понякина, 1986; Lebedev, Ponjakina, 1989).

Фагоцитарную активность лейкоцитов оценивали методом спонтанной и стимулированной зимозаном хемилюминесценции с помощью автоматизированной системы "Люцифер-Б".



*Методы оценки состояния антиоксидантной системы.* Определение перекисного гемолиза эритроцитов проводили методом, адаптированным нами для рыб (Микряков и др., 1991).

Принцип метода определения перекисного гемолиза эритроцитов основан на учете величины гемолиза. Тест характеризует уровень обеспеченности организма липидными антиоксидантами, в частности альфа-токоферолом. При снижении уровня антиоксидантов увеличивается активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), что влечет за собой снижение стабильности мембраны эритроцитов, выражающееся в увеличении процента гемолиза.

Принцип метода определения перекисей липидов в тканях основан на учете количества продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, в частности, на определении концентрации малонового диальдегида (Андреева и др., 1988). Известно, что тиобарбитуровая кислота может реагировать с малоновым диальдегидом, образующимся при перекислении полиненасыщенных жирных кислот, имеющих 2–3 диеновые связи. Две молекулы тиобарбитуровой кислоты реагируют с одной молекулой малонового диальдегида. Исходно в животных тканях содержание малонового диальдегида крайне незначительно, и 98% его образуется в процессе взаимодействия тиобарбитуровой кислоты при разрушении гидроперекисей липидов.

*Методы исследования ультратонкой структуры иммунокомпетентных клеток.* Структуру иммуноцитов и ретикуло-лимфойдной ткани исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии, материал для анализа приготавливали по стандартной методике (Уикли, 1975). Для изучения тонкой структуры иммуноцитов использовали кусочки ткани головного отдела почек, печени и селезенки рыб.

Статистическую обработку осуществляли с помощью стандартных программ, используя коэффициент корреляции и метод гистограмм (Бейли, 1964).

### **ВЛИЯНИЕ КАРБОФОСА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЫБ**

Среди множества загрязняющих водные экосистемы веществ пестициды, фенолы и соли тяжелых металлов играют существенную роль в определении качества вод и реализации процессов жизнедеятельности рыб и других водных животных (Лукьяненко, 1983; Флеров, 1989; Справочник по болезням рыб, 1989; Немова, 1996; Кашулин и др., 1999 и др.).

Многообразно их влияние на организм рыб: подавление функций всех систем жизнеобеспечения, нарушение процессов роста, размножения, снижение устойчивости к заразным болезням, изменение поведенческих функций (Флеров, 1971, 1973, 1989; Лукьяненко, 1967, 1983; Мстелев и др., 1971; Флеров и др., 1978, 1982; Виноградов и др., 1979; Козловская, Чуйко, 1979; Козловская, Флеров, 1981; Козловская и др., 1980; Немова, 1996; Кашулин и др., 1999 и др.). Иными словами, токсические вещества оказывают неблагоприятное воздействие на жизнедеятель-

ность рыб и механизмы гомеостаза. Наблюдаемое в природе повышение восприимчивости рыб, обитающих в загрязненных водах, к инфекционным и инвазионным болезням свидетельствует о снижении у них функций иммунологических механизмов гомеостаза. Чтобы понять, каким образом иммунная система рыб реагирует на воздействие пестицидов, фенола и солей тяжелых металлов, нами проведено исследование влияния их на структурно-функциональное состояние гуморальных и клеточных факторов иммунитета в условиях эксперимента.

Карбофос или малатион относится к группе фосфорорганических пестицидов (ФОП), часто применяется в сельскохозяйственной практике в качестве инсектицида, акарицида, фунгицида, а в рыбоводстве его применяют для борьбы с эктопаразитами рыб (Справочник по болезням рыб, 1989). Токсическое воздействие ФОС на рыб, так же как и на другие группы животных, основано на их способности специфически ингибировать активность фермента – ацетилхолинэстеразы (АХЭ), регулирующей накопление ацетилхолина в нервных синапсах. Увеличение содержания ацетилхолина в нервной системе сопровождается дистрофическими изменениями и гибелью нервных клеток и гипоксией. Под влиянием ФОС в организме рыб нарушаются и другие системы и органы жизнеобеспечения (печень, почка, селезенка, стенка кишечника и др.). Кроме того, в процессе метаболизма ФОС в органах могут образовываться более токсичные метаболиты, усугубляющие токсический эффект препарата. Например, карбофос в организме животных превращается в более токсичный моноксон, метилмеркаптофос-сульфоксид и сульфоксид.

Действие карбофоса на иммунную систему рыб не изучено. Нами впервые проведены комплексные исследования влияния различных концентраций карбофоса (в том числе сублетальных) в условиях краткосрочных и хронического опытов на структурное и функциональное состояние иммунной системы карпов и карасей по данным анализа БАСК, неспецифических иммунных комплексов, состоянию антиоксидантной системы, составу лейкоцитов, их фагоцитарной активности, ультратонкой структуры иммунокомпетентных клеток.

*Реакция иммунной системы карпа на краткосрочное воздействие различных концентраций карбофоса.* Реакция гуморальных факторов иммунитета, которую оценивали по данным анализа бактериостатических свойств сыворотки крови, содержанию неспецифических иммунных комплексов, показателей аутоиммунного гемолиза эритроцитов, а также перекисного окисления липидов на воздействие карбофоса была неоднозначной (табл. 1).

Бактерицидные свойства сыворотки крови (БАСК), как было установлено ранее (Микряков, 1984; Микряков и др., 1990; Микряков и др., 1991), могут служить основой при оценке условий среды обитания, функционального состояния гуморальных факторов естественного иммунитета и зараженности паразитами.

Установлено, что в популяциях рыб, обитающих в зоне интенсивного поступления сточных вод промышленных предприятий г. Череповца (Микряков и др., 1991) и при низких значениях pH воды (Микряков

Таблица 1

Иммуно-биохимические показатели крови карпа  
при различных концентрациях карбофоса

Показатель		Концентрация карбофоса, мг/л			
		1	5	10	Контроль
НИК, усл. ед.	I	20,7 ± 2,4	16,0 ± 1,2	16,7 ± 2,3	12,5 ± 0,8
	II	13,0 ± 0,7	14,0 ± 1,4	13,2 ± 0,6	10,5 ± 2,1
БАСК	I	0	9,0 ± 1,0	18,1 ± 1,4	2,2 ± 0,3
	II	0	4,0 ± 0,1	5,5 ± 0,3	4,4 ± 0,2
Активность гемолиза, ПГЭ усл. ед.	I	25,5 ± 2,2	24,6 ± 3,3	21,8 ± 1,1	16,0 ± 0,6
	II	18,3 ± 4,1	20,5 ± 1,1	22,4 ± 2,0	17,1 ± 1,3
Интенсивность ПОЛ, мкМ/10 мг белка	I	6,3 ± 0,3	3,8 ± 0,2	—	1,5 ± 0,9
	II	—	—	—	—

Примечание: I – опыт, II – после отмывки.

и др., 1984), повышается доля особей с признаками вторичного иммунодефицита по БАСК. Наши исследования показали, что данный признак зависит от концентрации токсиканта (табл. 1), причем результаты были парадоксальными: при низких концентрациях (1 мг/л) антимикробные свойства сыворотки крови у опытных рыб полностью исчезали, тогда как при высоких, наоборот, повышались (почти в 9 раз по сравнению с контролем). Промежуточные результаты получены у рыб, содержащихся при концентрации токсиканта 5 мг/л. На "отмывку" все рыбы, за исключением таковых из первой серии опытов, отвечали снижением БАСК.

В отличие от БАСК, другие показатели гуморального иммунитета, в т.ч. интенсивность перекисного окисления липидов, у рыб, содержащихся при низких концентрациях карбофоса (1 мг/л), имели более высокие значения, чем у рыб, находившихся в растворе 5 и 10 мг/л (табл. 1).

Как видно из табл. 1, через 7 сут экспозиции содержание НИК повышалось по сравнению с контролем. Значения данного показателя у рыб первой серии опытов были максимальными. Этот факт свидетельствует о зависимости степени реагирования гуморальных факторов иммунитета от содержания токсиканта. Низкие концентрации карбофоса, видимо, стимулируют образование НИК интенсивнее, чем более высокие. Снижение содержания НИК после "отмывки" свидетельствует об обратимости данной реакции и элиминации карбофоса из организма рыб.

Использование тестов по гемолизу эритроцитов и перекисному окислению липидов в иммунокомпетентных органах и тканях дает реальную возможность оценки напряженности клеточного и гуморально-

го иммунитета у рыб при разработке эффективных способов иммунологического мониторинга. Пребывание рыб в загрязненной воде приводит к изменению общего метаболизма. Совершенно очевидно, что эти нарушения не могут не затрагивать все ткани и системы организма (Ведемейер и др., 1981). Вместе с тем воздействие на иммунокомпетентные органы и ткани влечет за собой особенно тяжелые последствия и делает больную рыбу практически беззащитной перед бактериальной инфекцией (во многих случаях именно этот фактор служит непосредственной причиной летального исхода) (Микряков, 1991). В последние годы в рамках сформулированного В.М. Дильманом представления о метаболической иммунодепрессии сдвиги в липидном обмене рассматриваются как ключевые моменты иммунодепрессивного состояния организма. Иммунокомпетентные клетки, эритроциты, а также органы и ткани, принимающие участие в осуществлении иммунных функций, чрезвычайно чувствительны к стрессам.

Анализ данных по определению активности процессов перекисного гемолиза эритроцитов и интенсивности перекисного окисления липидов в иммунокомпетентных тканях у рыб, содержащихся в воде с токсикантом, свидетельствует о нарушении иммунных процессов (табл. 1). Результаты опыта указывают на усиление гемолиза у рыб, содержащихся в растворе токсиканта. Усиление деструктивных процессов отмечено у всех групп опытных рыб. Наиболее активный гемолиз эритроцитов наблюдали у рыб, экспонированных при концентрации карбофоса 1 мг/л (отклонение от контрольных значений составило 15,9%). При концентрации токсиканта 5 и 10 мг/л активность процессов гемолиза эритроцитов превышала таковую в контроле соответственно на 15,3 и 13,6%. После "отмывки" произошла нормализация данного показателя, более выраженная при концентрации токсиканта 1 мг/л. Данные теста по выявлению интенсивности процессов ПОЛ сыворотки крови также свидетельствуют о негативных процессах, происходящих в иммунокомпетентных тканях карпов, помещенных в раствор токсиканта. У всех групп рыб, находящихся в загрязненной воде, ПОЛ достоверно повышено по сравнению с контролем.

Известно, что пребывание рыб в загрязненной среде приводит к повышению внутриклеточного содержания некоторых токсических веществ (Лукьяненко, 1987), повреждению структуры ДНК, снижению скорости пролиферации иммунокомпетентных клеток и нарушению их дифференцировки.

Следует отметить, что разнообразные негативные воздействия (γ-облучение, тепловой шок, тяжелые металлы, пестициды и т.д.) вызывают в организме сдвиг обменных процессов, увеличение числа свободных радикалов, приводящих к различным патологическим состояниям организма (Браун, Метелок, 1987). В связи с этим в настоящее время все большее внимание уделяется изучению антиоксидантной защиты организма, так как она является неспецифической и позволяет оценить факторы, ограничивающие силу иммунного ответа.

Известно, что при дефиците в организме антиоксидантов вследствие более высокой стрессовой активности происходят глубокие имму-



нологические и биохимические изменения. В частности, при снижении уровня липидных антиоксидантов увеличивается активность перекисного окисления липидов, что влечет за собой снижение стабильности мембраны эритроцитов и иммуноцитов. В результате этого происходит увеличение процента аутоиммунного гемолиза. Известно, что в основе регуляции активности перекисного окисления липидов лежит равновесие между свободнорадикальными процессами и состоянием антиоксидантной системы. Продуцируемые радикалы кислорода и молекулярные продукты перекисного окисления липидов способны повреждать мембранный аппарат иммуноцитов, воздействуя на протекание многих иммунологических функций, сдвигая процессы свободнорадикального и перекисного окисления липидов. В отличие от БАСК и НИК, активность перекисного гемолиза после "отмывки" у рыб, находившихся в растворе карбофоса с концентрацией 10 мг/л, не падает, что, вероятно, обусловлено присутствием в тканях рыб аутоагрессивных гемолитических факторов.

Таким образом, гуморальные факторы естественного иммунитета на воздействие карбофоса реагируют изменением функциональных характеристик, но эта реакция имеет неоднозначный, иногда парадоксальный характер.

Материалы исследований клеточных факторов иммунитета показали, что у карпов, содержащихся в растворе карбофоса, менялось соотношение различных форм иммуноцитов и их функциональная активность (табл. 2–8).

Кровь носила ярко выраженный лимфоидный характер (табл. 2). Процент лимфоцитов во всех изучаемых группах рыб колебался, в среднем от 65 до 99%. Концентрации пестицида 1 и 5 мг/л не вызвали существенных изменений в процентном содержании лимфоцитов по сравнению с контролем, в то время как при 10 мг/л было отмечено достоверное снижение относительного числа лимфоцитов. После "отмывки" отмечалось некоторое снижение уровня содержания лимфоцитов, достоверное для концентраций 5 и 10 мг/л по сравнению с соответствующими показателями в опыте.

Реакция нейтрофильного звена лейкоцитов на токсикант была более резко выраженной, чем у лимфоцитов, причем различные концентрации пестицида действовали на молодые, палочкоядерные формы, по-разному. Если при концентрации 5 мг/л относительное содержание этой группы клеток сходно с таковым у контроля, то при 1 мг/л наблюдалось достоверное снижение процента палочкоядерных нейтрофилов, а при 10 мг/л – резкое увеличение их числа по сравнению с контролем. После "отмывки", при возрастании палочкоядерных нейтрофилов у всех групп рыб, наибольших значений этот показатель достигал при содержании пестицида 5 мг/л. Аналогичная картина наблюдалась по сегментоядерным нейтрофилам.

На индекс обилия лейкоцитов наибольшее влияние оказала экспозиция в токсиканте с концентрацией 1 мг/л. В этих условиях он резко возрос, достоверно превысив не только контрольные цифры, но и показатели других опытных групп рыб.

Таблица 2

Индекс обилия лейкоцитов и процентное содержание каждого вида клеток ( $M \pm m$ ) в опыте и после отмывки

Стадия эксперимента	Концентрация карбофоса, мг/л			
	1	5	10	Контроль
Индекс обилия лейкоцитов				
Опыт	22,5 ± 2,0*	13,7 ± 1,2	9,4 ± 1,2	13,2 ± 1,7
После отмывки	6,4 ± 0,7*	2,5 ± 0,3	5,7 ± 0,6	4,3 ± 0,6
Лимфоциты, %				
Опыт	99,0 ± 1,0	96,0 ± 1,4	86,0 ± 2,2*	96,7 ± 0,7
После отмывки	88,7 ± 7,0	65,0 ± 9,0	78,0 ± 6,4	82,0 ± 12,0
Палочкоядерные нейтрофилы, %				
Опыт	0,5 ± 0,5*	3,0 ± 0,6	10,0 ± 0,8*	2,7 ± 0,7
После отмывки	7,3 ± 1,5	24,0 ± 10,0	11,3 ± 1,8	12,0 ± 8,0
Сегментоядерные нейтрофилы, %				
Опыт	0,5 ± 0,5	1,0 ± 1,0	4,0 ± 2,4	0,7 ± 0,7
После отмывки	4,0 ± 3,1	10,0 ± 0,0	10,0 ± 4,2	6,0 ± 4,0

Примечание: \* помечены значения, достоверно отличающиеся от контрольных.

При изучении мазков опытных рыб было отмечено слипание эритроцитов и вытягивание их параллельными цепочками. Это явление не наблюдалось ни у контрольных рыб, ни у рыб после отмывки, т.е. было связано непосредственно с воздействием токсиканта. Эффект образования эритроцитами "монетных столбиков" косвенно свидетельствует об увеличении скорости оседания эритроцитов, происходящем в результате аутоиммунизации рыб эритроцитами, стимулирующими образование аутогемагглютининов.

Анализируя полученные данные, можно отметить, что разные концентрации карбофоса оказывали различное воздействие на систему белой крови годовиков карпа. Концентрация 1 мг/л вызывала увеличение абсолютного числа лимфоцитов и резкое усиление лейкопоза, что может свидетельствовать о некотором стимулирующем влиянии малых доз токсиканта на клеточное звено иммунной системы. Этот эффект, хоть и в несколько сглаженной форме, сохранялся в течение длительного времени (7 недель) после прекращения воздействия стресс-фактора. Концентрация пестицида 10 мг/л заметно не повлияла на абсолютное количество лимфоцитов при достоверном снижении процентного содержания этих клеток за счет резкого увеличения числа нейтрофилов обеих форм. Доля сегментоядерных нейтрофилов сохранялась высокой

Таблица 3

**Интенсивность спонтанной хемилюминесценции  
(в имп./с) лейкоцитов карпа**

Концентрация карбофоса, мг/л	Опыт	Отмывка
Контроль	3,9 ± 0,5	8,9 ± 0,7
1	67,5 ± 11,7*	11,3 ± 1,8
5	47,0 ± 7,2*	15,0 ± 5,5
10	16,0 ± 2,6*	25,4 ± 6,0*

*Примечание:* \* помечены значения, достоверно отличающиеся от контроля (при  $p < 0,05$ ).

и после отмывки. Эти сдвиги свидетельствуют об усилении фагоцитарного звена лейкоцитов.

Полученные результаты согласуются с данными о влиянии ряда пестицидов в концентрации  $LC_{50}$  на годовиков карпа в остром 48-час. опыте (Svobodova, Ресена, 1988).

Анализ материала по хемилюминесценции (ХЛ) лейкоцитов показал, что клеточные факторы иммунитета рыб на воздействие карбофоса реагировали изменением функциональной активности, что подтверждается данными анализа спонтанной и активизированной зимозаном хемилюминесценции и изменением времени достижения максимальных значений интенсивности свечения (табл. 3, 4).

Полученные результаты показали, что уровень ХЛ у рыб, находившихся под действием токсического агента, достоверно отличался от контроля, причем максимальная интенсивность хемилюминесцентного ответа была зарегистрирована в группе рыб с минимальными концентрациями карбофоса (1 мг/л).

Таблица 4

**Время достижения (в мин.) максимальных значений интенсивности  
спонтанной хемилюминесценции лейкоцитов карпа**

Концентрация карбофоса, мг/л	Опыт	Отмывка
Контроль	20,5 ± 1,9*	44,5 ± 11,7
1	7,4 ± 0,8*	49,0 ± 8,9
5	8,8 ± 0,7*	55,0 ± 5,8
10	32,5 ± 2,3*	54,6 ± 6,5

*Примечание:* \* помечены значения, достоверно отличающиеся от контроля (при  $p < 0,05$ ).

Таблица 5

**Число лейкоцитов в периферической крови карпа**

Концентрация карбофоса, мг/л	Опыт	Отмывка
Контроль	168,8 ± 53,5	211,5 ± 77,5
1	258,5 ± 47,4	233,3 ± 28,1
5	240,0 ± 27,7	157,0 ± 75,0
10	186,0 ± 33,9	170,2 ± 24,6

Дальнейшее повышение концентрации токсиканта все же приводило к подавлению хемилюминесцентного ответа, однако его уровень значительно превышал контрольный.

После "отмывки" рыбы, находившиеся в более высоких концентрациях карбофоса, дольше сохраняли люминолзависимую ХЛ реакцию, уровень которой зависел от исходных концентраций токсиканта.

Результаты эксперимента показали, что более низкие концентрации карбофоса оказывали наибольшее возмущающее воздействие на фагоцитарное звено. Подтверждением этому служат темпы снижения ХЛ ответа: у рыб, находившихся под воздействием карбофоса в концентрации 1 мг/л, после "отмывки" уровень ХЛ ответа снизился в 5 раз, при 5 мг/л карбофоса – в 3 раза, а при 10 мг/л он не снижался. Данные по времени достижения клетками максимального световызлучения показали, что низкие концентрации токсиканта (1 и 5 мг/л) способствовали более быстрому ответу клеток (в течение первых 7–9 мин.), что почти вдвое быстрее по сравнению с контролем, а концентрации 10 мг/л, напротив, способствовали замедлению реакции (табл. 4). После "отмывки" эта разница нивелировалась и время достижения пика спонтанной ХЛ было примерно одинаковым.

Известно, что некоторые токсические вещества, растворенные в воде, влияют на гемопоэз рыб, в том числе и на уровень содержания лейкоцитов в кровяном русле. Анализ числа лейкоцитов в крови опытных и контрольных рыб, а также у рыб после "отмывки" (табл. 5) показал, что 7-сут. воздействие различных концентраций карбофоса приводило к увеличению числа лейкоцитов по сравнению с контролем, тогда как после "отмывки" данные не были столь однозначными.

Воздействие токсиканта в концентрации 1 мг/л приводило к повышению числа лейкоцитов по сравнению с контролем, а более высокие концентрации (5 и 10 мг/л) к некоторому снижению, однако эти различия были статистически недостоверны. В этой связи нам представлялось интересным проследить динамику спонтанного ХЛ ответа с учетом числа активных клеток крови, т.е. относительный анализ спонтанной хемилюминесценции в пересчете на одну клетку (табл. 6).

Таким образом, можно сказать, что на иммунную систему рыб действуют уже незначительные концентрации карбофоса. Реакция им-



Таблица 6

Относительная интенсивность спонтанной  
хемилюминесценции (имп./с/клетка) лейкоцитов карпа

Концентрация карбофоса, мг/л	Опыт	Отмывка
Контроль	0,03 ± 0,01*	0,05 ± 0,01
1	0,24 ± 0,05*	0,05 ± 0,01
5	0,19 ± 0,02*	0,16 ± 0,08
10	0,01 ± 0,02*	0,17 ± 0,04*

Примечание: \* помечены значения, достоверно отличающиеся от контроля (при  $p < 0,05$ ).

муноцитов рыб в условиях адгезии проявлялась в усилении ХЛ ответа и зависела от содержания пестицида в воде. Сенсибилизация иммуноцитов опытных рыб сохранялась довольно долго, носила, по всей видимости, обратимый характер и зависела от концентрации пестицида. Полученные результаты хорошо согласуются с выводами, сделанными нами на основании результатов анализа спонтанной хемилюминесценции.

Анализ результатов исследования активизированной зимозаном хемилюминесценции фагоцитов (ЗХЛ) периферической крови карпа (табл. 7) показал, что ее уровень резко возрастал (примерно на порядок) по сравнению с контролем уже при минимальных концентрациях токсиканта. При более высоком содержании пестицида (5 и 10 мг/л) ответ был также высок, но ниже, чем при 1 мг/л. "Отмывка" приводила к снижению ЗХЛ ответа, который зависел от концентрации пестицида, однако темпы этого снижения были выше, чем у фагоцитов периферической крови карпов, экспонировавшихся в более низких концентрациях.

Данные по ЗХЛ реакции в пересчете на 1 активную клетку представлены в табл. 8. Как следует из представленных результатов, реакция иммуноцитов в ответ на их стимуляцию зимозаном, проявлялась в высо-

Таблица 7

Интенсивность активизированной зимозаном  
хемилюминесценции (имп./с/клетка) лейкоцитов карпа

Концентрация карбофоса, мг/л	Опыт	Отмывка
Контроль	51,5 ± 8,2	20,0 ± 2,7
1	505,9 ± 278,0	41,9 ± 24,1
5	206,4 ± 67,7	46,5 ± 36,7
10	200,8 ± 54,6	88,2 ± 43,2

Таблица 8

Относительная интенсивность активизированной зимозаном  
хемилюминесценции (в имп./с/клетка) лейкоцитов карпа

Концентрация карбофоса, мг/л	Опыт	Отмывка
Контроль	0,38 ± 0,12	0,11 ± 0,05
1	1,80 ± 0,96	0,17 ± 0,08
5	0,92 ± 0,31	0,53 ± 0,48
10	1,36 ± 0,56	0,59 ± 0,33

ком ХЛ ответе при любых концентрациях карбофоса в воде. Наиболее интенсивно реагировали клетки рыб на воздействие пестицида в концентрации 1 мг/л.

Далее, после "отмывки" в чистой воде, уровень ЗХЛ ответа возвращался к норме и, в случае изучения спонтанной ХЛ, реакция зависела от концентрации карбофоса.

Таким образом, малые концентрации карбофоса (1 мг/л) оказали некоторое стимулирующее воздействие на клеточное звено иммунитета.

Большие концентрации пестицида (10 мг/л) вызывали сдвиг лейкоцитарной формулы крови в сторону уменьшения доли антителообразующих клеток. Указанные эффекты сохранялись, в основном, и после "отмывки".

Обобщая полученные результаты, можно отметить, что карбофос оказывает существенное воздействие на иммунную систему рыб, в частности, на реакцию фагоцитирующих клеток, что находит свое отражение в изменении нормального функционирования иммуноцитов и проявляется при низких концентрациях токсиканта (1 мг/л) в более интенсивном ХЛ ответе (как спонтанной, так и стимулированной ХЛ), а также уменьшении времени максимального ответа. В этом заключается физиологический смысл, так как способность к быстрой адгезии и интенсивность ХЛ ответа демонстрируют способность сенсибилизированных клеток к быстрой реакции на антиген, что в дальнейшем мы и наблюдаем в случае стимулированной зимозаном ХЛ.

После "отмывки" исследуемые показатели у рыб, получивших меньшее количество токсиканта, быстрее возвращаются к норме.

Морфологической основой иммунной системы рыб является ретикулолимфоидная ткань (РЛТ), состоящая из различного типа подвижных и неподвижных иммуноцитов, эндотелиоцитов, клеток Купфера и т.д. Основная масса клеток этой ткани у рыб, в зависимости от их экологических и видовых особенностей, концентрируется в тимусе, селезенке, почках, печени, черепной полости (у осетровых), в области пищевода, гонад и т.д. (Микряков, 1984, 1991; Лукьяненко, 1971; Zapata, 1983; Ellis, 1988). Кроме того, в тканях этих органов формируются меланома-



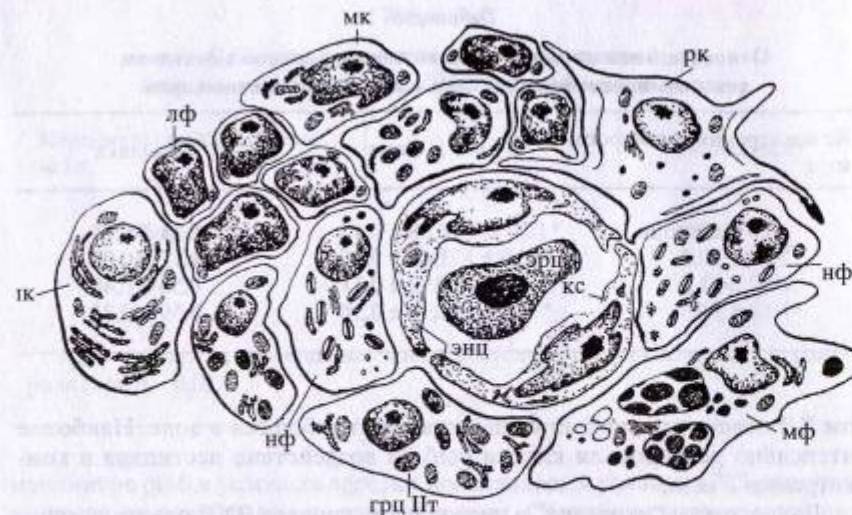


Рис. 2. Схема гистологической структуры селезенки

Обозначения: гпц II – гранулоцит II типа; кс – кровеносный синус; лф – лимфоцит; МК – молодая клетка; мф – макрофаг; нф – нейтрофил; плк – плазматическая клетка; рк – ретикулярная клетка; энц – эндотелиоцит; эрц – эритроцит

крофагальные центры. Основной функцией данной ткани является нейтрализация, разрушение и элиминация чужеродного материала, синтез специфических антител и медиаторов иммунного ответа: интерферона, интерлейкина, цитотоксических факторов и т.д.

Учитывая важную роль РЛТ в реализации разнообразных функций иммунной системы и поддержании антигенно-структурного гомеостаза, нами проведено гисто- и цитологическое изучение состояния данной ткани в селезенке, печени и почках. Нами было установлено, что в исследуемых органах эта ткань реагирует изменением состава и структуры иммуноцитов уже при минимальных концентрациях пестицида.

В норме селезенка карпа представляет собой компактный орган, в соединительнотканной строме которого располагаются элементы красной и белой пульпы, хотя разделение это и не столь явное, как у теплокровных животных. Кровеносные сосуды (артериолы и венулы) окружены, как правило, миелоидными клетками и макрофагами, образуя так называемые мелано-макрофагальные центры. Венозные синусы имеют эндотелиальную выстилку. Селезенка является основным местом эритропоэза, поэтому в строме органа располагаются кластеры нормоцитов, эритробластов и зрелых эритроцитов, а также местом лимфо- и гранулопоэза (рис. 2).

При воздействии карбофоса наблюдали гипертрофию эндотелиальных клеток, периваскулярный отек, а также активацию деятельности макрофагов и эозино- и базофильных гранулоцитов в околососудистых областях, что проявлялось в характерном опустошении вторичных гранул гранулоцитов и появлении областей с некрозом тканей. Одно-

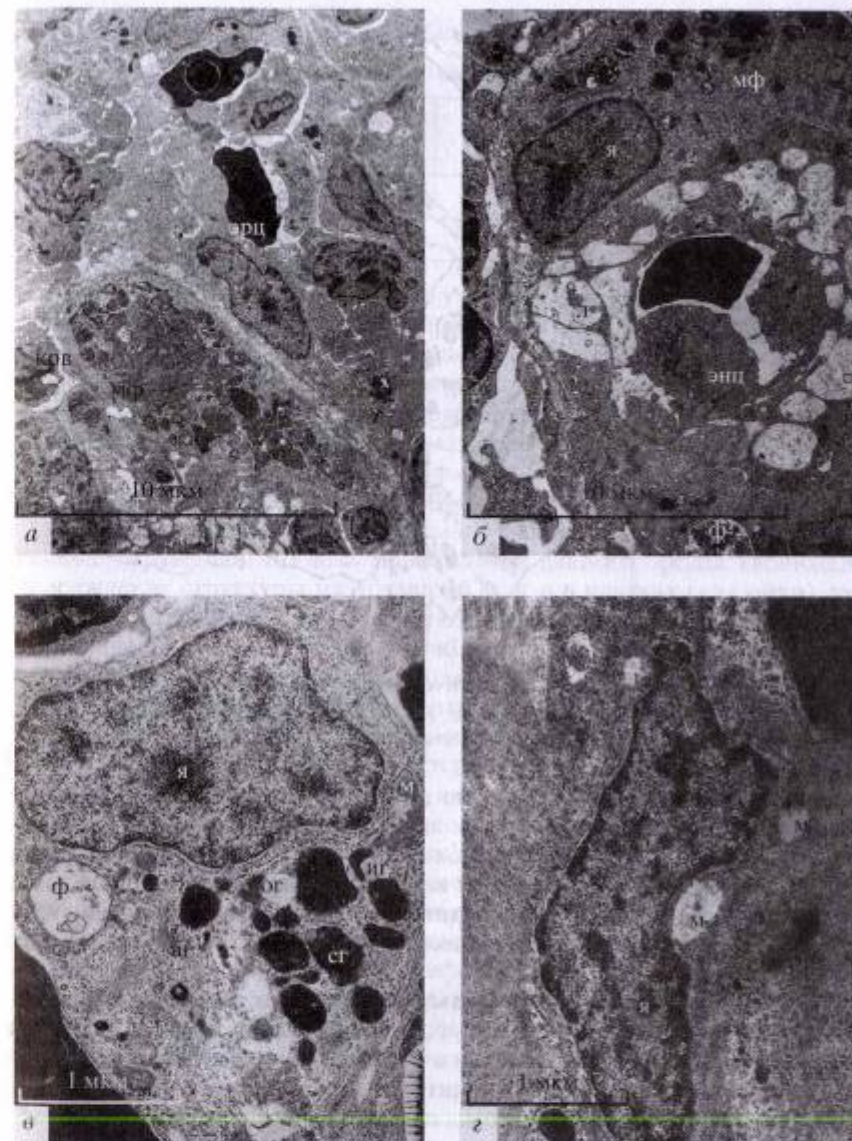


Рис. 3. Изменение структуры тканей и клеток селезенки карпа под действием карбофоса

а – общий вид ткани селезенки, карбофос 1 мг/л; кв – клетка с радиально расположенными везикулами; стрелкой (→) обозначены лакуны с межклеточной жидкостью; б – периваскулярный отек, карбофос 0,1 мг/л; л – лакуна с межклеточной жидкостью; ф – фагосома; энц – эндотелиоцит; в – гранулоцит II типа, карбофос 5 мг/л; аГ – аппарат Гольджи; гэр – гранулярный эндоплазматический ретикулум; иг – измененная гранула; м – митохондрия; ог – опустошенная гранула; сг – специфическая гранула; я – ядро; з – лимфоидная клетка с разрушенными митохондриями, карбофос 5 мг/л. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2



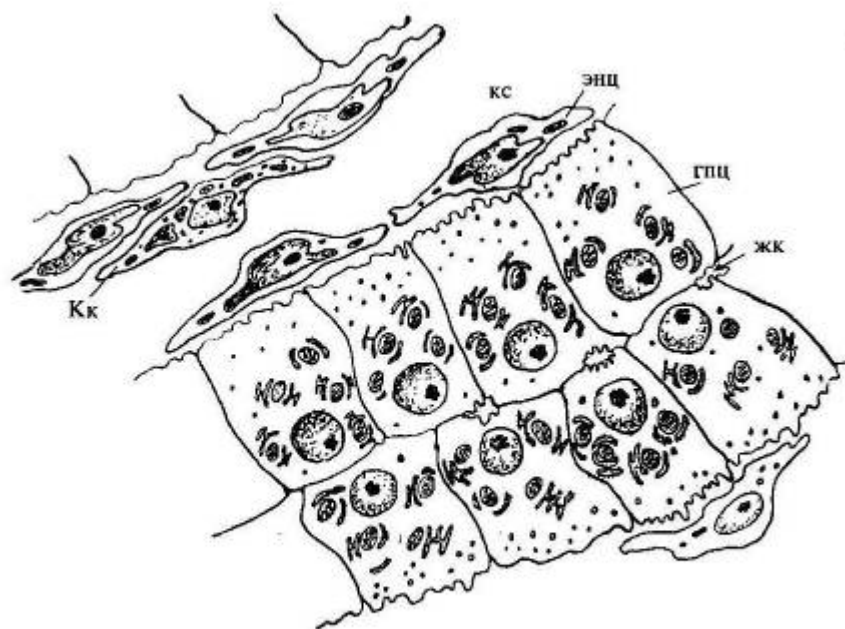


Рис. 4. Схема гистологической структуры печени  
гпц – гепатоцит; жк – желчный каналец; Кк – клетка Купфера. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2 и 3

временно наблюдали повреждение структуры малодифференцированных клеток и малых лимфоцитов: автолиз (частичный при концентрации токсиканта 1 мг/л и почти полный при 5 и 10 мг/л) митохондрий (МТХ), уменьшение складчатости внутренней мембраны и появление в них ламеллярных телец. Это свидетельствует о нарушении процессов окислительного фосфорилирования при действии фосфорорганических пестицидов (рис. 3а–г).

Структура клеток нейтрофильного ряда практически не отличалась у опытных и контрольных рыб, хотя при концентрациях карбофоса 5 и 10 мг/л встречались клетки с просветлением и частичным лизисом матрикса цитоплазмы и пиноцитозными пузырьками. Обнаруживаемые в макрофагах фаголизосомы с неклеточным содержимым позволяют говорить об активной роли этих клеток в утилизации поврежденных элементов селезеночной пульпы и участии их в процессах очищения крови от чужеродных веществ. Опустошение вторичных гранул эозино- и базофильных гранулоцитов зависело от концентрации пестицида и было максимальным при 10 мг/л.

В норме печень карпа имеет достаточно выраженное трабекулярное строение. Основная масса печеночных клеток представлена гепатоцитами с отдельными включениями клеток панкреаса. В норме гепатоциты имеют округлое, правильной формы ядро с гомогенным гетерохроматизмом и цитоплазмой, заполненной митохондриями и каналами шерохова-

Таблица 9

Содержание гликогена в гепатоцитах (в усл. ед./кв. мкм)				
Концентрация карбофоса, мг/л	1	5	10	Контроль
Содержание гликогена	2411 ± 247	5423 ± 202	3369 ± 290	7419 ± 315

того эндоплазматического ретикулума (ШЭР) и гранулами гликогена. Апикальной частью гепатоцита обращены к полостям синусоидов, а базальные части 3–4 соседних гепатоцитов образуют стенки желчных капилляров (рис. 4). Синусоиды выстланы эндотелиоцитами, в местах разветвления синусоидов, а также прохождения более крупных кровеносных сосудов имеется развитая РЛТ, которая представлена Купферовскими клетками, лимфоцитами, макрофагами и клетками гранулярного ряда. Плазматические клетки в печени нами не наблюдались.

При действии карбофоса в ткани печени были отмечены определенные нарушения. Во всех типах клеток данного органа наблюдали повреждение структуры митохондрий (как и в клетках селезенки), которое в гепатоцитах было сопряжено с исчезновением или уменьшением количества гранул гликогена (табл. 9).

Подобные изменения можно объяснить нарушением окислительно-восстановительного фосфорилирования в митохондриях и значительными энергос затратами клетки и исчезновением гранул гликогена. Вследствие этого отмечено характерное кольцевидное расположение каналов ШЭР вокруг МТХ и вдоль клеточной мембраны (рис. 5).

В цитоплазме малых лимфоцитов также отмечались повреждения структуры МТХ (от уменьшения складчатости внутренней мембраны до ее растворения и образования ламеллярных телец) и появление электронно-плотных лизосомоподобных гранул.

Экспозиция рыб в различных концентрациях токсиканта не вызвала изменений ультраструктуры Купферовских клеток.

Нейтрофильные гранулоциты были отмечены, в основном, в соединительнотканых прослойках и в строме вокруг крупных сосудов. Они содержали палочковидное или сегментовидное ядро и цитоплазму, за-

Таблица 10

Степень дегрануляции базофильных гранулоцитов				
Концентрация карбофоса, мг/л	1	5	10	Контроль
Соотношение гранул	1,16 ± 0,37	1,35 ± 0,27	2,14 ± 0,24	0

Примечание: приводится отношение числа опустошенных гранул к не опустошенным.



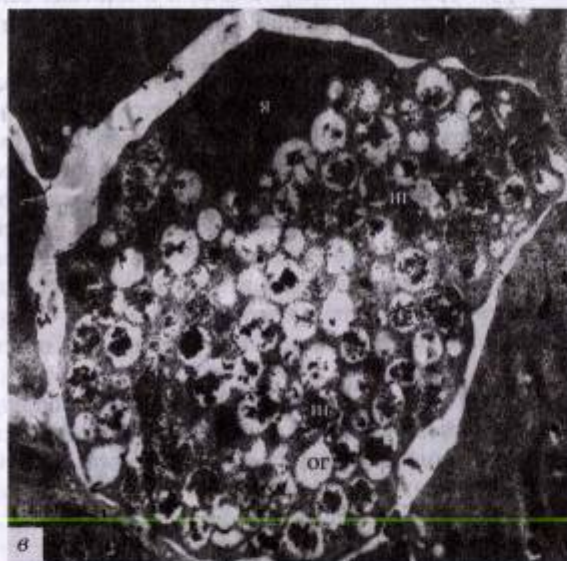
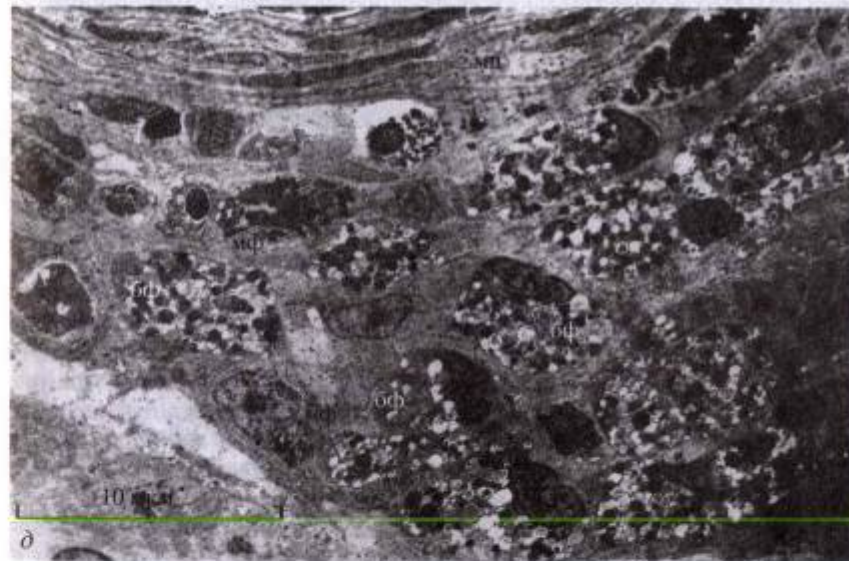
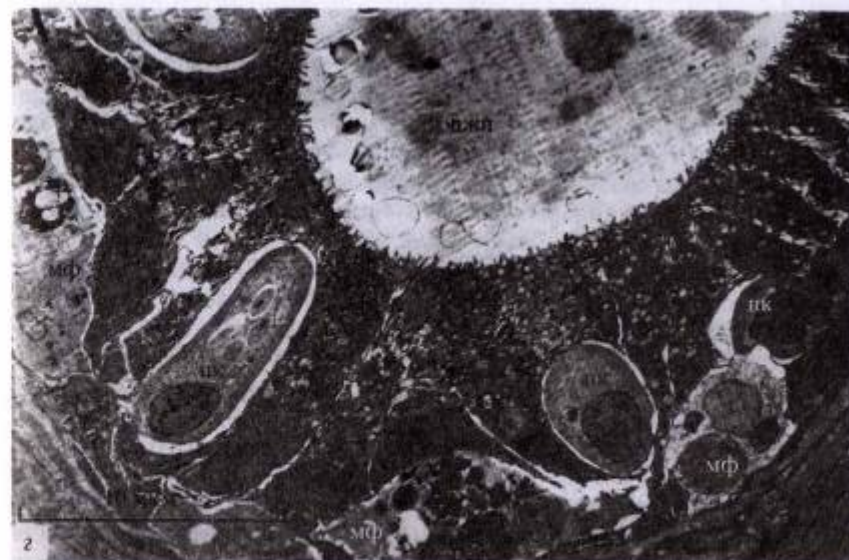


Рис. 5. Изменение структуры клеток печени карпа под действием карбофоса  
 а – участок цитоплазмы гепатоцита, контроль. гг – гранула гликогена; пак – плотный контакт; шк – щелевидный контакт; б – участок цитоплазмы гепатоцита, карбофос 5 мг/л;  
 в – эозинофил; з – участок эпителиальной выстилки желчного протока, карбофос 10 мг/л; пак – палочковая клетка; д – макрофаго-гранулоцитарная манжета вокруг желчного протока, карбофос 10 мг/л. мц – мнощит; бф – базофил. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2–4



полненную вторичными гранулами специфичной структуры с характерным кристаллоидным включением. Структура гранул была сходной у контрольных и опытных рыб.

Наиболее явные изменения обнаруживали в цитоплазме эозино- и базофилов. В эозинофильных гранулоцитах отмечалось почти полное опустошение специфичных гранул уже при наименьшей из данных концентраций карбофоса, опустошение специфических гранул базофильных гранулоцитов зависело от концентрации пестицида (табл. 10, рис. 5в).



Были отмечены скопления базо- и эозинофильных гранулоцитов около крупных кровеносных сосудов и желчных протоков с образованием своеобразных "манжет" вокруг них, что позволяет говорить о развитии воспалительных процессов при воздействии токсиканта (рис. 5д).

Отмечено также увеличение числа палочковых клеток в печени у опытных рыб по сравнению с контрольными (от единичных, случайно встречаемых, у контрольных рыб до 3–4 на поле зрения при концентрации карбофоса 10 мг/л) (рис. 5г). Как и многие другие авторы, ранее описывавшие эти клетки (Балабанова, Матей, 1987), мы наблюдали их как в эпителии желчных протоков, так и непосредственно в ткани, где они не имели выхода в эпителиальные или эндотелиальные выстилки. Несмотря на явно секреторную функцию этих клеток и непосредственную связь увеличения их числа со стрессовым воздействием на рыб, функция их в данном случае не ясна.

Головной отдел почти представляет собой орган, состоящий в основном из клеток гемопоэтической ткани, и содержит большое количество недифференцированных клеток, незрелых гранулоцитов и плазмочитов. В туловищном отделе почек клетки лимфомиелоидной ткани располагаются между нефронами и выделительными канальцами (рис. 6а). Под воздействием карбофоса наблюдались изменения структуры клеток, аналогичные описанным для селезенки и печени: изменения МТХ во всех клетках, но преимущественно в незрелых, и опустошение вторичных гранул зрелых эозино- и базофилов (табл. 11). Следует отметить также визуальное уменьшение количества лимфоцитов и увеличение содержания незрелых нейтрофильных гранулоцитов при действии больших концентраций пестицида (рис. 6б–г).

Мы не наблюдали трансформации лимфоцитов в плазматические клетки, что может косвенно свидетельствовать о том, что кратковременная экспозиция в токсиканте не провоцирует антителиогенеза.

Таким образом, реакция ткани иммунокомпетентных органов карпа на воздействие сублетальных концентраций карбофоса носит воспалительный характер, что подтверждается появлением периваскулярных отеков капилляров селезенки, гипертрофии эндотелиальных клеток синусоидов, а также скоплений эозино- и базофильных клеток в соединительнотканной капсуле вокруг крупных сосудов и желчных протоков. Максимальные повреждения тканей наблюдаются в областях с наиболее активным кровоснабжением или кровяных депо. Подобное предположение подтверждается наличием скоплений гранулоцитов вокруг желчных протоков.

Было установлено, что карбофос оказывает повреждающее действие на энергетические структуры клеток, и чем активнее обмен клетки, тем меньшая концентрация токсиканта способна вызвать эти нарушения. Именно поэтому автолиз митохондрий, уменьшение складчатости внутренней мембраны и образование ламеллярных телец наблюдались прежде всего в малодифференцированных клетках, гепатоцитах и лимфоцитах, а также в незрелых гранулоцитах, то есть в клетках с развитыми ШЭР, и, следовательно, с активным транспортом РНК и транскрипцией белка. Нарушение митохондриальной структуры влечет за

собой активное потребление гликогена как запасного энергетического вещества и может косвенно свидетельствовать о кратковременном переходе клеток на гликолитический путь синтеза АТФ, что подтверждается исчезновением гранул гликогена в цитоплазме нейтрофильных гранулоцитов и гепатоцитов.

Опустошение вторичных гранул эозино- и базофилов позволяет говорить о непосредственном участии этих клеток в процессах детоксикации пестицида, а их скопление вокруг кровеносных синусов и желчных протоков также подтверждает это предположение.

Увеличение количества палочковых клеток и высвобождение их секрета в стрессовых ситуациях при загрязнении естественных водоемов либо в модельном эксперименте свидетельствует о неспецифической защитной функции этих клеток в организме.

*Влияние карбофоса на структуру и функцию иммунной системы рыб в условиях хронического эксперимента.* Проведенные исследования показали, что гуморальные факторы иммунитета на воздействие карбофоса реагировали неоднозначно (табл. 12–16), а выявленные изменения носили фазовый характер.

БАСК, как было показано ранее (Микряков и др., 1990), не является величиной постоянной и колеблется в зависимости от исходного состояния организма рыб, условий их содержания, сезона года, воздействия антигенных раздражителей, паразитарных и токсических факторов. Нами установлено, что этот показатель на воздействие карбофоса реагирует изменением своей активности по отношению к тест-бактериям. На первых этапах пребывания рыб в растворе КБФ (через 6 час и 1 сут), БАСК рыб сильно повышалось, что, вероятно, связано с мобилизацией защитных сил организма на воздействие стресс-факторов. Значения этого показателя у опытных рыб почти на порядок превышали контрольные цифры. На 4-е сутки у рыб, находящихся в растворе токсиканта, антимикробный эффект сыворотки крови полностью исчезал (фаза подавления функций неспецифических факторов иммунитета). Через 7 дней БАСК рыб достигала контрольных значений, период относительной стабилизации длился 1–1,5 месяца. К концу срока наблюдений антимикробная активность сыворотки крови вновь снизилась до нулевых значений. Характер изменения БАСК во 2-й и 3-й группах рыб, подвергнутых, иммунизации бактериальным антигеном (2 группа) и совместному воздействию антигенного раздражителя и КБФ (3 группа) отличался от такового у рыб, содержащихся только в растворе КБФ. Данные анализа динамики БАСК 3-ей группы рыб свидетельствуют, что бактериальный антиген играет роль "блокатора" токсического эффекта КБФ на гуморальные факторы естественного иммунитета рыб, вследствие чего показатели антимикробных свойств сыворотки крови на всем протяжении эксперимента существенных изменений не претерпевали. Иммуностимулирующий эффект антигена на БАСК, выявленный у рыб 2-й группы через 1 сут и 1 мес, подтверждает результаты, полученные ранее на карпах, подвергнутых двух- и трехкратной иммунизации бактериальным антигеном *Aeromonas punctata* (A. hydrophila).



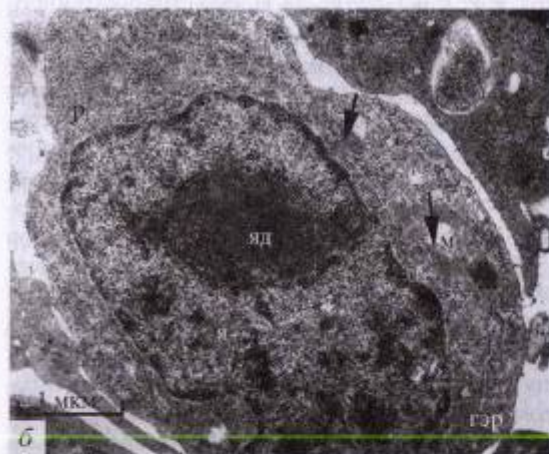
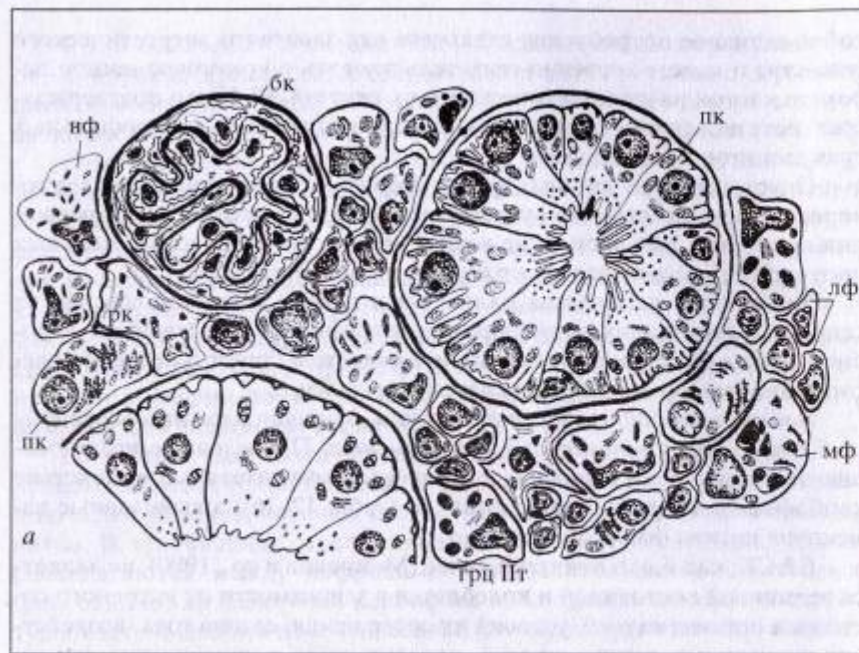
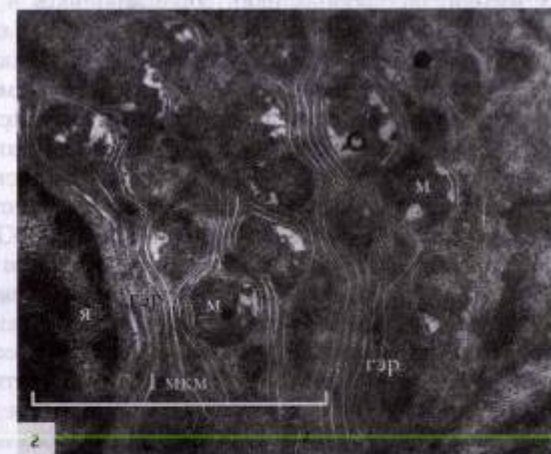
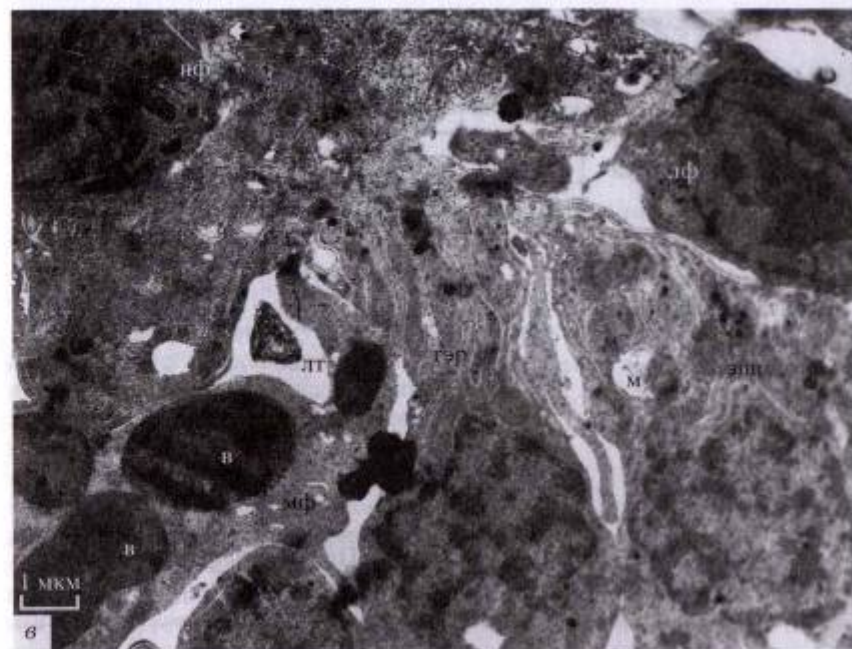


Рис. 6. Изменение структуры ткани и клеток почки под действием карбофоса. а – схема строения туловищной почки. бк – боуменова капсула, ПК – проксимальный каналец; эк – эпителиальные клетки. б – молодая клетка, карбофос 1 мг/л. Стрелкой (→) обозначены поврежденные митохондрии. в – инфильтрация дистального участка нефрона лимфоцитами и макрофагами, карбофос 5 мг/л. в – включение; лт – ламеллярное тельце. г – участок цитоплазмы эпителиоцита с поврежденными митохондриями, карбофос 5 мг/л. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2–5.



Сходный с БАСК характер реагирования наблюдался нами при исследовании содержания циркулирующих или неспецифических иммунных комплексов. Ранее было показано, что уровень содержания НИК в остром опыте с различными концентрациями карбофоса повышен при использовании низких значений токсиканта. В связи с этим было интересно проследить динамику уровня содержания НИК при длительном воздействии данного пестицида на рыб. Результаты исследования показали, что уровень содержания НИК в первые 7 дней наблюдений не выходил за пределы контрольного уровня (за исключением первых суток).



Таблица 11

**Виды нарушений структуры РЛТ иммунокомпетентных органов карпа при действии карбофоса**

Концентрация токсиканта, мг/л	1			5			10		
	Пк	С	Пч	Пк	С	Пч	Пк	С	Пч
Автолиз митохондрий	+	+	++	+	+	++	+	+	++
Периваскулярные отеки	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Потребление гликогена	-	-	++	-	-	+	-	-	++
Дегрануляция эозинофилов	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Дегрануляция базофилов	+	+	+	+	+	++	+	+	++

*Примечание:* Пк – почка; С – селезенка; Пч – печень; -, +, ++ – степень проявления признака.

У иммунизированных рыб, содержащихся в токсиканте, количество НИК было ниже контроля. Через 1 мес. наблюдений прослеживалась устойчивая тенденция к росту уровня НИК, которая более выражена у карпов, находившихся в токсиканте, в то время как на иммунизированных рыб карбофос оказывал угнетающее действие.

Таким образом, КБФ стимулирует образование в крови исследуемых рыб неспецифических иммунных комплексов, но в то же время у инъецированных рыб, когда их иммунная система находится в напряженном состоянии, стимулирующий эффект КБФ на синтез НИК подавляется, по-видимому, бактериальный антиген блокирует действие КБФ. Сопоставление результатов анализа динамики БАСК и НИК показывает, что под действием бактериального антигена подавляется влияние пестицида на гуморальные факторы естественного иммунитета.

Анализ данных по определению активности процессов перекисного гемолиза эритроцитов у рыб, содержащихся в растворе карбофоса и при совместном воздействии токсиканта и бактериального антигена, по сравнению с контролем, свидетельствует о нарушении или резком торможении иммунобиохимических процессов в эритроцитах (табл. 12).

Усиление процессов ПГЭ у опытных рыб неоднозначно свидетельствует о дегенеративных процессах в мембране эритроцитов, снижении стабильности липидной ее части, что может приводить к изменению способности эритроцитов реагировать на внешний иммунный сигнал. ПГЭ у рыб, содержащихся в растворе КБФ, по сравнению с контролем был повышен на 54%. У рыб, подвергшихся иммунизации и химическому загрязнению, активность гемолиза эритроцитов превышала контрольные значения на 58%.

Таблица 12

**Перекисный гемолиз эритроцитов у опытных карпов (4-е сут опыта)**

Условия опыта	Активность гемолиза эритроцитов, усл. ед.
Контроль	17,7 ± 2,13
Карбофос	27,2 ± 4,12
Карбофос + бак. антиген	28,1 ± 3,07

Данные анализа интенсивности процессов перекисного окисления липидов в тканях рыб в наших опытах также подтверждают наличие негативных изменений, происходящих в исследованных тканях рыб и согласуются с данными, полученными по тесту с перекисным гемолизом эритроцитов (табл. 13, 14).

Для рыб, подвергнутых воздействию карбофоса, бактериального антигена, а также их комплексному влиянию, отмечены отклонения уровней ПОЛ по сравнению с рыбами, содержащимися в чистой воде. Однако, эти изменения на протяжении эксперимента носили неоднозначный характер в разных тканях. В этой связи нами представлена динамика ПОЛ в печени рыб (иммунокомпетентный орган) и в скелетных мышцах. Наиболее интересны данные, зарегистрированные в печени (табл. 13).

В отличие от мышц, в печени карпов отмечены более существенные отклонения уровней ПОЛ от контрольных параметров, что обусловлено физиологическим значением и функциональной нагрузкой этой ткани.

Печень, как орган, принимающий активное участие в осуществлении иммунных реакций, а также детоксикации чужеродных веществ, наиболее сильно реагирует на влияние поллютантов. Параллельно с детоксикацией ксенобиотиков (их окислением, гидроксилированием, конъюгированием и др.), загрязняющих среду обитания, в печени рыб происходит интенсивная деградация естественных метаболитов до конечных продуктов обмена, которые выводятся из организма в основном через кровь, почки и желчные протоки. Полифункциональность печени, принимающей на себя удар химических, бактериальных и других загрязнений водной среды, может адекватно отражаться на ее иммуно-биохимическом статусе.

Полученные отклонения уровней перекисей липидов объясняются также и тем, что многие протекающие в организме иммунные, биохимические и физиологические процессы в экстремальных условиях влияния токсиканта и бактерий, затрагивают иммунную систему, лежащую в основе тонкой регуляции взаимоотношений собственных и чужеродных антигенов. Известно, что любой сильный стресс обычно подавляет иммунитет животных, в то время как слабые воздействия могут активизировать защитные силы организма (Ведемейер и др., 1981; Микряков, 1991). В иммунных реакциях, протекающих в организме, участвует целый класс регуляторных молекул, содержащих липидную часть. Считается, что липидсодержащими молекулами можно целенаправленно

Таблица 13

Динамика уровня ПОЛ к контрольному в печени карпа  
в зависимости от условий опыта

Условия опыта		Время с начала эксперимента					
		6 ч	1 сут	4 сут	7 сут	1 мес	2,5 мес
Контроль	Опт. плотность	0,431	0,431	0,721	0,488	0,488	0,488
	Сод. перекисей, %	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Карбофос	Опт. плотность	0,501	0,501	0,839	0,879	0,865	0,901
	Сод. перекисей, %	116,2	116,2	116,4	180,1	177,3	184,6
Бакт. антиген	Опт. плотность	0,427	0,400	0,899	0,802	0,867	—
	Сод. перекисей, %	99,0	93,3	124,7	164,3	177,7	—
Карбофос + бакт. антиген	Опт. плотность	0,429	0,512	0,921	0,884	0,928	0,972
	Сод. перекисей, %	99,5	118,8	127,7	181,1	190,2	199,2

Примечание: оптическая плотность указана при 535 нм.

регулировать активность клеток иммунной системы (Петров и др., 1984).

В печени опытных рыб наиболее выраженные отклонения уровней липидов отмечены в конце эксперимента. Совместное воздействие карбофоса и бактериального антигена оказывало более выраженное влияние на процессы ПОЛ, чем раздельное. Их токсичность, вероятнее всего, определяется комплексным влиянием на органы, клетки, субклеточные структуры, макромолекулы и др., что отражается на организме в целом. Поэтому колебания уровней перекисей липидов имели сложный и неоднозначный характер, связанный с усилением деструктивных процессов к концу опыта.

Вероятно, при неблагоприятных воздействиях может не только изменяться микровязкость и проницаемость мембран, но и модулироваться активность многих мембраносвязанных ферментов в иммунных клетках, ответственных за осуществление иммунных функций. Мы наблюдали некоторое снижение ПОЛ ниже контрольного уровня на первых этапах эксперимента, а дальнейший подъем ПОЛ выше контрольного уровня связан, вероятно, с уменьшением числа лимфоцитов и лейкоцитов, изменением ненасыщенности веществ липидной природы. Интенсивность свободнорадикальных и перекисных процессов в

Таблица 14

Динамика уровня ПОЛ к контрольному в мышцах карпа  
в зависимости от условий опыта

Условия опыта		Время с начала опыта					
		6 ч	1 сут	4 сут	7 сут	1 мес	2,5 мес
Контроль	Опт. плотность	0,094	0,094	0,131	0,122	0,122	0,122
	Сод. перекисей, %	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Карбофос	Опт. плотность	0,088	0,113	0,139	0,132	—	0,144
	Сод. перекисей, %	89,3	120,2	106,1	108,2	—	118,0
Бакт. антиген	Опт. плотность	0,102	0,085	0,130	0,138	0,180	0,158
	Сод. перекисей, %	108,5	90,4	99,2	113,1	147,5	129,5
Карбофос + бакт. антиген	Опт. плотность	0,097	0,120	0,140	0,141	—	0,168
	Сод. перекисей, %	103,1	127,6	106,8	115,5	—	137,7

печени достигла к концу опыта уровней, при которых организм был не в состоянии наработать необходимое количество антиоксидантов ( $\alpha$ -токоферолов, в частности) для их ингибирования, в результате чего накапливались продукты, сопутствующие свободно-радикальному и перекисному окислению типа перекисей, гидроперекисей, альдегидов, кетонов и др., которые обладают активностью плазматических ядов и приводят, в конечном итоге, к нарушению метаболизма, затрагивающего нормальное функционирование многих систем, в том числе и иммунной.

Можно отметить, что не только в печени, но и в скелетных мышцах активировались процессы ПОЛ, продукты которого вызывают нарушения физико-химических свойств мембранных структур клетки (Окорков, Федоров, 1982), в результате чего происходит изменение проницаемости мембраны клеток мышц. Отклонения от контрольных значений в них были менее выражены по сравнению с тканью печени. Видимо, превышение физиологического уровня содержания ПОЛ служит важнейшим звеном в механизмах нарушения липидного гомеостаза мышечной ткани рыб и углубления патологии, затрагивающей основные звенья функциональной активности мышц. Повышение уровня перекисей свидетельствует о нарушении градиентной функции биомембран миоцитов мышц вследствие изменения их проницаемости, возможностей для усиления реакций ПОЛ и негативного влияния промежуточных

продуктов перекисного окисления при пребывании рыб в неблагоприятных условиях. Сочетанное влияние токсиканта и бактериального антигена вызвало устойчивое повышение процессов ПОЛ выше контрольного уровня в мышцах на всем протяжении эксперимента.

Таким образом, у карпов, находившихся в растворе токсиканта, выявлены отклонения в уровне ПОЛ от контрольных значений. Совместное воздействие химического загрязнения и бактериального антигена оказывало более выраженное влияние на эти процессы.

Представлялось интересным изучить влияние КБФ на синтез специфических антител к бактериальному антигену и токсиканту. Ранее нами было установлено, что у рыб, находившихся в растворе фенола, подавляется интенсивность антителообразовательной функции (Гончаров, Микряков, 1970). Следует отметить, что до сих пор основное внимание исследователей было обращено на выяснение характера влияния токсических веществ на интенсивность антителогенеза у рыб, подвергнутых предварительной иммунизации тем или иным антигенным раздражителем, но работ по определению влияния токсических веществ на синтез антитоксинов в доступной литературе нет.

Между тем, исследование данного вопроса имеет важное значение для понимания механизмов нейтрализации токсических веществ и сенсibilизации к ним. Последнее представляет не только теоретический, но и большой практический интерес при разработке методов диагностики природы загрязняющего вещества.

Учитывая ранее выявленный факт сенсibilизации рыб Рыбинского водохранилища к фенольным соединениям и ароматическим углеводородам после крупномасштабной аварии на промышленных предприятиях г. Череповца в 1987 г. (Микряков и др., 1990; Микряков и др., 1991) и рыб оз. Неро к пестицидам (Попов и др., 1997), нами впервые проведено экспериментальное исследование способности рыб, содержащихся в растворе токсиканта, вырабатывать антитоксические антитела (АТА).

Опыты ставили на иммунизированных бактериальным антигеном и неиммунизированных карпах, помещенных в раствор КБФ. Анализ полученных данных свидетельствует, что рыбы на присутствие в воде пестицида реагируют синтезом антитоксических антител (табл. 15).

Из представленных в табл. 15 данных видно, что образование АТА зависит от условий опыта. У интактных (неиммунизированных) рыб, находившихся в растворе КБФ, образование антител носило двухфазный характер, тогда как у предварительно иммунизированных бактериальным антигеном рыб – однофазный. Максимальное количество антител у интактных карпов выявлено через 1 и 30 сут, тогда как у иммунизированных – через 6 ч и 1 сут. В остальные периоды наблюдения АТА выявлены при низких разведениях сыворотки. Сравнение результатов по изучению антителообразовательной функции с динамикой изменения других гуморальных факторов иммунитета показало, что бактериальный антиген не оказывает блокирующего действия на синтез АТА на 1-х этапах эксперимента, как это было в случае с БАСК. Наоборот,

Таблица 15

Влияние карбофоса на интенсивность образования антитоксических антител, в титрах разведения сыворотки

Время	Карбофос	Карбофос + бактериальный антиген
6 ч	$5,0 \pm 2,9$	$320,0 \pm 0,0$
1 сут	$650,0 \pm 363,8$	$256,0 \pm 39,1$
4 сут	$16,0 \pm 16,0$	$36,0 \pm 12,9$
7 сут	$28,0 \pm 13,2$	$20,0 \pm 6,3$
30 сут	$320,0 \pm 49,3$	$60,0 \pm 20,0$
90 сут	$30,0 \pm 17,3$	$30,0 \pm 12,6$

в течение первых суток уровень АТА был выше, чем в последующие сроки наблюдения.

Вместе с тем, синтез специфических антител к бактериальному антигену подавлялся под влиянием КБФ, что особенно сильно заметно на первых этапах иммуногенеза и к концу эксперимента (табл. 16).

Таким образом, исследование влияния КБФ на гуморальные факторы иммунитета позволили получить новые данные о характере реагирования механизмов антибиотического и антитоксического иммунитета. Выявленные нами в сыворотке крови АТА свидетельствуют, что рыбы, как и высшие позвоночные, – человек (Алексеева, Дуева, 1978), способны синтезировать антитела к низкомолекулярным соединениям. Обнаруженный факт синтеза АТА к КБФ может служить основой при разработке иммуносерологических мето-

Таблица 16

Влияние карбофоса на синтез антибактериальных антител у иммунных карпов, в титрах разведения сыворотки крови

Время взятия пробы	Опыт	Контроль
6 ч	$45,0 \pm 40,0$	$352,0 \pm 78,4$
1 сут	$80,0 \pm 32,0$	$280,0 \pm 40,0$
4 сут	$20,0 \pm 6,3$	$328,0 \pm 240,0$
7 сут	$114,0 \pm 20,7$	$72,5 \pm 32,5$
30 сут	$88,6 \pm 50,5$	$66,7 \pm 13,3$
90 сут	$4,0 \pm 2,4$	$164,3 \pm 47,8$



Таблица 17

Влияние карбофоса и иммунизации на гематологические показатели карпа

Время экспозиции	Тип клеток, %	Контроль	Карбофос	Иммунизация	Карбофос + иммунизация
6 ч	Лимфоциты	64,2 ± 7,8	52,5 ± 5,0	30,0 ± 4,6*	32,6 ± 4,5*
1 сут			73,2 ± 4,5	39,0 ± 5,4*	38,4 ± 4,8*
6 ч	ПЯН	3,0 ± 1,2	8,3 ± 1,5*	7,0 ± 2,8	5,4 ± 1,2
1 сут			3,8 ± 1,1	7,0 ± 2,6	3,2 ± 0,6
6 ч	СЯН	1,0 ± 0,4	4,0 ± 0,4*	3,4 ± 1,0	2,4 ± 1,9
1 сут			1,2 ± 0,5	0	5,4 ± 3,4
6 ч	Метамиелоциты	4,0 ± 1,7	20,0 ± 3,5*	15,4 ± 4,0*	10,4 ± 2,3*
1 сут			7,8 ± 1,9	9,5 ± 3,0*	9,2 ± 1,2*
6 ч	Тромбоциты	27,8 ± 5,2	14,5 ± 1,6*	44,4 ± 4,0*	49,0 ± 5,9*
1 сут			14,0 ± 3,5*	49,5 ± 6,3*	44,2 ± 3,9*

Примечание: \* – помечены значения, достоверно отличающиеся от контрольных. ПЯН – палочкоядерные нейтрофилы, СЯН – сегментоядерные нейтрофилы.

дов диагностики отравления рыб и определения природы токсического вещества.

Оценку клеточных факторов иммунитета осуществляли по составу и относительному содержанию лейкоцитов в периферической крови и иммунокомпетентных органах, фагоцитарной активности лейкоцитов рыб, подвергнутых длительному воздействию КБФ.

Исследования изменений, происходящих в лейкоцитарной формуле двухлеток карпа под воздействием карбофоса показали, что наиболее явные сдвиги отмечены через 6 час после начала эксперимента, затем анализируемые показатели в основном возвращались к норме.

Были подсчитаны следующие типы лейкоцитов: лимфоциты, палочко- и сегментоядерные нейтрофилы, метамиелоциты, а также тромбоциты.

Как видно из табл. 17, лимфоциты составили большую часть лейкоцитов. Их относительное содержание под воздействием карбофоса достоверно не изменилось, на бактериальный же антиген реакция этих клеток была быстрой и весьма выраженной: доля лимфоцитов по сравнению с контролем в первый срок упала в 1,5–2 раза.

Ответ нейтрофильного звена был совершенно иным: относительное содержание этих клеток возросло, причем особенно сильно под воздействием пестицида. У иммунизированных рыб увеличение доли поли-

морфноядерных клеток было более продолжительным. Рыбы, подвергшиеся одновременному воздействию карбофоса и бактерий, продемонстрировали менее выраженные сдвиги по этим показателям, чем только токсиканта или иммунизации.

Описанная выше тенденция изменения относительного количества нейтрофилов была характерна и для метамиелоцитов.

Наиболее четкая реакция на применяемые воздействия была выявлена у тромбоцитов. В то время как карбофос вызвал двукратную тромбопению, бактериальный антиген, даже в сочетании с пестицидом, привел к резкому росту данного показателя, причем, указанные сдвиги сохранились в течение суток практически без изменений.

Таким образом, после воздействия карбофоса в течение суток не выявлено значимого сдвига лишь в процентном содержании лимфоцитов. Однако, известно, что при более длительном воздействии токсикантов самых различных типов – пестицидов, тяжелых металлов, нефтяного загрязнения и многих других – уже через несколько суток отмечается статистически достоверная лимфопения (Кузьмина, Колядинская, 1991; Казлаускене, Восилене, 1995; Микряков, Лапирова, 1997). В большинстве случаев достоверное снижение относительного содержания лимфоцитов, характерное для картины неспецифического иммунного ответа, происходит в течение более длительного периода. Данное положение подтверждено нами в работе по изучению хронического воздействия карбофоса на карпов (Лапирова, 1995).

В отличие от лимфоцитов, реакция нейтрофилов развивается уже в первые часы после воздействия токсиканта: процент содержания этих клеток возрастает в несколько раз, происходит весьма значительный выброс в кровяное русло метамиелоцитов, что свидетельствует о резкой активизации фагоцитарного звена клеточного иммунитета.

После иммунизации отмечен несколько иной характер изменений исследуемых показателей. Бактериальный антиген вызвал двукратную лимфопению, проявившуюся в первые же часы. Известно, что у млекопитающих воспаление, как основной тип реакции иммунной системы на чужеродное, развивается сразу после поступления антигена, и первый ее этап характеризуется резким снижением в кровотоке доли лимфоцитов, которые мигрируют в региональные лимфоузлы и очаг воспаления. В очаг воспаления сразу устремляются и фагоцитирующие клетки – нейтрофилы, но количество их в кровотоке обычно не снижается, а даже возрастает за счет выброса резерва этих клеток из депо (Лебедев, и др. 1989). Одновременно с массивным поступлением фагоцитов в кровяное русло и очаг воспаления, резко возрастает и выход из органов гемопоэза молодых клеток – метамиелоцитов, являющихся предшественниками нейтрофилов.

Справедливость этого положения и для рыб подтверждена В.Р. Микряковым (1991), установившим в работах на карпах и карасях, что бактериальный антиген уже в первые минуты после введения прежде всего вызывает инфильтрацию лимфоцитов в большую полость рыб.

Изменение доли тромбоцитов у иммунизированных рыб говорит об активном участии этих клеток в иммунном ответе. Обращает на себя

Таблица 18

## Состав клеток крови карпа при воздействии карбофоса

Время экспозиции	Тип клеток, %				
	Лимфоциты	ПЯН	СЯН	Метамие-лоциты	Тромбоциты
6 ч	52,5 ± 5,0	8,3 ± 1,5*	4,0 ± 0,4*	20,0 ± 3,5*	14,5 ± 1,6*
1 сут	73,2 ± 4,5	3,8 ± 1,1	1,2 ± 0,5	7,8 ± 1,9	14,0 ± 3,5
4 сут	40,5 ± 1,7*	0,8 ± 0,7*	0,5 ± 0,3*	0*	58,5 ± 2,5*
7 сут	35,7 ± 4,4*	0	0,3 ± 0,2*	0,3 ± 0,2*	63,7 ± 4,1*
Контроль	64,2 ± 7,8	3,0 ± 1,2	1,0 ± 0,4	4,0 ± 1,7	27,8 ± 5,2

Примечание: \* – помечены значения, достоверно отличающиеся от контрольных. ПЯН – палочкоядерные, СЯН – сегментоядерные нейтрофилы.

внимание противоположная направленность сдвига относительного содержания тромбоцитов под влиянием различных стресс-факторов, а также тот факт, что тромбоциты, как и лимфоциты, при совместном действии токсиканта и бактерий дают картину, характерную лишь для бактериального антигена. Отмечено, что пестицид снижает реакцию на бактерии гранулоцитов любой стадии зрелости.

Таким образом, нами было установлено, что достоверные сдвиги в составе клеток периферической крови происходят уже в первые часы с начала поступления возмущающих факторов. Под воздействием сублетальных доз карбофоса происходит изменение процентного содержания тромбоцитов и нейтрофилов, в то время как в ответ на введение бактериального антигена вовлекаются все изучаемые типы клеток, в том числе и лимфоциты. При одновременном воздействии карбофоса и иммунизации ответ лимфоцитов и тромбоцитов развивается по типу реакции на бактериальный антиген. Установлено, что тромбоциты принимают активное участие в обеспечении иммунореактивности организма, достоверное изменение доли их содержания в периферической крови происходит быстро и зависит от природы стрессирующего фактора.

Было исследовано изменение показателей белой крови карпов после экспозиции в растворе карбофоса сублетальной концентрации (2 мг/л) в течение 1 недели. Установили, что после 4 сут экспозиции карпов в растворе карбофоса была отмечена достоверная лимфопения. Наблюдавшаяся в течение первых суток нейтрофилия к этому сроку сменилась нейтропенией (табл. 18). Аналогичная динамика изменения процентного содержания была характерна и для метамиелоцитов, лишь с более высоким пиком подъема через 6 час. Реакция тромбоцитов на пестицид, описанная выше для первых сут, к 4-м сменяется на противоположную, т.е. доля этих клеток резко, более чем в 2 раза, возрастает по сравнению с контролем.

Таким образом, при исследовании иммунного ответа лейкоцитов, а также реакции тромбоцитов на воздействие сублетальных концентраций карбофоса было установлено, что наиболее лабильной частью лейкоцитарного звена оказались нейтрофилы всех стадий зрелости: метамиелоциты, палочко- и сегментоядерные клетки. К 4-м суткам изменения затрагивают уже все изучаемые типы клеток: доля иммунцитов падает, в то время как процент содержания тромбоцитов возрастает. Полученные результаты согласуются с данными Головиной и Тромбицкого о том, что реакция тромбоцитов зависит от вида стрессора и срока воздействия (Головина, Тромбицкий, 1989).

Результаты хронического воздействия карбофоса в сублетальных концентрациях на относительное количество форменных элементов крови в мазках-отпечатках селезенки и головной почки карпа приведены в табл. 19 и 20.

В селезенке определяли процентное содержание малых лимфоцитов, эритробластов, миелобластов, нейтрофилов. Эозинофилы и макрофаги встречались очень редко, поэтому они не учитывались.

Через 6 ч, 1, 4, 7 и 30 сут достоверно, по сравнению с контролем, увеличивалось количество малых лимфоцитов после воздействия на рыб бактерий и карбофоса. При воздействии одного карбофоса через 7 дней увеличивалось количество малых лимфоцитов, но меньше, чем при воздействии бактерий и карбофоса. Через 6 ч, 1 и 4 сут карбофос практически не оказывал воздействия на содержание малых лимфоцитов, а к 30 сут оно уменьшалось примерно на 12%.

Во все сроки наблюдений снижалось количество эритробластов при воздействии бактерий и карбофоса, наиболее заметным было с 4 сут. Карбофос оказывал меньшее воздействие, через 7 сут подавляя образование эритробластов, а через 1 мес. несколько стимулируя этот процесс.

Количество миелобластов и нейтрофилов относительно мало, и зависимость его от условий опыта незначительна.

Таким образом, совместное действие карбофоса и бактерий или одних бактерий оказывает более сильное влияние на кроветворную функцию селезенки рыб, чем только карбофос, подавляя эритропоэз, при этом увеличивалось относительное количество – малых лимфоцитов.

В головной почке определяли относительное содержание малых лимфоцитов, недифференцированных клеток, палочко- и сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов и макрофагов.

Содержание малых лимфоцитов, составлявших около 50% форменных элементов белой крови в мазках-отпечатках головной почки, увеличивалось по сравнению с контролем через 1, 4 и 7 сут после воздействия на рыб совместно карбофоса и бактерий и одних бактерий через 1 и 4 сут. Воздействие одного карбофоса и одних бактерий вызывало достоверное уменьшение количества малых лимфоцитов через 7 сут. Некоторые изменения наблюдались в количестве бластных форм клеток – увеличение их через 6 ч и 1 сут после совместного воздействия карбофоса и бактерий и через 4 сут после воздействия бактерий.

Таблица 19

Соотношение форменных элементов крови в селезенке кариа (в %)

Вид воздействия	ЛФ	ЭБ	МБ	НФ
6 час				
Контроль	41,0 ± 0,5	43,0 ± 1,2	8,6 ± 0,9	5,0 ± 0,7
Карбофос	40,2 ± 1,2	42,2 ± 1,2	10,7 ± 0,7	6,0 ± 0,8
Бакт. антиген	50,7 ± 1,6**	30,5 ± 1,5**	13,0 ± 1,0**	5,7 ± 0,7
Карбофос + + бакт. антиген	45,7 ± 1,2**	38,2 ± 0,8	10,7 ± 0,9	5,2 ± 0,8
1 сут				
Контроль	42,2 ± 1,2	43,0 ± 1,3	10,6 ± 0,8	3,6 ± 0,4
Карбофос	37,2 ± 1,6*	46,0 ± 1,6	11,0 ± 0,8	5,0 ± 0,7
Бакт. антиген	45,6 ± 1,1	41,8 ± 1,2	7,4 ± 0,6**	5,2 ± 0,5*
Карбофос + + бакт. антиген	48,2 ± 1,1**	39,2 ± 1,1	6,8 ± 0,7**	4,4 ± 0,6
4 сут				
Контроль	52,2 ± 1,4	38,6 ± 1,4	8,0 ± 0,8	2,0 ± 0,3
Карбофос	49,0 ± 1,1	40,5 ± 1,4	8,5 ± 0,8	2,0 ± 0,7
Бакт. антиген	56,3 ± 1,4*	31,4 ± 1,5**	10,0 ± 0,7*	1,4 ± 0,4
Карбофос + + бакт. антиген	68,3 ± 1,1**	20,1 ± 1,0**	9,8 ± 0,8	1,4 ± 0,4
7 сут				
Контроль	53,0 ± 0,9	33,8 ± 1,3	11,6 ± 0,9	1,5 ± 0,4
Карбофос	66,7 ± 1,1**	21,5 ± 1,4**	10,5 ± 0,9	1,2 ± 0,3
Бакт. антиген	74,9 ± 0,8**	12,7 ± 0,8**	10,0 ± 1,0	1,9 ± 0,5
Карбофос + + бакт. антиген	71,7 ± 1,1**	15,4 ± 1,0**	11,5 ± 0,9	2,6 ± 0,3
30 сут				
Контроль	64,2 ± 1,4	23,7 ± 1,6	9,2 ± 1,1	2,7 ± 0,5
Карбофос	52,5 ± 1,3**	30,0 ± 1,2*	14,5 ± 1,0*	2,4 ± 0,7
Бакт. антиген	72,5 ± 0,8**	17,1 ± 1,0**	8,3 ± 0,7	1,9 ± 0,6
Карбофос + + бакт. антиген	78,9 ± 0,7**	11,2 ± 0,6**	7,8 ± 0,6	1,9 ± 0,5

Примечание: \* –  $p > 0,95$ ; \*\* –  $p > 0,99$ ; ЛМ – малые лимфоциты; ЭБ – эритроциты; МБ – миелоциты; НФ – нейтрофилы.

Таблица 20

Соотношение форменных элементов крови в головной почке кариа, %

Вид воздействия	ЛФ	МБ	ПАН	САН
6 час				
Контроль	54,3 ± 0,8	17,6 ± 1,2	21,6 ± 0,7	2,0 ± 0,7
Карбофос	57,6 ± 1,1	17,7 ± 1,1	22,5 ± 1,4	5,4 ± 0,4
Бакт. антиген	56,8 ± 1,4	17,6 ± 1,1	23,8 ± 1,3	1,0 ± 0,4
Карбофос + + бакт. антиген	52,8 ± 1,5	19,6 ± 1,1	24,8 ± 0,9	2,0 ± 0,5
1 сут				
Контроль	45,0 ± 1,1	16,8 ± 1,0	32,2 ± 0,8	3,8 ± 0,5
Карбофос	44,2 ± 0,9	20,0 ± 1,0*	27,0 ± 1,0**	5,4 ± 0,4
Бакт. антиген	53,0 ± 1,1**	16,0 ± 0,7	28,7 ± 1,0	1,6 ± 0,5*
Карбофос + + бакт. антиген	55,8 ± 1,1**	12,0 ± 0,8**	27,6 ± 1,1*	4,2 ± 0,6
4 сут				
Контроль	47,6 ± 1,3	14,8 ± 1,0	35,8 ± 1,2	2,3 ± 0,3
Карбофос	44,8 ± 1,1	12,4 ± 0,7	39,8 ± 1,3*	2,4 ± 0,3
Бакт. антиген	51,2 ± 1,0	24,9 ± 1,3**	21,5 ± 1,1**	1,8 ± 0,6
Карбофос + + бакт. антиген	60,5 ± 0,8**	16,0 ± 1,1	24,8 ± 1,0**	0,2 ± 0,2
7 сут				
Контроль	47,8 ± 1,7	17,4 ± 1,0	32,6 ± 1,6	1,8 ± 0,5
Карбофос	41,2 ± 1,4	15,2 ± 0,6	41,2 ± 1,4*	2,1 ± 0,6
Бакт. антиген	37,8 ± 1,3	16,4 ± 1,1	43,0 ± 1,1	2,2 ± 0,5
Карбофос + + бакт. антиген	52,2 ± 1,1	11,0 ± 1,0**	31,6 ± 1,1	3,6 ± 0,7
30 сут				
Контроль	55,4 ± 1,3	18,2 ± 1,6	25,4 ± 1,3	0,8 ± 0,4
Карбофос	48,8 ± 1,1	18,5 ± 1,0	29,9 ± 1,3*	1,2 ± 0,3
Бакт. антиген	52,3 ± 1,2	15,8 ± 0,8	31,0 ± 1,3*	0,5 ± 0,3
Карбофос + + бакт. антиген	49,4 ± 1,0**	14,9 ± 0,6	32,2 ± 1,1**	1,2 ± 0,4

Примечание: 1) \* –  $p > 0,95$ ; \*\* –  $p > 0,99$ ; 2) ЛМ – малые лимфоциты; МБ – миелоциты; ПАН – палочкоядерные нейтрофилы, САН – сегментоядерные нейтрофилы.



Содержание нейтрофилов у рыб уменьшалось через 1 сут при всех воздействиях.

Сдвиги в процессах кроветворения являются ответной реакцией организма рыб на изменения как внутренних, так и внешних факторов. Наши исследования определяют степень гемопоэтической активности селезенки и головной почки рыбы при ряде воздействий.

Результаты исследования фагоцитарной активности лейкоцитов, определенные по спонтанной хемилюминесценции при воздействии на карпов низких концентраций карбофоса, представлены в табл. 21.

Как следует из таблицы, уровень СХЛ лейкоцитов рыб, содержащихся в растворе карбофоса, мало отличается от контроля, превысив его лишь на 4 сут. Иммунизация рыб бактериальным антигеном привела к резкому всплеску СХЛ, высокий ее уровень регистрировался уже через 6 час после инъекции бактерий – 3400 имп/10 сек, затем через 1 сут несколько снизился, а на 4 сут наблюдали второй пик СХЛ. В дальнейшем, к концу эксперимента происходило затухание реакции. Несколько иной ответ мы наблюдали в случае воздействия карбофоса на иммунизированных рыб. Токсикант угнетал СХЛ в первые 6 ч, однако в последующие 1–4 сут она усиливалась, причем в данном случае наблюдали один максимум (4 сут), а в дальнейшем система возвращалась к начальному уровню иммунизированных рыб.

Одной из возможных причин увеличения СХЛ в данном случае может быть усиленный гемопоэз в результате воздействия на организм рыб токсиканта или антигена. Подсчет общего числа лейкоцитов выявил, что этот показатель у опытных рыб практически не увеличивался в первые 4 сут эксперимента, и даже снижался у иммунизированных рыб, находившихся в воде с карбофосом, однако к концу эксперимента их число превышало контрольный уровень в 2–3 раза. При этом необходимо отметить, что у иммунизированных рыб, находившихся в растворе карбофоса, пониженное число лейкоцитов сохранялось до 7 сут. Таким образом, высокие значения СХЛ прямо не зависели от числа лейкоци-

Таблица 21

Спонтанная хемилюминесценция лейкоцитов карпа  
в хроническом эксперименте (в имп./с/клетки)

Срок экспозиции	Контроль	Карбофос	Бактериальный антиген	Бактериальный антиген и карбофос
6 ч	–	6,4 ± 1,2	340,0 ± 150,6	219,3 ± 61,8
1 сут	14,6 ± 3,6	11,7 ± 2,3	310,2 ± 85,4	472,9 ± 135,8
4 сут	2,8 ± 0,4	5,7 ± 1,2	355,0 ± 274,5	542,9 ± 131,4
7 сут	5,8 ± 1,0	5,3 ± 0,4	36,2 ± 21,8	48,4 ± 21,9
30 сут	–	–	12,5 ± 5,2	–

Таблица 22

Спонтанная хемилюминесценция (относительная) лейкоцитов карпа  
в хроническом эксперименте (в имп./с/клетки)

Срок экспозиции	Контроль	Карбофос	Бактериальный антиген	Бактериальный антиген и карбофос
6 ч	–	0,5 ± 0,2	34,6 ± 18,2	16,5 ± 3,2
1 сут	1,1 ± 0,4	1,0 ± 0,1	22,9 ± 8,5	42,2 ± 12,7
4 сут	0,2 ± 0,02	0,3 ± 0,1	16,2 ± 10,6	68,3 ± 15,6
7 сут	–	–	0,8 ± 0,3	5,0 ± 2,0
30 сут	–	–	0,3 ± 0,1	–

тов, а отображали функциональные изменения, происходящие в исследуемых клетках. Для интегральной оценки СХЛ необходимо учитывать количество способных к ХЛ ответу клеток, поэтому нами был проведен пересчет уровня СХЛ ответа на число лейкоцитов (табл. 22).

Из таблицы следует, что у рыб, находившихся под воздействием токсиканта, уровень СХЛ был практически сопоставим с таковым контроля. У иммунизированных рыб кривая изменения значений СХЛ носила одновершинный характер с максимумом, приходящимся на первые 6 час опыта, в дальнейшем наблюдали возврат к исходному (контрольному) уровню. В то же время у иммунизированных рыб, находившихся в токсиканте, уровень СХЛ повышался с первых часов, достигал своего максимума на 4 сут и снижался к концу опыта. Необходимо отметить, что наибольшие значения уровня СХЛ у иммунизированных рыб, находившихся под воздействием карбофоса, в два раза превысили максимум у инъецированных бактериальным антигеном рыб, т.е. карбофос оказывал пролонгированное действие с двукратным усилением максимума СХЛ.

Еще одним показателем функционального состояния лейкоцитов рыб может быть время достижения максимальных значений СХЛ. Приведенные в табл. 23 данные свидетельствуют о неоднозначном воздействии различных нагрузок на клеточный фактор иммунитета рыб. Наибольшие сдвиги в достижении максимального СХЛ ответа наблюдали в первые 4 сут после начала опыта, в дальнейшем этот показатель снижался.

Таким образом, можно сказать, что карбофос оказывает стимулирующее воздействие на реакцию спонтанной хемилюминесценции, особенно ярко этот эффект проявляется в случае иммуногенной нагрузки на организм рыб, которая приводит к пролонгированному и усиленному ответу лейкоцитов на воздействие токсиканта.

Для изучения ответа лейкоцитов крови карпа, активизированных взвесью зимозановых частиц, исследовали такие функциональные ха-

Таблица 23

Время достижения максимальных значений спонтанной  
хемилюминесценции лейкоцитов карпа в хроническом эксперименте

Срок экспозиции	Контроль	Карбофос	Бактериаль- ный антиген	Бактериаль- ный антиген и карбофос
6 ч	—	60,0 ± 0,0	50,6 ± 2,5	50,6 ± 5,1
1 сут	55,8 ± 1,1	50,2 ± 2,4	52,2 ± 4,2	51,6 ± 4,6
4 сут	8,6 ± 1,4	11,0 ± 1,8	64,0 ± 8,5	62,0 ± 7,2
7 сут	43,0 ± 4,0	43,2 ± 2,3	25,0 ± 2,9	24,0 ± 1,8
30 сут	—	—	37,4 ± 4,1	—

характеристики иммуноцитов, как значения ЗХЛ, время максимального ответа, а также рассчитывали коэффициент стимуляции, который определяли как отношение максимумов ЗХЛ и СХЛ. Полученные результаты по интенсивности светового излучения фагоцитирующими клетками рыб в условиях эксперимента представлены в табл. 24.

Показано, что максимальный уровень ЗХЛ иммуноцитов рыб при хроническом сублетальном воздействии карбофоса превышал контроль в 2–3 раза. Наиболее интенсивное световое излучение лейкоцитов, которое в дальнейшем поддерживалось на относительно стабильном уровне, наблюдали у лейкоцитов рыб в первые сутки опыта.

У иммунизированных рыб максимальный пик светового излучения лейкоцитов наблюдали уже через 6 час, он превышал уровень контроля на 1–2 порядка, затем этот показатель несколько снижался, но удерживался на достаточно высоком уровне в течение всего эксперимента (до 30 сут).

Таблица 24

Стимулированная зимозаном хемилюминесценция лейкоцитов карпа  
в хроническом эксперименте (имп./с/клетки)

Срок экспозиции	Контроль	Карбофос	Бактериаль- ный антиген	Бактериаль- ный антиген и карбофос
6 ч	—	7,2 ± 1,1	574,9 ± 192,1	725,3 ± 111,6
1 сут	32,8 ± 10,0	54,2 ± 11,9	380,9 ± 91,2	644,6 ± 109,0
4 сут	4,7 ± 0,4	11,0 ± 2,6	390,0 ± 187,1	903,0 ± 282,2
7 сут	2,6 ± 1,0	11,8 ± 1,8	119,1 ± 38,6	157,0 ± 59,0
30 сут	—	—	68,6 ± 28,8	—

Лейкоциты иммунизированных рыб, находившихся в растворе токсиканта, реагировали несколько по-иному и в ответ на стимуляцию зимозаном давали более высокие значения ЗХЛ по сравнению с клетками иммунизированных рыб, содержащихся в чистой воде. Максимально высокий уровень светового излучения клетками наблюдали на 4 сут эксперимента, он превышал уровень лейкоцитов иммунизированных рыб почти в три раза и достигал величин 9029,6 ± 2821,5 имп/10 сек.

Показатели ЗХЛ в пересчете на 1 лейкоцит представлены в табл. 25, из которой следует, что наблюдаемые нами изменения в интенсивности светового излучения иммуноцитов с учетом их числа в кровяном русле справедливы и для случая СХЛ и ЗХЛ.

В табл. 26 представлены данные исследования продолжительности реакции стимулированной зимозаном ХЛ иммуноцитов, определяемой по времени пика спонтанной ХЛ. Показано, что время максимального ответа ЗХЛ лейкоцитов опытных рыб увеличивалось по сравнению с контролем, причем оно было связано с интенсивностью светового излучения. Так, если у рыб, находившихся в растворе карбофоса, максимальные значения ЗХЛ (абсолютные и относительные, табл. 24 и 25) приходились на 1 сут эксперимента, то и время наступления пика светового излучения (табл. 26) — наибольшее. То же относится и к иммунизированным рыбам.

Таким образом, карбофос, воздействуя на иммунную систему рыб, способствовал повышению пика светового излучения (эмиссии) иммуноцитов и увеличивал продолжительность реакции, причем, наибольшие изменения происходили в первые сутки экспозиции, в дальнейшем эти показатели стабилизировались. У иммунизированных рыб максимум эмиссии (абсолютные и относительные значения) регистрировали уже в первые часы наблюдений, в то время как у иммунизированных рыб, находившихся в растворе карбофоса, максимальный пик светового излучения отмечен лишь на 4 сут эксперимента. Эту тенденцию наблю-

Таблица 25

Стимулированная зимозаном хемилюминесценция (относительная)  
лейкоцитов карпа в хроническом эксперименте в имп./с/клетки

Срок экспозиции	Контроль	Карбофос	Бактериаль- ный антиген	Бактериаль- ный антиген и карбофос
6 ч	—	0,5 ± 0,1	57,1 ± 24,1	60,8 ± 11,7
1 сут	3,2 ± 1,6	4,1 ± 0,9	26,5 ± 5,9	55,5 ± 9,5
4 сут	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2	20,4 ± 6,7	111,6 ± 29,3
7 сут	—	—	3,1 ± 0,7	17,3 ± 5,7
30 сут	—	—	1,6 ± 0,5	—

Таблица 26

Время достижения максимальных значений стимулированной зимозаном хемилюминесценции лейкоцитов карпа в хроническом эксперименте

Срок экспозиции	Контроль	Карбофос	Бактериальный антиген	Бактериальный антиген и карбофос
6 ч	–	94,2 ± 6,7	120,0 ± 3,2	115,8 ± 7,8
1 сут	87,8 ± 6,0	136,0 ± 17,3	107,2 ± 11,7	117,8 ± 6,7
4 сут	57,8 ± 11,6	52,8 ± 13,0	120,6 ± 6,0	136,8 ± 12,8
7 сут	71,8 ± 0,8	71,8 ± 0,8	86,5 ± 1,4	60,0 ± 1,9
30 сут	–	–	125,0 ± 3,3	–

дали и по продолжительности реакции ЗХЛ. Необходимо отметить, что подобные закономерности, в частности, усиление реакции ХЛ наряду с увеличением ее продолжительности, наблюдали Скотт и Клезюс (Scott, Klesius, 1981) у фагоцитов канального сома, они же отмечали повышение уровня ХЛ фагоцитов из пронефроса морского окуня у иммунизированных рыб по сравнению с интактными и эффект повышения интенсивности ХЛ наряду с увеличением продолжительности времени реакции. Мы наблюдали аналогичный ответ, т.е. усиление эмиссии вместе с увеличением продолжительности реакции. Вместе с тем, совместное воздействие карбофоса и бактериального антигена оказывало более сильное воздействие по сравнению с влиянием только пестицида, что проявлялось как в усилении ЗХЛ ответа, так и в увеличении времени наступления пика эмиссии, т.е. в пролонгированном действии карбофоса.

В связи с этим, особый интерес представляет следующий используемый нами интегральный показатель – коэффициент стимуляции, отражающий отношение стимулированной зимозаном к спонтанной ХЛ (табл. 27). Из результатов исследования следует, что у контрольных рыб этот показатель находился в пределах 1,7–2,2, в то время как у рыб, находившихся в растворе токсиканта, в первые часы опыта коэффициент был ниже 2, к первым суткам он превышал контрольное значение более чем в два раза и возвращался к контролю на 4–7 сутки эксперимента. Это свидетельствует о том, что в первые часы экспозиции спонтанная реакция преобладала над стимулированной, т.е. адгезия иммуноцитов была повышена, а их фагоцитарная способность снижена. К первым суткам опыта отмечалось резкое повышение этого показателя за счет увеличения ЗХЛ, в дальнейшем система стабилизировалась. Таким образом, карбофос в первые часы оказывает иммуносупрессивное, а уже через сутки – иммуностимулирующее действие.

У иммунизированных рыб в первые 6 ч опыта коэффициент стимуляции находился на уровне контроля, несмотря на то, что показатель

Таблица 27

Коэффициент стимуляции зимозаном ХЛ-реакция лейкоцитов карпа в хроническом эксперименте

Срок экспозиции	Контроль	Карбофос	Бактериальный антиген	Бактериальный антиген и карбофос
6 ч	–	1,3 ± 0,3	2,0 ± 0,2	4,3 ± 0,9
1 сут	2,2 ± 0,5	5,1 ± 1,2	1,4 ± 0,4	1,8 ± 0,6
4 сут	1,7 ± 0,1	2,0 ± 0,3	3,0 ± 1,5	1,8 ± 0,3
7 сут	2,1 ± 0,4	2,2 ± 0,2	5,1 ± 1,6	3,9 ± 1,0
30 сут	–	–	6,2 ± 1,6	–

эмиссии ЗХЛ имел максимальное значение. В первые сутки опыта коэффициент несколько уменьшился за счет снижения ЗХЛ, однако затем, несмотря на дальнейший спад эмиссии иммуноцитов опытных рыб, он продолжал расти до самого конца наблюдений. В то же время у иммунизированных рыб, находившихся в растворе карбофоса, уже в первые часы наблюдений значение данного коэффициента в два раза превысило контроль, и к 4 сут наблюдений, когда уровень светоиспускания лейкоцитов достиг своего пика, коэффициент составлял 1,8. Таким образом, карбофос на фоне роста световой эмиссии иммуноцитов снижает коэффициент стимуляции иммунизированных рыб.

Обобщая вышеизложенное, можно сказать, что карбофос, воздействуя на механизм клеточного иммунитета, оказывает иммуностимулирующее влияние, что проявляется в усилении ХЛ ответа иммуноцитами и его продолжительности, способствует пролонгированному ответу у иммунизированных рыб. Вместе с тем по данным исследования коэффициента стимуляции, можно сделать вывод об относительно быстрой стабилизации процесса в условиях, когда рыбы находились в токсиканте, но у иммунизированных рыб пестицид внес значительные сдвиги в функционирование клеточного звена иммунитета, которые сохранялись в течение 1 мес.

Анализ материалов исследований реакции клеточных механизмов иммунитета свидетельствует, что карбофос вызывает изменение содержания отдельных форм иммуноцитов и их функциональной активности. Однако эффект воздействия пестицида зависит от условий опыта и исходного состояния организма. У иммунизированных бактериальным антигеном рыб эти изменения носят более выраженный характер. Наиболее значительные изменения выявлены при исследовании СХЛ и ЗХЛ. Бактериальный антиген совместно с карбофосом оказывает более сильное иммуностимулирующее действие на фагоцитарную активность лейкоцитов, чем только пестицид. Обнаруженный факт усиления стимулирующего действия токсиканта на фагоцитарную активность лей-



Таблица 28

## Индексы печени карпа в хроническом эксперименте

Срок экспозиции	Контроль	Карбофос	Бактериальный антиген	Бактериальный антиген и карбофос
6 ч	—	2,29 ± 0,21	2,97 ± 0,28	3,06 ± 0,46
1 сут	2,31 ± 0,61	2,13 ± 0,40	2,15 ± 0,18	2,26 ± 0,11
4 сут	3,03 ± 0,49	2,72 ± 0,48	2,18 ± 0,16	2,43 ± 0,36
7 сут	3,05 ± 0,30	2,45 ± 0,25	2,19 ± 0,29	2,33 ± 0,14
30 сут	—	1,73 ± 0,09	1,81 ± 0,13	1,71 ± 0,13
90 сут	—	1,30 ± 0,11	1,69 ± 0,11	1,82 ± 0,13

коцитов у иммунизированных рыб свидетельствует, что она обладает иммуномодулирующими свойствами.

Карбофос в низких концентрациях оказывает иммуностимулирующее воздействие на иммунитет, что проявляется в усилении ХЛ ответа иммуноцитов и его продолжительности и способствует пролонгированному ответу у иммунизированных рыб. Вместе с тем, анализ коэффициента стимуляции может свидетельствовать об относительно быстрой стабилизации процесса при экспозиции рыб в токсиканте, тогда как у иммунизированных рыб ее не наблюдали. В то же время на гуморальном уровне действие карбофоса наиболее заметно проявляется через месяц.

Реакцию ретикуло-лимфоидной ткани (РЛТ) на воздействие карбофоса изучали по данным анализа индексов печени, почек, селезенки и изучения ультраструктуры иммуноцитов.

Индексы иммунокомпетентных органов, отражающие емкость и потенциальные возможности иммунной системы в нейтрализации и метаболизме ксенобиотиков, синтезе специфических антител, под воздействием КБФ претерпевали существенные изменения (табл. 28, 29, 30).

Направление этих изменений свидетельствует об инволюции РЛТ иммунокомпетентных органов. Интенсивность инволюционных процессов зависит от органа и условий опыта. Индекс селезенки в течение эксперимента существенных изменений не претерпевал, тогда как печени и почек уменьшался. Инволюционные процессы в почках под влиянием карбофоса происходили более интенсивно, чем при других видах воздействий.

Анализ ультратонких срезов показал, что все рассматриваемые группы рыб отличались характером реакций и динамикой происходящих изменений.

Тонкая структура клеток ретикуло-лимфоидной ткани почек, селезенки и печени контрольных рыб практически не изменялась во все исследуемые сроки. Следует отметить лишь незначительное уменьшение количества гликогена в гепатоцитах печени в более поздние сроки наблюдений (1 мес).

Таблица 29

## Индексы селезенки карпа в хроническом эксперименте

Срок экспозиции	Контроль	Карбофос	Бактериальный антиген	Бактериальный антиген и карбофос
6 ч	—	0,25 ± 0,01	0,34 ± 0,04	0,28 ± 0,03
1 сут	0,33 ± 0,04	0,23 ± 0,02	0,31 ± 0,06	0,30 ± 0,03
4 сут	0,26 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,33 ± 0,02	0,16 ± 0,01
7 сут	0,31 ± 0,03	0,28 ± 0,04	0,30 ± 0,05	0,16 ± 0,04
30 сут	—	0,25 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,23 ± 0,03
90 сут	—	0,24 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,26 ± 0,04

У иммунизированных рыб изменения структуры исследуемых клеток были отмечены с самого первого срока (6 ч) — появление отдельных фагосом в нейтрофилах почек. Через сутки после начала эксперимента наблюдали появление лимфоцитов с расширенным ободком цитоплазмы и профилями шероховатого эндоплазматического ретикула (ШЭР) в почках и селезенке. Через 4 сут отмечен активный фагоцитоз нейтрофилами, а также базо- и эозинофилами. В последних также наблюдали дегрануляцию специфичных гранул. В нейтрофилах иногда обнаруживали неразрушенные фагоцитированные бактерии. Через 7 сут отмечалось увеличение числа плазматических клеток в почках и появление их в селезенке. В печени происходил фагоцитоз бактерий гранулоцитами всех типов, дегрануляция специфичных гранул в базо- и эозинофилах, а также активизация деятельности макрофагов и наличие в них большого количества фагосом с гомогенным содержимым. Через 1 мес структура исследованных тканей была сходна с таковой контрольных рыб (рис. 7 а-г).

Под воздействием карбофоса наиболее явные изменения структуры тканей были отмечены в почках и селезенке рыб через 1 сут после

Таблица 30

## Индексы почек карпа в хроническом эксперименте

Срок экспозиции	Контроль	Карбофос	Бактериальный антиген	Бактериальный антиген и карбофос
6 ч	—	1,04 ± 0,10	0,81 ± 0,06	0,72 ± 0,11
1 сут	1,01 ± 0,08	0,70 ± 0,04	0,89 ± 0,06	0,94 ± 0,06
4 сут	0,88 ± 0,14	0,94 ± 0,04	0,81 ± 0,07	0,58 ± 0,09
7 сут	0,78 ± 0,11	0,62 ± 0,06	0,91 ± 0,08	0,74 ± 0,08
30 сут	—	0,66 ± 0,07	0,89 ± 0,14	0,63 ± 0,08
90 сут	—	0,65 ± 0,03	0,74 ± 0,05	0,55 ± 0,15



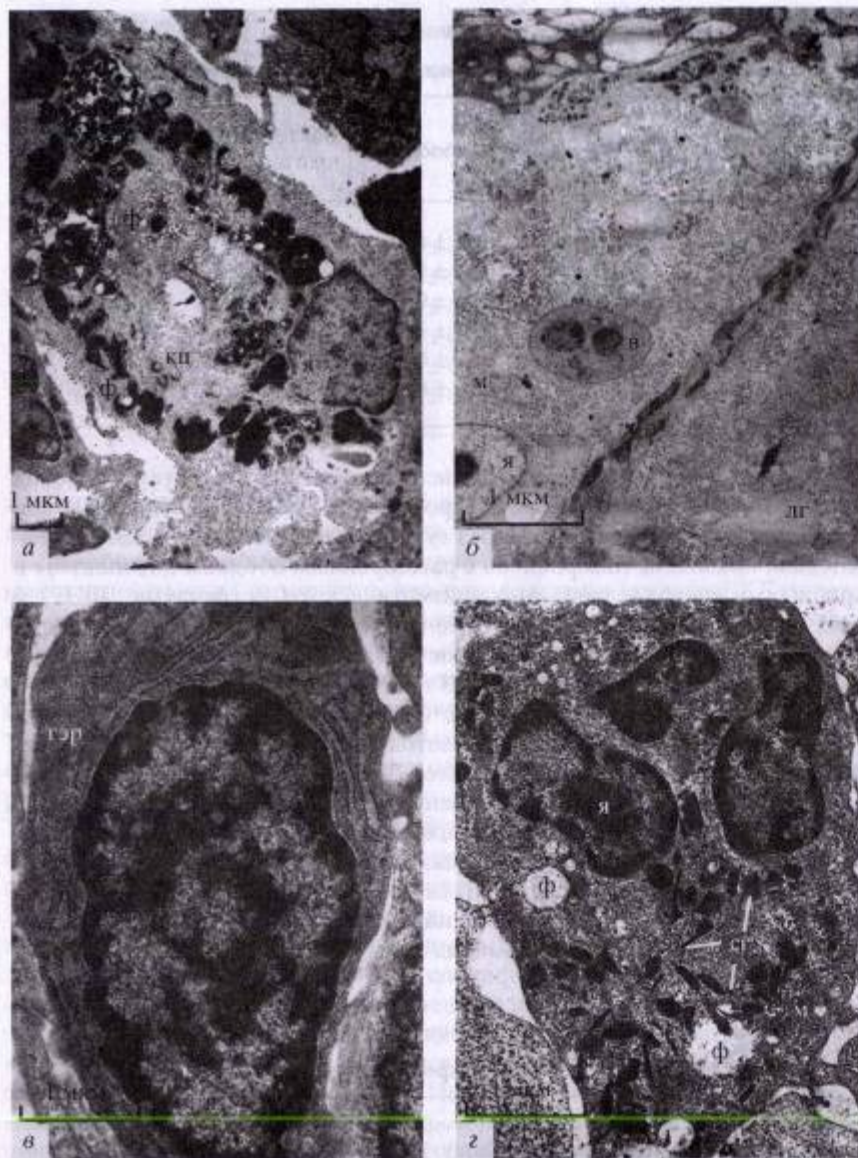


Рис. 7. Изменение структуры клеток иммунокомпетентных органов после инъекции бактериального антигена.

а – макрофаг селезенки, 1 сут после инъекции. кц – клеточный центр. б – участок цитоплазмы гепатоцита, 1 сут после инъекции, лг – липосомы. в – плазматическая клетка, туловищная почка, 1 сут после инъекции. г – фагоцитирующий нейтрофил, головная почка, 1 сут после инъекции. ф – фагосома. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2–6.

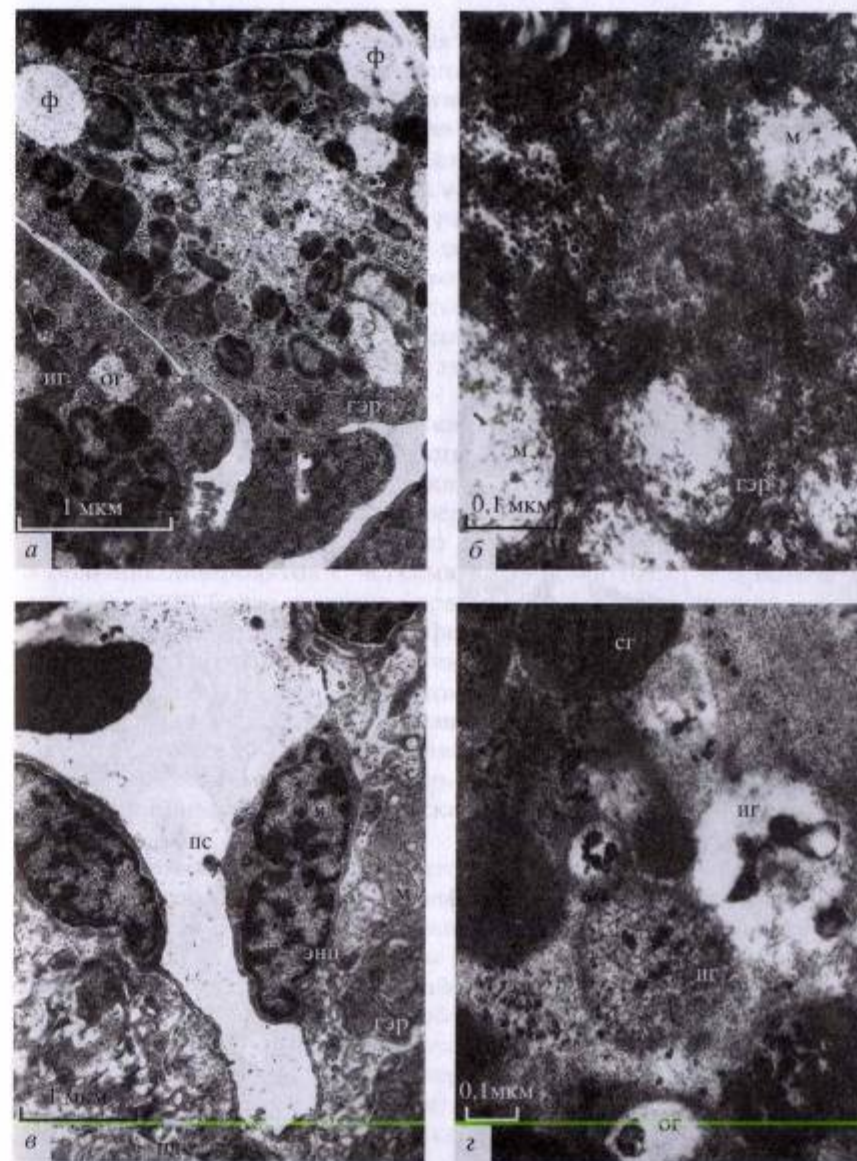


Рис. 8. Изменение структуры клеток иммунокомпетентных органов после длительного воздействия карбофоса.

а – участок цитоплазмы гранулоцита II типа, туловищная почка, карбофос, 4 сут.; б – участок цитоплазмы гепатоцита с разрушенными митохондриями, карбофос, 7 сут.; в – кровеносный синус печени, карбофос, 4 сут.; г – участок цитоплазмы эозинофила с измененными специфичными гранулами, печень, карбофос, 4 сут. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2–7.



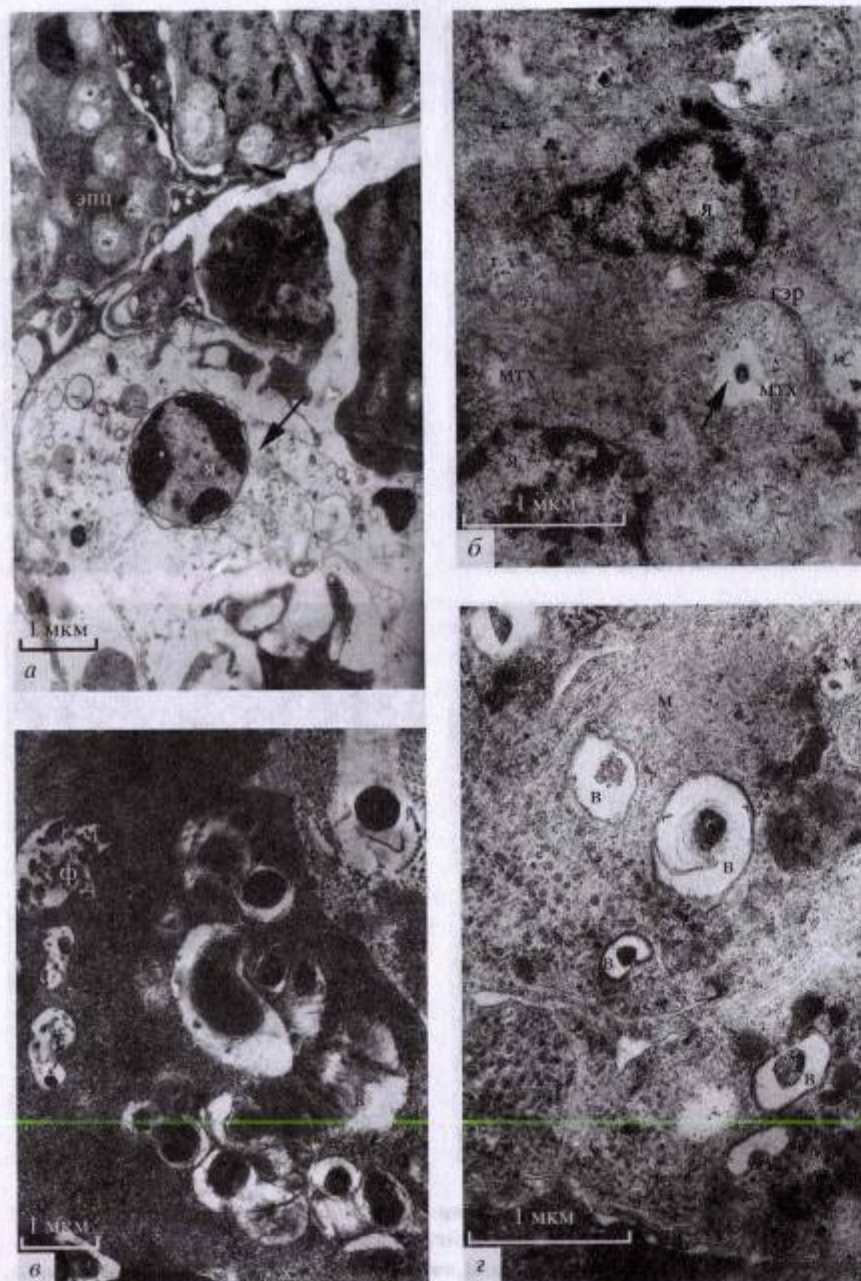


Рис. 9. Изменение структуры клеток иммунокомпетентных органов после совместного действия карбофоса и бактериального антигена.

начала эксперимента. Они проявлялись в появлении периваскулярных отеков, гипертрофии эндотелиоцитов и нарушении структуры митохондрий (МТХ). В печени наблюдали увеличение пространств Дисса вокруг печеночных синусоидов, нарушение структуры МТХ. На 4 и 7 сут отмечено появление базо- и эозинофилов с опустошенными гранулами и уменьшение количества гликогена в нейтрофилах и в гепатоцитах печени. На 7 сут наблюдали также миграцию гранулоцитов и макрофагов в мелано-макрофагальные центры селезенки и печени и образование гранулярной манжеты вокруг кровеносных сосудов в почках и селезенке, а также вокруг желчных протоков в печени. В тканях этих органов наблюдали очаги некроза. Через 1 мес структура клеток возвращалась к норме, а очаги некроза замещались соединительной тканью (рис. 8 а-г).

При совместном воздействии карбофоса и бактерий было обнаружено стимулирующее влияние пестицида на скорость развития иммунного ответа, поэтому наряду с такими характерными для токсического поражения изменениями, как периваскулярный отек и автолиз митохондрий, также было отмечено резкое увеличение числа средних и больших лимфоцитов с четкими профилями ШЕР, что позволяет предположить более активную трансформацию этих клеток. Активная дегрануляция базо- и эозинофилов отмечалась уже с 4 сут, а через 7 сут наблюдали увеличение числа меланиновых гранул в макрофагах селезенки и печени. Фагосомы с бактериальным содержимым обнаруживали в макрофагах и гранулоцитах (рис. 9 а-г). Через месяц фагоцитоз можно было считать завершенным во всех органах, а в почках и селезенке можно было по-прежнему наблюдать достаточно большое количество плазматических клеток с расширенными каналами ШЭР.

Таким образом, анализ вышеизложенных данных позволяет сделать вывод, что парентеральное введение бактерий вызывает первичный иммунный ответ с характерными для него фагоцитозом антигена на первом этапе и следующим за ним антителогенезом (Микряков, Балабанова, 1970; Балабанова, Заботкина, 1988), а пребывание рыб в растворе токсиканта влечет за собой острую неспецифическую реакцию и некоторую алергизацию организма токсикантом. Одновременное воздействие токсиканта и бактериального антигена вызывает ускорение первичного иммунного ответа и более яркое его проявление на фоне признаков токсического отравления.

←  
а – участок ткани туловищной почки с разрушенной клеткой, 4 сут. Стрелкой (→) обозначена разрушенная клетка; б – участок цитоплазмы гепатоцита, 1 сут. Стрелкой (→) обозначены поврежденные митохондрии. в – макрофагоподобная клетка (?), печень, 4 сут. г – включения в макрофагах селезенки, 1 сут. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2-7.



# **ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА КЛЕТОЧНЫЕ И ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА**

Соли тяжелых металлов относятся к группе наиболее опасных и широко распространенных загрязняющих веществ, поступающих в водосмы, и являются токсичными для рыб (Латышова, Перевозников, 1990; Лебедева, 1991; Кашулин и др., 1999 и др.). Поступая в водосм, они включаются в круговорот веществ и подвергаются различным превращениям (метилированию, преобразованию в металлоорганические комплексы) или переходят в слаборастворимые гидроокиси и т.д. Они адсорбируются донными осадками, вступают в метаболические отношения с живыми организмами или аккумулируются в тканях и органах водных животных, в том числе и рыб, оказывая токсическое влияние на живые организмы. Наибольшую опасность для водных животных и человека согласно решению стран Европейского сообщества представляют кадмий, ртуть, мышьяк и их соединения ("Зеленая ветвь" и "Лакокраска", Проект "Волга" в Ярославле, Н.Новгороде, 1996). Содержание их в воде приводит к серьезным нарушениям функционирования всех систем организма, в том числе и иммунной (O'Neill, 1981; Ewing et al., 1982; Viale, Calamari, 1984; Robohm, 1986; Khangarot et al., 1988; Thuvander, 1989; Saxena et al., 1992; Микряков и др., 1992; Pulsford et al., 1994; Микряков, Лапирова, 1997; Witeska, 1998; Заботкина, Комов, 1999; Микряков, Силкина, 1999; Попов, Микряков, 1999; Лапирова и др., 2000 и др.).

В целях оценки характера реагирования иммунной системы рыб на содержание солей тяжелых металлов нами проведено исследование влияния ионов кадмия, ртути и меди на иммунологические механизмы гомеостаза сибирского осетра в условиях хронического эксперимента. Реакцию иммунной системы рыб оценивали по состоянию гуморальных и клеточных факторов естественного иммунитета. Гуморальные факторы иммунитета тестировали по БАСК и содержанию тканевого лизоцима, а клеточные – по составу, состоянию ультратонкой структуры лейкоцитов, интенсивности лейкопоза.

Исследование защитных свойств гуморальных факторов иммунитета по данным анализа бактериостатических свойств сыворотки крови и содержания тканевого лизоцима в иммунокомпетентных органах и сердце показало, что рыбы на присутствие солей тяжелых металлов реагировали изменением функциональных характеристик изучаемых факторов (табл. 31 и 32). Направленность исследуемых признаков зависела от времени пребывания рыб в растворе токсиканта и степени его токсичности.

Из представленных в таблице 31 данных видно, что изменения уровня БАСК носили фазовый характер. В первые трое суток экспозиции этот показатель повышался. На втором этапе (около 2 недель с начала эксперимента) у всех исследуемых рыб уровень БАСК снижался до 8% против 50–62%, установленных через 1–3 суток от начала опыта. На третьем этапе (через 1 мес), БАСК нарастала до контрольного уровня, через 2 месяца этот показатель вновь снижался, и эти изменения, видимо, приобретали необратимый характер.

Таблица 31

**Активность антимикробных свойств сыворотки крови  
сибирского осетра в острых и хронических опытах, %**

Срок отбора проб, сут	Концентрация Cd, мг/л		Контроль
	0,3	0,03	
1	62	62	22
3*	36	50	31
14	–	8	17
28	–	30	27
60	–	12	26

Примечания: \* – по истечении 3-х сут все рыбы при концентрации 0,3 мг/л погибли; число рыб во всех вариантах опытов равнялось 5 экз.

Анализ динамики изменений БАСК показал соответствие реакции ответу гуморальных факторов иммунитета на воздействие кадмия на стресс по Г. Селье. Данный тип реагирования БАСК рыб на кадмий, носящий фазовый характер, следует считать неспецифическим и в своей основе отражающим глубинные процессы адаптации рыб к раздражителю.

Содержание тканевого лизоцима, биологическая и иммунологическая роль которого в организме многоклеточных (в том числе рыб) чрезвычайно важна, так же, как и БАСК, у исследуемых рыб колебалась весьма широко (табл. 32). Однако степень изменчивости данного иммунологического показателя отличалась от таковой БАСК и зависела от насыщенности тканей органа иммунными (Zapata, 1983).

Исследованиями выяснено, что содержание лизоцима в тканях молоди осетра в целом выше, чем у взрослых особей (Субботкина, 1990). Вместе с тем, исследуемые органы у взрослых особей в зависимости от особенностей их структурно-функционального состояния и характера участия их в реализации иммунологических функций, отличались уровнем содержания лизоцима. В гомогенатах селезенки, ткани которой, в отличие от других органов, в основном представлены клетками лимфоидно-макрофагальной системы и эритропоза уровень лизоцима был выше, чем в таковых печени и сердечной мышцы. Несмотря на установленное нами количественное различие присутствия данного фактора естественного иммунитета в разных органах, величины исследуемого признака контрольных особей в течение всего срока наблюдений существенных изменений не претерпевают. И, наоборот, под влиянием солей тяжелых металлов показатели лизоцима колеблются (табл. 32). В присутствии используемых в опытах ионов тяжелых металлов содержание лизоцима в тканях рыб в большинстве случаев повышается. Максимальные величины мурамидазы у опытных рыб по сравнению с таковыми у контрольных выявлены через 7 сут с момента начала экспе-



Таблица 32

Содержание лизоцима в тканях внутренних органов  
(в мкг/мг ткани ( $M \pm m$ ))

Токсикант	Hg	Cd	Cu	Контроль
Селезенка				
Срок отбора, сут				
7	28,4 $\pm$ 1,4*	50,2 $\pm$ 1,0*	48,4 $\pm$ 1,5	4,8 $\pm$ 0,8
14	5,8 $\pm$ 0,7	6,6 $\pm$ 0,7	8,0 $\pm$ 0,5 <sup>1</sup>	8,8 $\pm$ 0,5
30	15,0 $\pm$ 1,2*	9,4 $\pm$ 0,7	18,0 $\pm$ 1,1*	8,0 $\pm$ 0,6
Печень				
7	5,2 $\pm$ 0,5*	3,0 $\pm$ 0,5	4,4 $\pm$ 0,9	1,8 $\pm$ 0,5
14	5,0 $\pm$ 0,5*	2,2 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 0,4
30	1,2 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,3
60	2,2 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,3
Сердце				
7	2,0 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 0,4*	1,0 $\pm$ 0,3
14	4,2 $\pm$ 0,6*	4,0 $\pm$ 0,5*	4,3 $\pm$ 0,4*	2,0 $\pm$ 0,3
30	2,2 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,2
60	3,2 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,4

Примечание: \* помечены значения, достоверно отличающиеся от контрольных.

римента. Наиболее яркая реакция в показателях лизоцима на присутствие в воде ионов тяжелых металлов выявлена в селезенке. По истечении 14 сут величины лизоцима в тканях селезенки опытных рыб снижаются до уровня ниже чем у контрольных особей. К концу периода наблюдения содержание мурамидазы в тканях восстанавливается, а в присутствии солей ртути и меди данный показатель достоверно повышается.

В печени также наблюдалось повышение уровня лизоцима через 7 и 14 дней, но достоверным оно было лишь в присутствии ионов ртути.

Аналогичная реакция наблюдалась и в тканях сердца, но проявилась она несколько позже. Достоверные отличия в уровне содержания лизоцима во всех вариантах опытов отмечены лишь через 14 дней с начала воздействия на рыб солями тяжелых металлов, а в первую неделю – лишь в присутствии ионов меди. В тканях и печени, и сердца данный показатель через 30 дней возвращается к исходным величинам. Из материалов исследований следует, что обнаруженные количественные изменения, видимо, носят фазовый характер и отражают закономерности проявления общего адаптационного синдрома по Селье при стрессе. Об этом, в частности, свидетельствуют данные измерений концентрации

лизоцима в тканях селезенки. Выявленное различие в уровне содержания лизоцима и характера его на разных этапах эксперимента в тканях селезенки по сравнению в таковых печени и сердечной мышцы, видимо, обусловлены не только различием структурно-функциональной организации, но и характером участия составляющих основу данного органа клеток в процессе детоксикации и нейтрализации последствий токсического эффекта загрязняющих веществ на организм рыб.

Общеизвестно, что селезенка у рыб является органом гемопоэза, она содержит значительные скопления лимфоидной ткани (Weeks B.A., Anderson D.P. et al., 1989). В этой ткани в больших количествах содержатся нейтрофилы и макрофаги, в лизосомах которых локализован лизоцим. Последнее, как это имеет место у млекопитающих, при разрушении лизосом, обусловленных воздействием на рыб стресс-факторов поступает в кровь или межклеточное пространство ткани. Известно, что у млекопитающих при стрессе усиливается лизосомальный экзоцитоз, регулируемый действием на макрофаги и нейтрофилы гормонов стресса, в частности, кортизола (Mock and Peters, 1990).

Полученные нами результаты позволяют предположить, что аналогичное явление – выброс лизоцима, регулируемый кортизолом при токсическом стрессе, из клеток указанных типов – может иметь место и в органах, богатых клетками лимфоидно-макрофагальной системы. В таком случае столь сильно выраженная реакция тканей селезенки на поступление в воду токсикантов вполне закономерна.

Как известно, печень у рыб, как и у высших кроме пищеварительной и метаболической, выполняет разнообразные иммунологические функции, связанные детоксикацией и нейтрализацией ксенобиотиков, экзо- и эндотоксикантов возбудителей инфекционных и инвазионных болезней и т.д. Данному органу менее присуща функция антителообразования, чем в селезенке. Кроме того, в печени меньше содержится лизосомсодержащих клеток по сравнению с селезенкой. Наиболее токсичными оказались для этого органа ионы ртути, обусловившие сдвиг уровня лизоцима в течение достаточно длительного времени – более 2-х недель. Остальные ионы также вызвали увеличение концентрации фермента в эти сроки, но оно не было статистически достоверно.

У костно-хрящевых рыб, к которым относятся осетровые, в околосердечной сумке имеется лимфомиелоидная ткань, описаны различные стадии дифференцировки клеток лимфоидной ткани, локализованной около предсердия и желудочка. Узелковые лимфоидные образования в перикардии содержат ретикулярные клетки, гранулоциты, малые и большие лимфоциты, макрофаги, т.е. клетки, способные обеспечить иммунный отклик и в том числе выработку протективных лизосомальных ферментов (Галактионов, 1995). Действительно, лизоцим в тканях сердца обнаружен, хоть и в невысоких концентрациях. Реакция на токсиканты была достаточно выраженной, хоть и несколько замедленной по сравнению с селезенкой для большинства токсикантов.

Установленную нами динамику изменения концентрации лизоцима в тканях молоди осетра, отражающую характер реагирования данного естественного фактора иммунитета на токсиканты следует считать не-

специфической, поскольку аналогичный фазовый характер динамики лизоцима в тканях почки, селезенки, печени и сыворотки крови рыб установлен В.И. Лукьяненко и А.И. Хорошко (Лукьяненко, 1987) на стерляди после парентеральной инъекции инактивированных бактерий *Aeromonas punctata*. Подобные результаты – подъем концентрации лизоцима на 7–14 сутки были также получены на карпах и камбале в сыворотке крови после экспериментального заражения рыб вирулентными бактериями *Pseudomonas alcaligenes* и *Aeromonas punctata* (Siwicki A., Studnicka M., 1987).

Таким образом, проведенные исследования показали, что молодь осетра на воздействие сублетальных концентраций меди, ртути и кадмия реагирует интенсивностью образования лизоцима, выполняющим важную функцию в поддержании биологического постоянства внутренней среды и обеспечении естественной резистентности организма рыб к повреждающим факторам среды.

Исследования позволили выявить, что на разных этапах токсического процесса интенсивность образования лизоцима колеблется и зависит от времени взятия пробы и структурно-функциональной организации тканей и органов. На первых этапах эксперимента концентрация лизоцима в тканях опытных рыб нарастает, затем снижается, а в конце опытов возвращается к исходному контрольному уровню, а в ряде случаев повышается. В органах, богатых клетками лимфоидно-макрофагальной системы было обнаружено больше мурамидазы, чем в не имеющих выраженных скоплений лимфоидной ткани.

Обнаруженный нами фазовый характер динамики содержания исследуемого фермента в тканях отражает реакцию рыб на стресс, что, вероятно, обусловлено интенсивностью проявления механизмов общего адаптационного синдрома. Выявленные нами изменения в содержании тканевого лизоцима в иммунокомпетентных органах свидетельствуют о глубоких нарушениях, происходящих на уровне клеток, ответственных за синтез лизоцима. Косвенно это подтверждается исследованиями влияния солей тяжелых металлов (кадмия, ртути и меди) на состав и структуру лейкоцитов сибирского осетра.

Установлено, что молодь сибирского осетра на присутствие солей тяжелых металлов реагирует изменением соотношения между отдельными формами клеток и интенсивностью лейкопоза (табл. 33–36). Характер и интенсивность выявленных изменений определяется временем пребывания рыб в опыте и природой токсического препарата. Согласно данным В.З. Латыповой и М.А. Перевозникова (1990), в ряду тяжелых металлов первое место по растворимости соединений в воде и токсичности для гидробионтов занимает ртуть. Максимальная токсичность ртути проявляется в природных водах, т.к. при дальнейшей миграции и трансформации она накапливается в виде высокотоксических соединений в тканях рыб в концентрациях, в тысячи раз превышающих содержание ее в воде. Под воздействием ртути в организме рыб подавляются обменные процессы, ослабевают защитные функции крови, снижается плодотворность и выживаемость рыб. Высокая устойчивость соединений ртути и отсутствие эффективных механизмов их выведения из организма при-

Таблица 33

Динамика изменения содержания лейкоцитов (в %) молоди сибирского осетра под влиянием ионов ртути

Срок отбора проб, сут	Тип клеток			
	Лимфоциты	Нейтрофилы палочкообразные	Нейтрофилы сегментоядерные	Эозинофилы
7	67,0 ± 1,9*	3,4 ± 1,2	8,4 ± 1,6*	20,2 ± 4,1
	85,0 ± 2,6	1,5 ± 0,5	3,3 ± 0,5	9,5 ± 1,9
14	87,3 ± 1,8	2,7 ± 0	3,3 ± 2,9	6,7 ± 2,1
	90,2 ± 1,6	3,2 ± 0,5	3,6 ± 1,9	3,0 ± 0,9
30	70,0 ± 4,7	9,6 ± 1,7	14,0 ± 2,8*	6,0 ± 2,1
	76,8 ± 1,9	6,6 ± 1,5	5,4 ± 1,2	10,2 ± 1,8
60	81,0 ± 1,3	4,5 ± 2,6	1,0 ± 0,6	12,5 ± 3,9*
	81,8 ± 3,4	13,3 ± 3,4	3,3 ± 1,9	1,8 ± 0,3

Примечание: верхняя строка – показатели опытных рыб, нижняя – контрольных. Знаком \* помечены данные, достоверно отличающиеся от контроля.

водят к тому, что даже незначительное содержание этих ионов в воде создает угрозу ртутной интоксикации рыб за счет кумулятивного эффекта (Латыпова, Перевозников, 1990). Есть работы по изучению влияния ионов ртути в концентрациях 0,005, 0,01 и 0,1 мг/л на картину крови и функциональное состояние клеточных и гуморальных факторов иммунитета в хроническом опыте на различных видах рыб (осетр, вобла, бычок-кругляк и молодь кеты) (Шлейфер, Дохолян, 1979). В результате исследования было установлено, что после воздействия токсиканта снижается содержание гемоглобина и лейкоцитов в первые трое суток. По истечении 12 суток у осетров содержание лейкоцитов постепенно восстанавливается. У осетров и бычков, находившихся под влиянием ионов ртути обнаружены лимфоциты, не содержащие РНК. Кроме того, у всех видов рыб подавляются показатели клеточного и гуморального иммунитета: фагоцитарная активность лейкоцитов, бактерицидная активность сыворотки крови и интенсивность антителообразования.

Сравнение результатов работ наших исследований с таковыми, полученными в опытах по влиянию ртути Г.С. Шлейфер и В.К. Дохолян (1979) на осетрах из Каспийского моря позволило выявить сходные изменения в содержании лимфоцитов. У молоди сибирского осетра, как это видно из представленных данных (табл. 33) в начале опытов содержание лимфоцитов достоверно снижается.

По истечении двух недель доля лимфоцитов достигает близких к контрольному уровню значений. Через 30 и 60 сут содержание этих кле-



ток у опытных рыб по сравнению с контрольными существенных изменений не претерпевает, за исключением отмеченной тенденции снижения числа лимфоцитов рыб из обеих групп через 30 сут. В то же время нами выявлены ранее не установленные для осетра изменения в составе гранулоцитов, осуществляющих разнообразные эффекторные иммунологические функции, связанные с фагоцитозом, очищением организма от чужеродных тел, алергизацией и аутоиммунизацией организма (Механизмы иммунопатологии, 1983; Маянский, Галиуллин, 1984; Лебедев, Понякина и др., 1990). Почти во все сроки наблюдения у опытных рыб по сравнению с контрольными отмечено увеличение содержания нейтрофилов и эозинофилов. Наиболее сильные колебания в уровне содержания гранулоцитов под воздействием ионов ртути претерпевают сегментоядерные нейтрофилы и эозинофилы. Подобные сдвиги в составе гранулоцитов осетров из Каспийского моря в опытах Г.С. Шлейфер не выявлены.

Обнаруженное в наших опытах нарушение соотношения между отдельными типами лейкоцитов свидетельствует о том, что ионы ртути в организме молоди осетра, видимо, инициируют иммунопатологические процессы, стимулирующие алергизацию организма, образование аутоиммунных комплексов, соответственно приводящих к увеличению доли нейтрофилов и эозинофилов. Содержание сегментоядерных нейтрофилов, как это следует из опыта, по сравнению с контрольными увеличивается в 1–1,5 раза, тогда как эозинофилов – в 1–6 раз. Максимальное различие между эозинофилами контрольных и опытных рыб установлено через 60 дней со времени начала эксперимента.

В другой серии опытов по влиянию ионов кадмия нами выявлены сходные по характеру и направленности клеточные перестройки (табл. 34), с той лишь разницей, что интенсивность отклонения палочко- и сегментоядерных клеток опытных рыб от контрольных были менее выраженными. В первый срок отбора проб данной серии опытов нами отмечена более выраженная эозинофилия, чем в других вариантах опытов.

Аналогичный характер изменения на воздействие ионов кадмия в составе лимфоцитов и нейтрофилов отмечено ранее Рупареллиа с соавторами (Ruparellia et al., 1990) на мозамбикских тилапиях. Вместе с тем, сравнение реакции лейкоцитов на воздействие сублетальных концентраций ионов кадмия с таковой, полученной на радужной форели (Thuvander, 1989), свидетельствует, что клетки радужной форели и молоди сибирского осетра на присутствие в воде ионов кадмия реагируют по-разному. В опытах на форелях каких-либо изменений в составе лейкоцитов не выявлено. Установленное различие в реакции лейкоцитов молоди сибирского осетра и радужной форели на ионы кадмия трудно объяснить. Оно, видимо, обусловлено различной чувствительностью гемопоэтической ткани рыб к кадмию. Не исключено, что это связано с различным составом и концентрациями солей кадмия, используемых в опытах. Тувандер в экспериментах использовал хлористый кадмий ( $CdCl_2$ ), в концентрации 3,6 мкг/л, тогда как в наших опытах в качестве источника ионов кадмия применяли азотнокислый кадмий

Таблица 34

Динамика изменения содержания лейкоцитов (%) молоди сибирского осетра под влиянием ионов кадмия

Срок отбора проб, сут	Тип клеток			
	Лимфоциты	Нейтрофилы палочкоядные	Нейтрофилы сегментоядные	Эозинофилы
7	57,8 ± 3,9*	2,6 ± 1,4	4,8 ± 0,8	34,4 ± 3,6*
	5,0 ± 2,6	1,5 ± 0,5	3,3 ± 0,5	9,5 ± 1,9
14	86,2 ± 2,4	1,4 ± 0,9	2,0 ± 1,3	10,4 ± 1,5
	90,2 ± 1,6	3,2 ± 0,5	3,6 ± 1,9	3,0 ± 0,9
30	78,6 ± 1,2	5,8 ± 0,9	7,0 ± 1,9	8,6 ± 0,6
	76,8 ± 1,9	6,6 ± 1,5	5,4 ± 1,2	10,2 ± 1,8
60	80,0 ± 6,0	11,0 ± 1,0	0	9,0 ± 5,0
	81,8 ± 3,4	13,3 ± 3,4	3,3 ± 1,9	1,8 ± 0,3

Примечание: верхняя строка – показатели опытных рыб, нижняя – контрольных. Знаком \* помечены данные, достоверно отличающиеся от контроля.

$Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  и в концентрации 0,03 мг/л. Вполне возможно, ионы хлора, входящие в состав соли, блокируют токсический эффект кадмия, и, наоборот, нитрат-ионы усиливают. Нельзя исключить и того факта, что молодь сибирского осетра содержалась при более высоких концентрациях ионов кадмия, чем радужная форель.

Ионы меди, также, как и ртути и кадмия, являются одним из существенных экотоксикантов, оказывающих токсическое действие на водных животных, в том числе рыб ("Болезни рыб" Справочник, 1989). На присутствие в воде ионов меди рыбы реагируют снижением общей резистентности к возбудителям инфекционных болезней и функций клеточного и гуморального иммунитета (Anderson et al., 1990; Dunier, 1991). Из результатов гематологических исследований видно, что лейкоциты молоди сибирского осетра в присутствии ионов меди реагируют уменьшением доли содержания лимфоцитов на первых этапах эксперимента и увеличением нейтрофилов и эозинофилов (табл. 35).

Данные экспериментов свидетельствуют, что процесс нормализации состава и соотношения клеток у рыб этой серии опытов имеет свои особенности по сравнению с двумя предыдущими. Прежде всего это связано с изменениями доли содержания лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов. Если у рыб, находящихся в присутствии ионов ртути и кадмия имеет место достоверное уменьшение доли лимфоцитов, через 7 сут, то у молоди сибирского осетра через 7 и 14 дней. Доля других типов клеток (палочкоядерных нейтрофилов и эозинофилов), несмотря на отмеченную тенденцию увеличения их процентного содержания по

Таблица 35

Динамика изменения содержания лейкоцитов (%) молоди сибирского осетра под влиянием ионов меди

Срок отбора проб, сут	Тип клеток			
	Лимфоциты	Нейтрофилы палочкоядные	Нейтрофилы сегментоядные	Эозинофилы
7	73,0 ± 3,5*	5,5 ± 1,9	6,0 ± 1,8*	15,0 ± 2,3
	85,0 ± 2,6	1,5 ± 0,5	3,3 ± 0,5	9,5 ± 1,9
14	79,6 ± 2,6*	5,6 ± 1,7	6,0 ± 1,9	8,8 ± 2,9
	90,2 ± 1,6	3,2 ± 0,5	3,6 ± 1,9	3,0 ± 0,9
30	71,6 ± 6,0	8,0 ± 3,1	13,6 ± 4,8*	6,8 ± 2,2
	76,8 ± 1,9	6,6 ± 1,5	5,4 ± 1,2	10,2 ± 1,8
60	78,2 ± 5,7	10,2 ± 3,1	5,2 ± 1,2*	6,2 ± 1,7
	81,8 ± 3,4	13,3 ± 3,4	3,3 ± 1,9	1,8 ± 0,3

Примечание: верхняя строка – показатели опытных рыб, нижняя – контрольных. Значком \* помечены данные, достоверно отличающиеся от контроля.

сравнению с контролем, достоверных изменений не претерпевает, за исключением сегментоядерных нейтрофилов.

Общеизвестно, что состав и уровень циркулирующих в периферической крови лейкоцитов определяется структурно-функциональным состоянием гемо- и иммунопоэтической ткани, морфологической основой которого является ретикулолимфоидная ткань ("Нормальное кроветворение и его регуляция", 1976; Купер, 1980; Петров, 1982; Иванова, 1983; Флоренсов, Пестова, 1990). Чтобы понять, каким образом влияют используемые в наших опытах ионы тяжелых металлов на функциональное состояние гемопоэтической ткани, нами впервые предложен тест, позволяющий регистрировать интенсивность лейкопоэза по данным анализа индекса обилия лейкоцитов, или частоты встречаемости клеток белой крови в одном поле зрения. Этот показатель косвенно позволяет судить также об уровне содержания лейкоцитов в единице объема крови. Практически все соли тяжелых металлов подавляют функциональное состояние гемо- и иммунопоэтической ткани (табл. 36).

Из результатов экспериментов видно, что индекс обилия лейкоцитов почти во всех вариантах опытов был ниже, чем таковой в контроле, за исключением замеров, проведенных через 30 дней от начала опыта. Достоверно установлены низкие величины исследуемого признака в опытах с ионами кадмия и ртути. Под влиянием кадмия активность лейкопоэза подавляется гораздо раньше, чем под влиянием ртути, а в присутствии ионов меди эта функция у осетров существенно не меняется. Ртуть и кадмий, по-видимому, вызывают более глубокие и необратимые изменения в ретикулолимфоидной (гемопоэтической) ткани моло-

Таблица 36

Индекс обилия лейкоцитов, в единицах на 1 поле зрения

Токсикант Срок отбора, сут.	Hg	Cd	Cu	Контроль
7	1,3 ± 0,1	0,7 ± 0,1*	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,4
14	1,7 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,2	2,7 ± 0,9
30	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,3
60	0,4 ± 0,0*	0,3 ± 0,1*	0,7 ± 0,2	1,8 ± 0,2

Примечание. Значком \* помечены данные, достоверно отличающиеся от контроля.

Таблица 37

Фагоцитарная активность лейкоцитов периферической крови сибирского осетра, %

Тест-показатель	Срок отбора проб, сут		
	14	30	60
Число фагоцитирующих клеток	O 17,0 ± 2,5	29,0 ± 6,1	9,0 ± 3,8
	K 28,0 ± 4,0	25,0 ± 6,0	26,0 ± 4,6
Фагоцитарный индекс	O 0,8 ± 0,2	1,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
	K 1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2

Примечание: O – опыт; K – контроль.

ди осетра. Токсический эффект последних, вероятно, обусловлен разрушением центров лейкопоэза и подавлением образования колонеостимулирующих факторов стромальных родоначальных клеток белой крови.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют, что под воздействием сублетальных концентраций ионов тяжелых металлов происходит дестабилизация соотношения между отдельными формами лейкоцитов и подавляется функция гемо- и иммунопоэтической ткани. Обнаруженные изменения доли содержания отдельных форм лейкоцитов в динамике опытных рыб чередующиеся периодами "дестабилизации" – "нормализации" – "дестабилизации" свидетельствуют, что они являются характерными для реакции на стресс (Селье, 1960). Следовательно, выявленные нарушения динамики состава лейкоцитов имеют неспецифический характер и отражают развитие общего адаптационного синдрома исследуемых рыб на резкую смену условий среды обитания. Уменьшение доли содержания лимфоцитов при одновременном увеличении доли нейтрофилов и эозинофилов под влиянием исследуемых солей тяжелых металлов позволяет сделать вывод, что рыбы, как



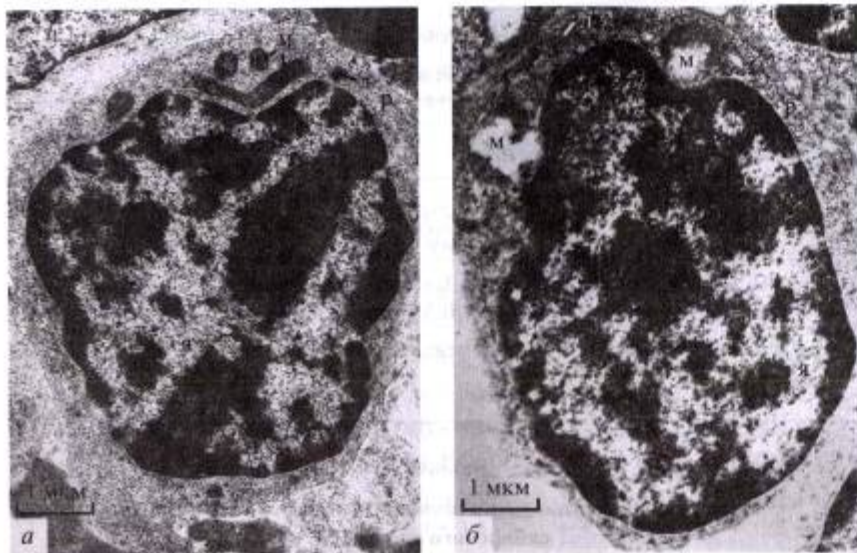


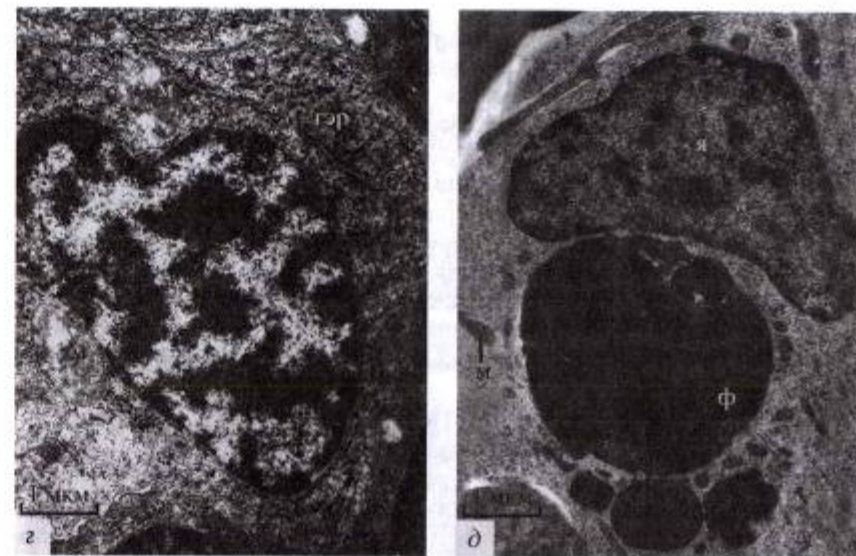
Рис. 10. Ультраструктура малых лимфоцитов, плазматических клеток и макрофагов осетра.

*а* – малый лимфоцит, контроль; *б* – малый лимфоцит, 14 сут в воде с добавлением меди; *в* – плазматическая клетка, контроль; *г* – плазматическая клетка, 14 сут в воде с добавлением меди; *м* – митохондрия, *л* – лизосома, *р* – ризосом, *гэр* – гранулярный эндоплазматический ретикулум, *ф* – фагосома, *я* – ядро.

и высшие позвоночные, на воздействие загрязняющих веществ реагируют аллергизацией организма.

В целях понимания характера влияния солей тяжелых металлов на функциональное состояние лейкоцитов нами проведено исследование влияния кадмия на фагоцитарную активность лейкоцитов *in vitro*.

Анализ фагоцитарной активности лейкоцитов, проведенный нами у опытных и контрольных рыб, показал, что функциональное состояние



этих клеток у осетров, находящихся в растворе ионов кадмия, снижается (табл. 37). Изменение данного показателя соответствует таковому БАСК (табл. 32).

Под воздействием токсиканта снижалось не только число активных лейкоцитов, но и индекс фагоцитоза. Данные анализа фагоцитарной активности лейкоцитов свидетельствуют о глубоких изменениях, происходящих в структуре иммуноцитов. Это наглядно подтверждается электронно-микроскопическими исследованиями ультраструктуры иммунокомпетентных клеток селезенки и почек осетра (*Acipenser baeri* Brandt) Л.В. Балабановой (1998) после воздействия на них сублетальных концентраций меди 0,15 мг/л, ртути 0,083 мг/л и кадмия 0,03 мг/л.

Исследованиями установлено, что ультраструктура малых лимфоцитов, плазматических клеток и макрофагов подобно таковой других видов костистых рыб.

**Контроль.** Ультраструктура малых лимфоцитов, плазматических клеток и макрофагов соответствует таковой костистых рыб и млекопитающих. В малых лимфоцитах большую часть клетки занимает ядро, цитоплазма представлена узким ободком и бедна органоидами, она обычно содержит митохондрий, гранулы типа лизосом и свободные рибосомы (рис. 10а).

Отличительная черта плазматических клеток – наличие в цитоплазме хорошо развитой сети гранулярного эндоплазматического ретикула (ГЭР) (рис. 10в).

Макрофаги – самые крупные клетки из всех иммуноцитов (рис. 10д). В их цитоплазме содержатся фагосомы, часто включающие целые погибшие клетки.

По частоте встречаемости и морфологии нейтрофилы осетра аналогичны нейтрофилам других видов рыб. Это наиболее многочислен-



ный тип гранулоцитов. Форма ядра разнообразная, может быть трехлопастной или бобовидной. В цитоплазме содержатся 2 типа гранул – продолговатые и округлые, несколько митохондрий, рибосомы и отдельные цистерны ГЭР. Продолговатые гранулы имеют тонкую фибриллярную структуру (рис. 11а').

Эозинофилы – клетки с большим количеством крупных округлых гранул с однородным электронно-плотным содержанием (рис. 11в).

Кроме этих двух типов гранулоцитов, характерных для многих видов рыб, в селезенке и почке сибирского осетра встречались, хотя и очень редко, гранулоциты с небольшим количеством крупных удлиненных и округлых гранул (рис. 11д). Внутренняя структура этих гранул представлена чередующимися темными и светлыми параллельными полосами (рис. 11д').

Исследования периферической крови и кроветворных органов русского осетра *A. guldenstadti* на светооптическом уровне позволило обнаружить 2 типа гранулоцитов: нейтрофилы и эозинофилы (Иванова, 1983). При изучении ультраструктуры гранулоцитов другого вида – *A. brevirostrum* обнаружено 3 типа гранулоцитов: нейтрофилы, эозинофилы и базофилы (Hine, Wain, 1988). Тонкое строение гранул нейтрофилов этого вида осетра отличается от такового, наблюдаемого нами у *A. baeri*. Эозинофилы *A. brevirostrum*, как и *A. baeri* в нашем исследовании, содержат в цитоплазме крупные округлые гранулы. Клетки, описанные Хайном и Вэйном (Hine, Wain, 1988) как базофилы, нами не были обнаружены. Клетки с длинными полосатыми гранулами в крапильной гранулопоэтической ткани *A. brevirostrum* не встречались.

**Влияние токсикантов.** Через 7 сут действия на рыб солей тяжелых металлов изменений в ультраструктуре исследуемых клеток не наблюдалось. Через 14 сут экспозиции осетров в воде с добавлением растворимых солей ртути и меди в малых лимфоцитах и плазматических клетках изменялась ультраструктура одних из клеточных органоидов – митохондрий. Они были набухшими, с просветленным матриксом, иногда с разрушенными кристами (рис. 9 б, г). При более длительном (30 и 60 сут) действии на рыб солей тяжелых металлов была отмечена деградация митохондрий не только в малых лимфоцитах и плазматических клетках, но и в гранулоцитах всех типов (рис. 11). Кроме того, в некоторых эозинофилах после воздействия ртути в течение 60 сут наблюдалась деструкция специфических гранул (рис. 11г). При воздействии всеми исследуемыми нами тяжелыми металлами на рыб изменения в ультраструктуре макрофагов не выявлены.

Морфологические изменения митохондрий (их разбухание, просветление матрикса, разрушение крист) в иммунокомпетентных клетках при содержании рыб в воде с тяжелыми металлами отражают их функциональные изменения. При деградации митохондрий снижается синтез АТФ, обеспечивающий клетку необходимой ей энергией. Митохондрий – наиболее мобильные структуры клетки, изменение их опережает и определяет ответы других органоидов и клетки в целом на действие различных факторов, и их состояние может служить чувствительным показателем состояния клетки (Машанский и др., 1971). Измене-

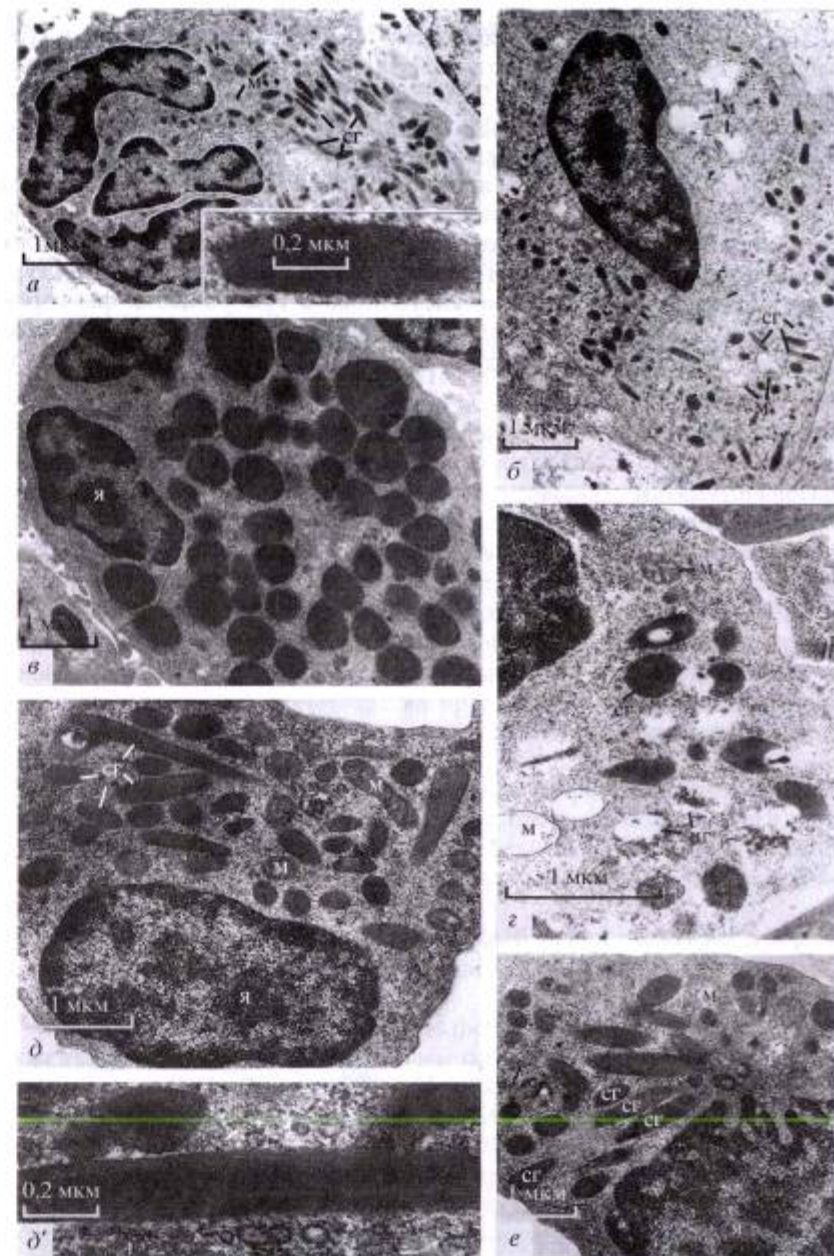


Рис. 11. Ультраструктура гранулоцитов осетра.

а – нейтрофил, контроль, а' – гранула; б – нейтрофил, 60 сут в воде с добавлением кадмия; в – эозинофил, контроль; з – эозинофил, 60 сут в воде с добавлением ртути; д – гранулоцит III типа, контроль, д' – гранула; е – гранулоцит Штипа, 60 сут в воде с добавлением меди. сг – специфические гранулы, иг – измененные гранулы. Остальные обозначения те же, что на рис. 10.



ние митохондрий в малых лимфоцитах, плазматических клетках и гранулоцитах под действием тяжелых металлов приводит к снижению устойчивости рыб к болезням. Эти изменения могут служить чувствительным показателем состояния клетки при воздействиях, еще не затрагивающих другие клеточные структуры.

Таким образом, исследованиями влияния солей тяжелых металлов на рыб установлено разнообразие происходящих в иммунной системе изменений. Динамика нарушений иммунологических показателей носит одно- и двухфазный характер и связана де- и рестабилизацией структурно-функционального состояния клеточного и гуморальных факторов иммунитета. Выявленные в иммунной системе рыб изменения на воздействие солей тяжелых металлов отражают развитие общего адаптационного синдрома на стресс.

## ГЛАВА ТРЕТЬЯ

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕНОЛА НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЫБ

#### ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛА НА ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА РЫБ

Фенол и его производные являются широко распространенными загрязнителями водных экосистем. Они содержатся в сточных водах химических, нефтяных, газовых, фармацевтических, металлургических, текстильных, целлюлозобумажных, кожевенных и других промышленных предприятий. Концентрации фенола в сточных и природных водах широко колеблются и достигают значительных величин в сбросах отходов промышленных предприятий (Флеров, 1973). Содержание фенола в сточных водах предприятий химической промышленности достигает 3800 мг/л (Eldridge, 1936). Объем фенольных сточных вод в зависимости от мощности и вида производства предприятий может достигать нескольких десятков кубических метров в сутки при концентрации фенола от 0,7 до 2,0 г/л (Чистяков, 1941).

Фенольные соединения антропогенного происхождения придают воде и водным животным, включая рыбу, отталкивающий вкус и запах, а большие концентрации приводят к гибели гидробионтов (Лукьяненко, 1967, 1983; Метелев и др., 1971; Флеров, 1973, 1989; Saha et al., 1999 и др.).

По характеру влияния на организм рыб фенол относится к нервно-паралитическим ядам, местом действия которых являются холинэргические синапсы (Флеров, 1973, 1989).

Согласно данным других авторов фенол у рыб вызывает общую интоксикацию, действуя на все системы организма (Строганов, 1967; Метелев и др., 1971; Waluga, 1966; Holmberg et al., 1972; Wlasow, 1985; Makherjee et al., 1990, 1991; Saha et al., 1999 и др.), в том числе и на иммунную (Гончаров, Микряков, 1968, 1970).

На воздействие фенола рыбы реагируют нарушением темпов роста, размножения и функциональной активности иммунной системы, обеспечивающей биологическое постоянство внутренней среды и устойчивость рыб к паразитам, вызывающим инфекционные болезни.

В существующей литературе мало работ, посвященных исследованию влияния фенола на функционирование иммунной системы рыб, охватывающих все уровни организации и отдельные ее составляющие. Это касается как гуморального, так и клеточного звеньев иммунитета рыб.

Таблица 38

## Влияние фенола на синтез антител, в титрах разведения сыворотки крови

Условия содержания	Количество особей	Концентрация фенола, мг/л			Контроль
		3,12	6,25	12,5	
Сытые	20	1:1493	1:743	1:229	1:1319
Голодные	20	1:96	1:69	1:19	1:113

Для понимания характера реагирования механизмов иммунитета на присутствие в воде фенола нами проведено изучение интенсивности антителообразования при содержании иммунных рыб в фенольных растворах.

В опытах, поставленных нами на карпах при различных заданных концентрациях фенола (3,13; 6,25 и 12,5 мг/л) показано, что рыбы на присутствие токсиканта реагировали изменением функций антителообразования (Гончаров, Микряков, 1968, 1970). Исследования влияния фенола на специфический гуморальный иммунитет проводили на двукратно иммунизированных сеголетках карпа. Рыб иммунизировали с 5-суточным интервалом вакциной, полученной из *Aeromonas hydrophila*, внутривентриально в дозе 150–200 млн бактериальных тел. На 45 сут после последней инъекции рыб усыпляли, отбирали кровь, в сыворотке крови определяли уровень антител, используя реакцию агглютинации. Опыты ставили в двух вариантах. В 1-ом варианте карпов кормили дождевыми червями и фаршем из смеси морской рыбы, манной крупы и вареного картофеля (в соотношении 1:1:0,5). Проведенные исследования показали, что характер и направление синтеза антител отражали условия содержания рыб и концентрацию фенола в опыте (табл. 38, рис. 12).

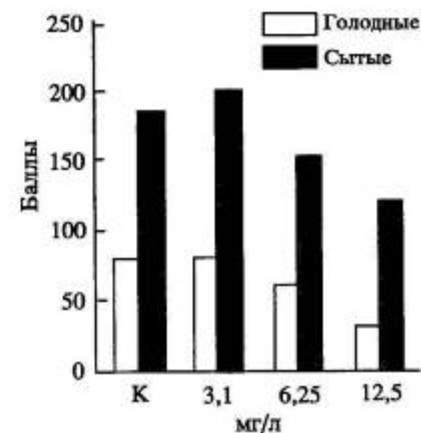
Выявлен дозозависимый характер функционирования специфического звена иммунитета. Максимальный иммуносупрессивный эффект на синтез антител наблюдали при концентрации фенола 12,5 мг/л, несколько меньший – при 6,25 мг/л. При содержании фенола 3,12 мг/л интенсивность антителообразовательной функции не отличалась от контроля (табл. 38).

Во 2-ом варианте опыта тенденция изменения титров антител в зависимости от концентрации фенола в воде носила тот же характер, что и в 1-ом варианте, но разведения сыворотки были на порядок меньше (табл. 38). Об этом свидетельствуют данные анализа не только средних титров антител, но и значения суммы баллов реакции агглютинации у опытных и контрольных рыб. Количественные характеристики суммы баллов в контроле при концентрации фенола 3,12 мг/л имели более высокие значения, чем при 6,25 мг/л и 12,5 мг/л (рис. 12).

Действие фенола на синтез антител, как установлено нами ранее усиливается после предварительного выдерживания рыб в растворе то-

Рис. 12. Влияние фенола на интенсивность антителообразования карпов

Примечание: по оси ординат – сумма баллов реакции агглютинации, по оси абсцисс – заданные концентрации фенола, мг/л. К – контроль



ксиканта. Опыты ставили на сеголетках карпа, подвергнутых воздействию фенола в течение одного месяца при ежесуточной заданной концентрации 10 мг/л. Рыб иммунизировали внутривентриально 2-кратной инъекцией 150–220 млн инактивированных нагреванием бактерий *Aeromonas hydrophila*. Отбор проб осуществляли через 45 суток при условии ежедневного кормления. Интенсивность реакции агглютинации у опытных карпов была достоверно ниже, чем у контрольных. Максимальная сумма баллов в опыте при разведении сыворотки 1:10 равнялась 15 у.е., тогда как в контроле – 32. Опытные и контрольные особи отличались между собой и по величине титров антител (1:40 и 1:2560 соответственно). Данные этих опытов, позволяют думать, что у рыб после 30-суточной экспозиции в феноле антителообразовательная функция подавляется.

Таким образом, фенол в относительно высоких концентрациях и в условиях хронического эксперимента, по-видимому, подавляет специфический иммунитет. У рыб в присутствии фенола поражается прежде всего белоксинтезирующая функция иммунной системы.

Под влиянием фенола, вероятно, поражаются как антигенвоспринимающие, так и антигенразрушающие структуры, от функционирования которых зависит перевод антигенов в иммуногенную форму и появление популяции антителосинтезирующих иммуноцитов. Косвенно это подтверждается данными исследований состава лейкоцитов и лимфоидно-макрофагальных клеток в иммунокомпетентных тканях и органах рыб.

#### РЕАКЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА РЫБ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ФЕНОЛА

Ранее нами установлено, что синтез антител, как защитная реакция организма рыб на антигенные раздражители, является результатом деятельности клеток лимфоидно-макрофагальной системы (ЛМС) и связан с процессами распознавания, восприятия, разрушения антигена и дифференцировки иммунокомпетентных клеток в сторону антителообразующих (Микряков и др.; 1974, Микряков, Балабанова, 1979). На разных этапах иммуногенеза в популяциях иммунокомпетентных клеток изменяется доля содержания антигенраспознающих, антигенразрушающих и антителосинтезирующих иммуноцитов (Микряков, 1991).



Первый этап иммуногенеза, связанный с восприятием и разрушением антигена, сопровождается увеличением доли клеток, осуществляющих фагоцитоз чужеродных тел, второй этап – увеличением доли плазматических и лимфоидных клеток, выполняющих функции синтеза антител и носителей иммунологической памяти. На примере карпов, иммунизированных бактериальным антигеном, нами определены основные закономерности трансформации и дифференцировки клеток, осуществляющих процесс распознавания, разрушения антигена и синтеза антител.

В целях понимания характера реагирования иммуноцитов на воздействие фенола и установления связи интенсивности образования антител с динамикой изменения состава иммунокомпетентных клеток нами проведено исследование структурно-функционального состояния клеток ЛМС карпов и карасей, подвергнутых хроническому воздействию токсиканта.

Оценку состояния клеточного звена иммунитета осуществляли по данным анализа состава лейкоцитов периферической крови и клеток ретикуло-лимфоидной ткани почек.

Проведенный анализ лейкоцитарной формулы периферической крови карпов показал, что у рыб при различных концентрациях фенола в условиях хронического эксперимента изменяется соотношение отдельных типов клеток (табл. 39).

У рыб в присутствии фенола доля лимфоцитов снижается, а нейтрофилов – повышается. У голодающих рыб выявленные сдвиги выражены сильнее, чем у сытых. Независимо от условий кормления рыб, при концентрации фенола 12,5 мг/л относительное количество лимфоцитов у не получающих пищу особей падает в большей степени, чем при концентрации 3,12 и 6,25 мг/л. Напротив, процент содержания нейтрофилов при высоких концентрациях токсиканта (12,5 мг/л) по сравнению с контрольными, повышается более чем в 10 раз (табл. 39).

Установленные изменения в составе лейкоцитов свидетельствуют, что под влиянием фенола нарушаются процессы лимфо- и миелопоэза. Фенол в высоких концентрациях и у голодающих особей, независимо от количества внесенного в опыт токсиканта, инициирует миелопоэз и приводит к интенсификации процессов образования клеток гранулоцитарного ряда: палочко- и сегментоядерных нейтрофилов.

В другой серии опытов, поставленных нами на карасях (*Carassius carassius* L.), получены сходные результаты. Используемая концентрация фенола – 3 мг/л – составила 1/10 от 96 час LC<sub>50</sub>. Отбор проб крови осуществляли через 1, 4, 7 и 28 сут с начала эксперимента.

Проведенные исследования показали, что в норме в периферической крови карасей встречаются все основные типы лейкоцитов, характерные для большинства представителей пресноводных рыб из семейства карповых (Головина, Тромбицкий, 1989; Иванова, 1983, 1995). Основную часть крови карася составляют лимфоциты, затем нейтрофилы, моноциты и эозинофилы. Кроме того, в составе лейкоцитов выявлены бластные формы клеток (табл. 40).

Таблица 39

Влияние фенола на показатели лейкоцитов карпа, %

Концентрация фенола, мг/л	Условия опыта	Тип лейкоцитов				
		Лимфоциты	Нейтрофилы		Моноциты	Бласты
			Палочко-ядерные	Сегментоядерные		
3,12	Сытые	85,4±4,3	4,3±1,1	1,6±0,5	4,7±0,4	4,1±0,9
		93,5±4,9	2,2±0,3	1,6±0,4	3,1±0,9	0,7±0,1
	Голодные	82,2±6,2	9,0±1,7	5,4±0,8	0,8±0,2	3,1±0,3
		88,0±2,3	7,8±0,8	3,1±0,2	0,9±0,2	0,5±0,8
6,25	Сытые	90,1±4,7	2,4±0,4	1,3±0,3	4,3±0,6	2,0±0,2
		93,5±4,1	2,2±0,9	1,6±0,4	3,1±0,9	0,7±0,1
	Голодные	70,7±3,2	15,4±3,1	12,2±4,1	1,4±0,3	1,5±0,2
		88,07±5,1	7,8±0,8	3,0±0,1	0,9±0,2	0,5±0,1
12,50	Сытые	64,2±6,1	26,1±3,0	13,6±1,8	5,6±0,7	2,1±0,1
		93,5±4,9	2,2±0,3	1,6±0,4	3,1±0,9	0,7±0,1
	Голодные	49,5±5,8	23,8±3,1	13,5±2,0	8,0±1,2	1,8±0,3
		88,0±5,1	7,8±0,8	3,0±0,1	0,9±0,2	0,5±0,1
Контроль	Сытые	76,6±5,1	10,7±2,0	6,1±1,1	1,5±0,4	6,0±0,5
Иммуно-голодные	Голодные	82,6±7,4	9,5±1,9	4,5±0,9	1,3±0,2	2,2±0,6

Примечание. Над чертой – опыт, под чертой – контроль.

Анализ лейкоцитарной формулы карася показал, что рыбы на присутствие в воде фенола реагировали, как и карпы, изменением относительного количества отдельных типов клеток.

Аналогичные изменения в составе лейкоцитов у изучаемых видов рыб, в основном происходили за счет уменьшения относительного количества лимфоцитов и увеличения доли нейтрофилов и моноцитов.

Таблица 40

Изменение лейкоцитарной формулы караса под влиянием фенола (в %)

Тип клеток	Время, сут.			
	1 сут.	4 сут.	7 сут.	28 сут.
Лимфоциты	83,6±4,0	90,2±2,4	91,0±1,1	90,2±1,1
	77,2±3,1	78,2±2,6*	85,0±3,0*	88,0±1,3
Нейтрофилы	8,4±1,8	5,6±0,6	5,6±0,8	5,5±0,6
	12,2±2,2	13,2±1,4*	10,4±2,2*	7,6±1,2
Эозинофилы	1,4±0,4	0,6±0,4	0,6±0,2	1,0±0,4
	0,8±0,4	1,2±0,6	0,8±0,7	0,5±0,4
Моноциты	5,6±1,8	3,0±1,04	2,6±0,4	2,3±0,6
	7,6±0,7	5,8±0,9*	3,8±0,76	3,8±0,3
Бластные формы	1,0±0,3	0,6±0,4	0,2±0,2	0,8±0,5
	2,0±0,7	1,6±0,4	0	0,6±0,2

Примечание: над чертой – контроль, под чертой – опыт. \* – достоверные различия при  $p \geq 0,05$ .

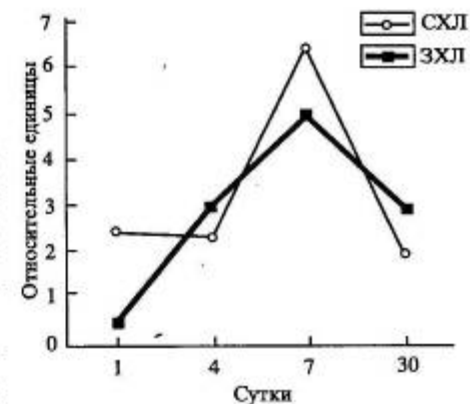
Выявленные сдвиги на разных этапах пребывания рыб в токсиканте носили фазовый характер, периоды уменьшения одних форм и увеличения других чередовались с возвращением их к исходному уровню. Сходный характер реагирования лейкоцитов выявлен нами и при воздействии на рыб солей тяжелых металлов и карбофоса.

Обнаруженные в течение эксперимента в лейкоцитарной формуле карасей изменения являются характерными для реакции рыб на стресс и отражают развитие общего адаптационного синдрома по Г. Селье (1960). Их следует считать неспецифическими, поскольку подобную реакцию лейкоцитов у рыб отмечали при действии стресс-факторов самой различной природы (Балабанова, Степанова, 2000; Заботкина, 1999; Степанова и др., 1992; 1998).

Вызванные фенолом и другими используемыми в наших экспериментах (см. выше) токсикантами нейтрофилия и лимфопения, по-видимому, обусловлены нарушениями структурной целостности тканей и органов, воспалительными процессами в организме и некрозом тканей рыб. Процессы воспаления сопровождаются миграцией гранулоцитов, особенно нейтрофильных, к участкам поврежденных тканей.

Общезвестно, что основными причинами, способствующими увеличению доли нейтрофилов у животных и человека, являются воспалительные и некротические процессы, возникающие в ответ на внедрение в организм токсических, инфекционных, аллергических и других раздражителей (Адо, 1978; Антоняк, 1999; Маянский, Маянский, 1983 и др.). Нейтрофилы, благодаря наличию в них целого комплекса протео-

Рис. 13. Влияние фенола на спонтанную и стимулированную ХЛ лейкоцитов караса



литических и других ферментов, участвуют в реализации различных иммунологических функций, направленных на нейтрализацию токсических раздражителей и поддержание биологического гомеостаза.

Защитная роль нейтрофилов в организме позвоночных, как известно, обуславливается особенностями метаболизма и их способностью осуществлять фагоцитоз, синтез и секрецию интерлейкина, лизоцима, ферментов, ингибиторов, биологически активных веществ, стимулирующих рост клеток и заживление ран (Антоняк, 1999). Они богаты протеазами, обладающими бактерицидной активностью. Антимикробная активность нейтрофильных гранулоцитов связана также с их способностью генерировать токсические производные кислорода ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $HOCl$ ). Освобождающиеся из нейтрофилов протеолитические ферменты имеют важное значение при реализации процессов фагоцитоза и миграции клеток к местам локализации патогенных и токсических раздражителей. Следует отметить, что протеазы нейтрофилов при недостаточной активности ингибиторов участвуют в разрушении не только чужеродных тел, но и нормальной ткани и различных типов клеток, таких как эритроциты, тромбоциты, гепатоциты, эндотелициты и т.д. (Антоняк, 1999), тем самым способствуя возникновению аутоиммунных процессов и стимулируя синтез абзимантител с высокой каталитической активностью. Под воздействием протеолитических ферментов, в основном эластазы нейтрофилов, подавляется функция гемопоэза. Вполне вероятно, происходящее под воздействием фенола увеличение количества нейтрофильных гранулоцитов отражает реакцию иммунной системы рыб на появление в организме фенолиндуктированного повреждения клеток, тканей и органов и изменение темпов лимфо- и миелопоэза.

У рыб, находящихся в воде с фенолом, как это показано нами на карасях, отмечено изменение не только состава лейкоцитов, но и интенсивности гемопоэза и функционального состояния клеток белой крови. Об этом, в частности свидетельствуют данные анализа динамики содержания лейкоцитов в периферической крови и их хемилюминесцентной активности (рис. 13). Число лейкоцитов, отражающее гемопоэтическую активность тканей и органов лимфо-миелоидного комплекса, после кратковременного повышения через сутки, в последующие сроки наблюдения на протяжении всего периода эксперимента по сравнению с контрольным постепенно падает. Снижение содержания клеток белой крови, согласно данным анализа лейкоцитарной



Таблица 41

Влияние фенола на содержание иммунокомпетентных клеток  
в тканях туловищной почки карпа, %

Концент- рации фенола, мг/л	Условия опыта	Название клеток			
		Плазма- тические клетки	Лимфоид- ные	Грануло- циты	Ретику- лярные
3,1	Кормились	$13,5 \pm 0,4$	$28,0 \pm 2,5$	$50,0 \pm 4,4$	$9,1 \pm 0,1$
		$10,3 \pm 0,2$	$22,0 \pm 1,8$	$58,0 \pm 3,4$	$12,0 \pm 0,2$
	Голодные	$9,5 \pm 0,3$	$24,0 \pm 1,9$	$64,8 \pm 4,7$	$4,8 \pm 0,1$
		$11,4 \pm 0,3$	$19,0 \pm 0,8$	$61,0 \pm 5,1$	$9,4 \pm 0,2$
6,25	Кормились	$15,3 \pm 0,9$	$36,3 \pm 4,0$	$40,3 \pm 3,4$	$7,8 \pm 0,2$
		$10,3 \pm 0,4$	$28,0 \pm 1,8$	$53,0 \pm 5,4$	$8,2 \pm 0,3$
	Голодные	$12,1 \pm 0,5$	$20,0 \pm 1,3$	$61,4 \pm 4,5$	$6,4 \pm 0,1$
		$9,1 \pm 0,3$	$22,0 \pm 0,9$	$65,2 \pm 6,0$	$4,6 \pm 0,1$
12,5	Кормились	$17,0 \pm 1,7$	$25,0 \pm 2,1$	$51,0 \pm 3,1$	$7,2 \pm 0,1$
		$12,1 \pm 0,8$	$25,4 \pm 1,9$	$54,0 \pm 4,0$	$9,4 \pm 0,3$
	Голодные	$7,1 \pm 0,4$	$23,0 \pm 1,8$	$66,0 \pm 4,8$	$10,0 \pm 0,2$
		$11,3 \pm 0,3$	$22,0 \pm 1,5$	$58,0 \pm 2,8$	$9,7 \pm 0,3$
Контроль	Кормились	$8,4 \pm 0,2$	$25,0 \pm 2,1$	$52,0 \pm 4,1$	$10,0 \pm 0,3$
		$11,0 \pm 0,3$	$22,0 \pm 1,8$	$55,0 \pm 3,9$	$11,0 \pm 0,4$

Примечание: Над чертой – опыт, под чертой – контроль.

формулы (табл. 41), в основном происходит за счет лимфоцитов, вероятно, выполняющих и контролирующих функции распознавания “своего” и “чужого” и синтеза антител. Это хорошо подтверждается нашими исследованиями по изучению влияния фенола на интенсивность антителогенеза у карпа (табл. 41, рис. 13). Несмотря на снижение специфического иммунного ответа рыб на антигенный раздражитель, происходящее под влиянием фенола, функциональное состояние клеток белой крови, наоборот, повышается. Исследованиями функционального состояния лейкоцитов обыкновенного карася методом анализа люминолзависимой хемилюминесцентной активности показано, что фенол в концентрации 3 мг/л приводит к устойчивому усилению хемилюминесцентной активности клеток крови (рис. 13) (Попов, Микряков, 2000).

Интенсивность свечения клеток определялась по спонтанной (СХЛ) и стимулированной зимозаном (ЗХЛ) хемилюминесценции с помощью автоматизированной системы “Люцифер-Б” (Попов, 1995). Сравнение СХЛ и ЗХЛ показало, что спонтанная хемилюминесценция преобладала над стимулированной. Материалы исследований позволяют думать, что популяция лейкоцитов карася представлена чувствительными и нечувствительными к зимозану клетками. Высокий уровень СХЛ, обнаруженный у рыб на 4–7 сут от начала опытов, свидетельствует, что фенол инициирует образование клеток с высокими адгезивными свойствами, обладающими интенсивной хемилюминесцентной активностью. Вполне возможно, что это происходит за счет нейтрофильных гранулоцитов. У последних, как известно, при определенных условиях усиливаются адгезивные свойства, связанные с процессами воспаления и повреждения тканей и т.д. (Антоняк, 1999).

В целях установления характера связи темпов образования нейтрофильных гранулоцитов и поступления их в периферическую кровь, нами проведена количественная оценка лимфоидно-макрофагальных клеток и мазках-отпечатках мезонефроса (туловищной почки) карпов, подвергнутых воздействию различных концентраций фенола (табл. 41).

Исследования проводили на иммунизированных бактериальным антигеном рыбах, материал отбирали через 45 сут с начала опыта. В мазках-отпечатках лимфоидной ткани мезонефроса выявлены все основные группы иммунокомпетентных клеток: плазмоциты, лимфоциты, гранулоциты и ретикулоциты. Классификацию клеток осуществляли согласно методике, предложенной нами ранее (Микряков, 1970).

Из материалов опыта следует, что более 50% учтенных в мазках-отпечатках клеток у контрольных особей составляют гранулоциты и предшественники нейтрофилов. У голодающих рыб и особей, подвергнутых воздействию фенола, относительное содержание этих клеток было выше, чем у карпов, получающих ежедневную подкормку (табл. 41). Вместе с тем относительно высокий уровень содержания клеток плазматического и лимфоидного рядов, обнаруженный нами у получающих пищу особей при всех концентрациях фенола, свидетельствует, что процессы лимфопоэза, образования антителосинтезирующих структур и синтеза антител не нарушаются. У получающих корм опытных рыб величины относительного содержания гранулоцитов по сравнению с контрольными имели более низкие значения (табл. 41). Это позволяет предполагать, что реакция иммунной системы на фенол зависит от исходного состояния и условий содержания рыб. Не исключено, что механизмы и структуры, осуществляющие нейтрализацию фенола у получающих корм рыб, поражаются в меньшей степени, чем у голодающих в присутствии токсиканта особей.

**ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛА НА СОСТОЯНИЕ  
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ  
И ПРОЦЕССЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ПЕРЕКИСНОГО  
ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ И ОРГАНАХ  
ЛИМФОМИЕЛОИДНОГО КОМПЛЕКСА**

Общезвестно, что одним из существенных факторов, обеспечивающих устойчивое существование особи в колеблющихся условиях среды и при воздействии на живые организмы токсических факторов, является обеспеченность организма антиоксидантами, предотвращающими процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) путем нейтрализации токсических производных кислорода ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $HOCl$  и т.д.), генерируемых нейтрофилами и другими клетками.

Принято считать, что окислительные и антиоксидантные системы являются важными составляющими гомеостаза организма. Соотношение этих процессов в организме рыб изучено довольно слабо, хотя любая напряженная деятельность (миграция, созревание половых продуктов, нерест) сопровождается усилением окислительных процессов, в результате чего накапливаются их продукты, выступающие в роли первичного медиатора стресса (Барабой, 1991). ПОЛ играет важную роль в жизнедеятельности живого организма. С возникновением аэробной жизни в живых организмах образуются активированные кислородом свободные радикалы как естественные продукты нормального метаболизма. С одной стороны, ПОЛ принимает участие в поддержании нормальной физиологической активности клетки, являясь необходимым для синтеза ДНК, простагландинов, лейкотриенов (Алексеев, 1981; Арчаков, 1975; Бергельсон, 1975; Владимиров, Арчаков, 1972; Кагава, 1985; Каншанов, Пименов, 1996; Крепс и др. 1986, 1987; Марков, 1970). Продукты ПОЛ являются неотъемлемой частью здорового организма, способствуют поддержанию физиологической активности клетки, участвуют в клеточной дифференцировке, а также в адаптации организма к факторам внешней среды. Для регуляции этих процессов в клетке имеется комплекс антиокислительных систем. Но в то же время накопление этих продуктов в клетках может приводить к повреждению клеточных структур, мембран клетки, выражающемуся в нарушении белок-липидных и липид-липидных взаимодействий, ингибированию активности ферментов, изменению избирательности проницаемости мембран для ионов и т.д. (Бергельсон, 1982; Владимиров, Арчаков, 1972; Козлов, 1977; Chance et al., 1979; Karpus, Sies, 1981). Нарушения структуры и состава липидного бислоя, вызванные активацией перекисного окисления, приводят к многочисленным нарушениям функционирования мембран клеток, а, следовательно, органов и систем. Накопление продуктов ПОЛ вызывает различные патологические состояния. Например, продукты ферментативного и спонтанного перекисного окисления липидов холестериновой природы (в частности, оксистероиды) могут проявлять иммуносупрессивное действие. Хорошо известен факт угнетения функций иммунной системы пищевыми окисленными производными холестерина (Chisari, 1980). Оксистероиды влияют на процессы клеточной пролиферации (на естественную про-

лиферацию и злокачественную трансформацию клеток). Окисленные производные холестерина, обладающие повышенной цитотоксичностью и способностью в низких концентрациях подавлять холестериногенез, ингибируют синтез ДНК и прекращают деление клеток, действуют на структуру и функции биологических мембран (Душкин, 1991). Существенную роль в инициации перекисного окисления липидов играют активные формы кислорода (Меньшикова, Зелков, 1993). Интенсивность перекисных процессов в мембранных липидах определяется напряжением кислорода в тканях и скоростью образования его активных форм – суперокси и ( $O_2^-$  гидроксильных (ОН) радикалов (Kunio, 1982). В обзоре Winston (1991) рассматриваются современные представления о механизмах образования свободных радикалов, обсуждается роль попадающих в воду органических ксенобиотиков в генерации свободнорадикальных реакций у водных организмов. Приводятся примеры стимуляции ПОЛ при попадании в воду  $CCl_4$ , полихлорированных дифенилов,  $Cd^{2+}$ , диэтилмалеата и др. Процессы ПОЛ могут играть важную роль в качестве факторов, повреждающих клетку, ткани и органы (Окорков, Федоров, 1982). В связи с этим в организме животных сформировались защитные антиоксидантные системы, включающие ферменты, SH-соединения, витамины и другие компоненты (Барабой, 1991; Меньшикова, Зелков, 1993; Руднева-Титова, 1997; Fiho, 1996). Интенсивность ПОЛ зависит от наличия антиоксидантов в организме рыб (Дудкин, 1990; Руднева-Титова, 1997 а). Таким образом, нормальный метаболизм у рыб определяется балансом образования продуктов ПОЛ и активностью антиоксидантной системы. Снижение активности антиоксидантных ферментов приводит к накоплению пероксидных продуктов, прежде всего малонового диальдегида (МДА).

Способность токсических веществ различной природы либо их метаболитов индуцировать ПОЛ может проявляться по-разному. В работе Хольма с соавторами (Holme et al., 1982) отмечено, что при действии N-оксипарацетамината происходит увеличение содержания МДА лишь при определенных концентрациях токсиканта в диапазоне от 0,3 до 1 мМ с максимумом при 0,5 мМ. В отличие от этого цитотоксический эффект  $CCl_4$  возрастал пропорционально увеличению его концентрации и параллельно с постоянным ростом содержания МДА. В работе Стакея и Клаасена (Stacey, Klaasen, 1981) показано, что при действии некоторых токсикантов может происходить образование диеновых конъюгатов и накопление МДА с одновременными повреждениями клеток (выход  $K^+$ , снижение активности аспаратаминотрансферазы, уменьшение содержания восстановленного глутатиона). Нарастание МДА при экспозиции рыб в воде, загрязненной кадмием сопровождалось увеличением проницаемости плазматической мембраны клеток печени. Нарушение селективности плазматической мембраны, приводило в результате воздействия этого металла к потере внутриклеточного  $K^+$ , снижению активности аспаратаминотрансферазы и лактатдегидрогеназы. Основное повреждающее действие кадмия проявлялось в нарушении энергетического метаболизма клеток печени, в частности, он инги-



бирует АТФазную активность (Гулак и др., 1985; Muller, 1983; Stacey, Klaasen, 1980). Усиление процессов ПОЛ в тканях рыб отмечено при действии солей ртути (Wofford, Thomas, 1988), свинца (Фарапонтов, 1984), ванадия (Chakraborty et al., 1994), аммиака (Грубинко и др., 1996), перекиси водорода, хлорофоса. Евтушенко с соавторами (1990) отметили усиление ПОЛ в тканях рыб-бентофагов Киевского и Кременчугского водохранилищ при действии тяжелых металлов, ПДК которых превышала в 10–30 раз. Малышева и Сытник (2000) установили четкий дозозависимый эффект действия тяжелых металлов на ПОЛ карпа. Пол у карпа и белого толстолобика зависит от различий темпа роста (Аверьянова и др., 2000).

Перекисное окисление липидов не всегда, видимо, связано с токсическим эффектом различных по своей структуре веществ и развитие этого процесса не обязательно влечет за собой серьезные последствия для жизнедеятельности клетки. В то же время повреждение клеток, сопровождающееся нарушением проницаемости плазматических мембран, может быть фактором, способствующим активации ПОЛ. Так, в работе Чиарпотто с соавторами (Chiarpotto et al., 1981) показано, что в специально поврежденных клетках скорость ПОЛ при добавлении  $Fe^{3+}$ -АДФ или  $CCl_4$  возрастает в 1,7–3,3 раза по сравнению с неповрежденными клетками за счет, как полагают авторы, увеличения клеточной проницаемости для индукторов ПОЛ. Показано, что соотношение между стимуляцией ПОЛ (накоплением МДА) и количеством поврежденных клеток является линейным.

Особенно интенсивности ПОЛ и состояние эритроцитов у пресноводных и морских рыб описаны в работе Вдзижак и др. (Wdzieczak et al., 1982). Процессы перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности в тканях хрящевых и костистых черноморских рыб показаны Рудневой–Титовой (1995; 1996). Демель и Ктуфф (Demel, Ktuff, 1976) повышение гемолиза в эритроцитах у больных рыб объясняют накоплением в мембранах этих клеток продуктов окисленного холестерина. Нагдалиев и соавторы (1995) отметили, что различные ксенобиотики (ПХБ, ПАУ) достоверно влияют на транспорт ионов и его регуляцию в эритроцитах карпа и леща. Они предполагают, что возрастание активности  $Na^+$ ,  $K^+$ -насоса в эритроцитах леща, подвергнутого многокомпонентному загрязнению водной среды связано с повышенной пассивной проницаемостью мембраны. Снижение активности транспортных ферментов у рыб, считают авторы, является следствием интенсификации ксенобиотиками ПОЛ и последующего нарушения конформационного состояния белков в мембране. Отмечено, что ксенобиотики, находясь длительное время в организме, оказывают влияние на многие физиологические функции, такие как иммунная реакция, осморегуляция и экскреция, созревание половых продуктов и их качество и др. (Weeks et al., 1989; Rise, Weeks, 1995).

Устойчивость водных организмов к стрессам во многом зависит от сбалансированного функционирования защитных систем и, прежде всего, антиоксидантной, участвующей в предотвращении токсических свойств ксенобиотиков (Wenning, Di Giulio, 1988; Winston, Di Giulio,

1991). Известно, что многие свойства мембран, в частности их проницаемость, в сильной степени зависят от состава липидов и их жирных кислот, составляющих бислойную мембрану. При большом содержании полиеновых жирных кислот диффузия веществ через мембрану может идти в 20 раз быстрее, чем в тех мембранах, которые содержат только насыщенные жирные кислоты (Зенгбум, 1982; Нефедова, Рипатти, 1990). Считается, что полиненасыщенные кислоты в биологических мембранах создают особое микроокружение, способствующее функционированию ферментных систем. Изменение микровязкости мембран вызывает изменение многих свойств, в частности степень устойчивости и проницаемости, необходимые для нормального функционирования клетки (Бергельсон, 1975). При стрессе в эритроцитах рыб изменяется транспорт ионов и его гормональная регуляция (Нагдалиев, Котелевцев, 1966), объем эритроцитов зависит от кислородного насыщения, транспорта натрия и аминокислот (Jensen, 1995). При патологических изменениях органов может нарушаться проницаемость клеточных мембран. Эритроциты выполняют функции иммуномодуляторов при токсических поражениях тканей (Конопля, 1995). При действии на карпа солей меди и марганца, установили снижение активности некоторых антиоксидантных ферментов, выполняющих основные защитные функции в организме (Radi, Matkovics, 1988; Zikic et al., 1988). Содержание в организме различных антиоксидантов, например токоферолов, в различных органах неодинаково и зависит от уровня в пище токоферолов, полиеновых жирных кислот, витаминов (Harme, Lie, 1995). Дефицит антиоксидантов приводит к снижению иммунной реакции рыб, а также к уменьшению числа выживших особей при экспериментальном заражении (Obach, Bandin Lanrencin, 1992). Коморкин и Тихомиров (1990), изучая влияние некачественных комбикормов (с повышенным значением перекисного числа) на осмотическую резистентность эритроцитов и заболеваемость личинок и сеголетков карпа в процессе зимовки, отметили снижение осмотической резистентности эритроцитов. Помещенные в физиологический раствор эритроциты разрушались у 70–100% рыб. Замена корма на новый качественный корм снижала тяжесть заболевания. Заметное влияние на проницаемость плазматических мембран эритроцитов рыб оказывают тяжелые металлы, в частности, кадмий (Силкин, Столбов, 1995).

Таким образом, токсические раздражители, попадая в организм рыб, инициируют интенсификацию ПОЛ и ПГЭ. Исходя из этого, нами проведено исследование характера влияния фенола на ПОЛ и ПГЭ у карася.

Уровень ПОЛ при экспозиции карасей в феноле при концентрации 3 мг/л повышался по сравнению с контролем и отличался по интенсивности накопления перекисных продуктов в разных иммунокомпетентных тканях (табл. 42). Химическое загрязнение оказывало свое токсическое воздействие на ткани, органы и организм в целом в зависимости от времени пребывания опытных рыб в токсиканте.

Наиболее негативное токсическое влияние фенола на состояние перекисных процессов у карася зафиксировано в крови и печени к концу

Таблица 42

Интенсивность ПОЛ в тканях караса при экспозиции  
в воде с фенолом (3 мкг/л)

Ткань	Условия опыта	1 сут	4 сут	7 сут	30 сут
Печень	Контроль	34,7 ± 5,1	40,7 ± 11,4	39,8 ± 9,2	40,9 ± 8,8
	Опыт	35,9 ± 7,9	49,9 ± 6,3	84,5 ± 4,8	79,8 ± 7,3
Почка	Контроль	45,8 ± 8,3	43,8 ± 7,9	46,7 ± 8,3	47,2 ± 6,1
	Опыт	46,4 ± 9,3	103,3 ± 11,8	97,8 ± 5,0	106,3 ± 7,7
Селезенка	Контроль	57,7 ± 8,8	58,9 ± 5,0	56,1 ± 7,8	58,4 ± 8,0
	Опыт	58,3 ± 9,1	68,6 ± 10,7	74,4 ± 7,2	75,6 ± 8,3
Кровь	Контроль	37,9 ± 5,7	39,8 ± 8,7	41,4 ± 12,1	42,8 ± 4,6
	Опыт	55,3 ± 10,0	64,4 ± 8,4	78,9 ± 9,8	99,4 ± 8,8

экспозиции. В крови и печени опытных рыб интенсивность перекисных процессов липидов была повышенной на протяжении всего эксперимента, в крови она усилилась по сравнению с контролем на 45,9%, в печени – на 3,3% уже на 1 сутки, тогда как в почке и селезенке в 1 сутки достоверных отличий не выявлено. В крови накопление продуктов перекисного окисления у опытных рыб превышало контроль на 4 сутки на 45,9%, превышение ПОЛ крови в опыте на 7 суток составило 90,5%, а к 30 суткам ПОЛ контроля было выше нормы на 132,2%. В печени интенсивность перекисных процессов превышала контрольный уровень на 4 сутки на 22,6%, а на 7 и 30 сутки опыта накопление МДА у экспериментальных рыб было выше контроля в 2,1 и 1,9 раза, соответственно. В почке интенсивность ПОЛ на 4,7 и 30 сутки была выше нормы соответственно в 2,3, 2,4 и 2,2 раза. Наименьший эффект фенол оказывал на селезенку, в которой накопление МДА было выше контрольного значения на 16,9%, а на 7 и 30 сутки уровень ПОЛ опытных рыб был выше в среднем на 13%.

Результаты нашего опыта свидетельствуют, что повышение перекисных процессов у рыб, содержащихся в растворе фенола, сопровождалось снижением в организме уровня антиоксидантов, выражавшегося в повышении ПГЭ. Отклонение от контроля (табл. 43) интенсивности ПГЭ при экспозиции в феноле зафиксировано на протяжении всего опыта.

Максимум ПГЭ отмечен на 7 сут, а минимум – на 30-е. Обнаруженные изменения интенсивности проявления ПОЛ в тканях и органах и ПГЭ свидетельствует, что под влиянием фенола содержание антиоксидантов у рыб падает. Наиболее сильное снижение было к 7 сут, к 30 сут вследствие ряда адаптивных компенсаторных процессов в организме содержание антиоксидантов увеличилось, но не достигло нормы. Сопо-

Таблица 43

Интенсивность ПГЭ при экспозиции рыб в феноле (3 мг/л)

Срок отбора проб, сут	Контроль	Опыт	t	P
1	12,425 ± 1,048	15,833 ± 0,527	2,371	<0,1
4	14,541 ± 1,362	18,175 ± 1,441	2,199	<0,1
7	13,162 ± 0,625	17,437 ± 1,384	3,121	<0,1
30	13,803 ± 0,459	14,453 ± 0,683	–	–

ставление ПОЛ и ПГЭ, полученных нами на карасях и карпах при воздействии других токсикантов (карбофоса и солей тяжелых металлов), показывает, что организмы рыб на воздействие токсических факторов, независимо от их природы, реагируют изменением свободнорадикальных и перекисных процессов сходным образом (см. гл. III). Во всех вариантах опытов установлено повышение ПОЛ и ПГЭ. Сопоставление результатов исследований ПГЭ с данными анализа лейкоцитарной формулы и хемолюминесцентной активности лейкоцитов позволяет думать, что основная роль в усилении свободно-радикальных процессов принадлежит нейтрофилам, инициирующим образование аутогемолизиннов и токсических производных кислорода. Поскольку в этот период нами отмечено увеличение содержания нейтрофильных гранулоцитов и снижение доли клеток лимфоидного ряда, не исключено, что клетки лимфоидного ряда также играют значительную роль в реализации адаптивных процессов у рыб к фенолу.

Таким образом, исследованиями показано, что иммунная система рыб на воздействие фенола реагирует изменениями структурно-функционального состояния. Они связаны с направлением дифференцировки и синтеза иммунокомпетентных клеток и их функционального состояния, интенсивностью антителообразования и генерацией токсических производных кислорода, перекисного окисления липидов и перекисного гемолиза эритроцитов.



# **РЕАКЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЫБ НА ТЕХНОГЕННОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ВЕРХНЕЙ ВОЛГИ И ЗАКИСЛЕНИЕ ОЗЕР ДАРВИНСКОГО ЗАПОВЕДНИКА**

## **РЕАКЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЫБ НА АВАРИЙНОЕ ПОСТУПЛЕНИЕ СТОЧНЫХ ВОД ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ г. ЧЕРЕПОВЦА**

Рыбы Верхней Волги обитают в разных по степени антропогенного воздействия водоемах. Большинство их подвергается техногенному загрязнению отходами крупных промышленных центров гг. Череповца, Твери, Углича, Рыбинска, Ярославля, Костромы, Кинешмы и т.д. Наибольшая техногенная нагрузка среди водоемов Верхней Волги приходится на Рыбинское водохранилище и на закисленные озера Дарвинского заповедника со стороны крупных промышленных предприятий г. Череповца — прежде всего металлургических и коксохимических, осуществляющих производство минеральных удобрений и других химических продуктов. Экологическая ситуация в Череповце и за его пределами по уровню загрязнения атмосферного воздуха, почв и водных экосистем рек Кошта и Ягорба, считается чрезвычайно сложной (Проект "Волга" в Череповце, 1996). Череповец занимает 8-е место среди 60 индустриальных городов России по суммарному количеству вредных выбросов в атмосферу и сбросов загрязненных вод в водоемы. Основная причина поступления неочищенных сточных вод в Рыбинское водохранилище, — это частые аварии на коксохимическом производстве АО "Северсталь". Катастрофически высокое повышение уровня поступления неочищенных сточных вод промышленных предприятий г. Череповца в Рыбинском водохранилище произошло зимой 1987 года. В водохранилище, особенно на Шекснинском плесе, произошли дестабилизационные процессы структурного состояния биоты и абиоты, а также изменение функциональных характеристик всей системы и отдельных компонентов биологического сообщества. Как следствие катастрофы, произошло насыщение экосистемы различного рода загрязняющими веществами: солями тяжелых металлов, фенолами, нефтепродуктами, полиароматическими углеводами, полихлорированными бифенилами и т.д. (Ершов, 1990; Козловская и др., 1990; Козловская, Герман, 1997; Бисеров и др., 1990; Малинин, Стрельников, 1990; Гагария, 1990; Ривьер, 1990; Романенко и др., 1990). Рыбное сообщество Шекснинского плеса на залповый сброс загрязняющих веществ отреагировало массовой гибелью, перемещением отдельных локальных группировок в нижнюю часть плеса, что привело к снижению численности рыб и плотности ихтиофауны (Малинин, Стрельников, 1990). Пострадало и воспроизводст-

во рыб. Наблюдался абортный выброс икры, смещение процессов созревания половых продуктов, появление особей с резорбцией икры (Володин, 1990). В популяциях рыб отмечено увеличение доли особей с некрозами плавников, язвенным эритродерматитом (Малинин, Стрельников, 1990). Последнее свидетельствует о глубоких нарушениях, происходящих в иммунной системе рыб, выполняющей функцию поддержания биологического постоянства внутренней среды и обеспечения индивидуальной целостности организма в онтогенезе.

Комплексными исследованиями, проведенными нами в год залпового сброса неочищенных сточных вод промышленными предприятиями г. Череповца, определены характер и направление изменений в иммунной системе (Микряков и др., 1990). Реакцию иммунной системы изучали по данным анализа функциональных показателей гуморального иммунитета, состоянию иммунокомпетентных органов, составу лейкоцитов, содержанию токсикантреагирующих антител к фенолу, нафталину. Функциональное состояние гуморальных факторов иммунитета оценивали по бактериостатическим свойствам сыворотки крови (БАСК). На гистологических препаратах исследовали состояние иммунокомпетентных тканей и органов и содержание в них фенола, мышьяка, свинца, а по индексу туловищной почки, селезенки и печени судили об относительной емкости этих органов. Содержание фенол- и нафталинсвязывающих антител в сыворотке крови определяли с целью установления контакта рыб и присутствия в воде фенольных и полиароматических соединений (Микряков и др., 1990). Материал собирали весной, летом и осенью 1987–1988 гг. Большим донным тралом проводили отловы на 5 стандартных станциях: у д. Кабачино (выше г. Череповца), у д. Торова (недалеко от городских очистных сооружений), на ст. Любец и у д. Мяска (на 20 и 45 км соответственно ниже места поступления сточных вод) и на Волжском плесе (в 150 км от г. Череповца). Всего обследовали 406 экз. леща, 34 экз. плотвы, 46 экз. синца, 10 экз. щуки, 16 экз. судака и 10 экз. чехони. Иммуносерологическому анализу подвергали в основном сыворотки крови 5–10-летнего леща, а гистологическому — печень, почку и селезенку леща, синца, плотвы, судака, щуки и чехони. После аварийного поступления отходов промышленных предприятий г. Череповца в водохранилище в иммунной системе рыб произошли существенные изменения. Их характер определяется временем взятия пробы и местом вылова рыб. В селезенке, почках и печени леща, синца и плотвы, выловленных весной 1987 г. у д. Торова и на ст. Любец, выявлены очаговые кровоизлияния, разрушения тканей и клеток. Одновременно в тканях этих органов в большом количестве обнаружены гранулы липофусцина, свидетельствующие об усилении процессов старения и хроническом течении воспалительных процессов. Гистологические препараты леща, плотвы и синца, полученные летом 1987 г., отличались от весенних отсутствием очагов некроза и воспаления. В гранулах липофусцина селезенки, печени и почек установлено присутствие фенола, свинца и мышьяка. Рыбы, выловленные весной, отличались от летних отсутствием свинца и фенола в печени, мышьяка и фенола в почках (табл. 44). В селезенке эти вещества присутствовали постоянно.

Таблица 44

Наличие мышьяка, свинца и фенола в тканях плотвы, леща и синца

Токсикант	Печень			Почки			Селезенка		
	Л	С	П	Л	С	П	Л	С	П
Мышьяк	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+	+/+
Свинец	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Фенол	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

Примечание: Л – лещ, С – синец, П – плотва; перед чертой – весна, после черты – лето.

Это свидетельствует о том, что токсические вещества, поступившие в организм рыб, задерживаются в тканях селезенки на неизвестно долгий срок, тогда как из печени и почек они, видимо, элиминируются. В 1988 г. в почках и селезенке рыб, отобранных у д. Торова, на ст. Любец, у д. Кабачино и в Волжском плесе, отмечалось замещение паренхимы соединительной тканью, разрастание которой происходило, в основном, вокруг липофусциновых гранул. Одновременно в селезенке леща из района д. Торова и ст. Любец обнаружили следы свинца и фенола. Существенных патологических изменений, за исключением лакун с отечной жидкостью, в печени особей из района д. Торова и Волжского плеса не выявлено. Состояние гепатоцитов рыб и их размеры были одинаковыми на всех станциях. К концу 1988 г. рыбы Шекснинского плеса (район поступления отходов промышленных предприятий) отличались от рыб, выловленных выше г. Череповца и в Волжском плесе, более низкими индексами внутренних органов, что свидетельствует об их атрофии, вызванной явлениями цирроза, обусловленного интоксикацией. Данные исследований функционального состояния неспецифических факторов гуморального иммунитета по БАСК не позволили выявить определенной закономерности в характере изменчивости исследуемого показателя у рыб, выловленных из разных мест Рыбинского водохранилища. Если в 1987 г. низкие показатели БАСК выявлены весной только у леща из районов д. Торова и д. Кабачино, летом – д. Кабачино, д. Торова, ст. Любец и Волжского плеса, осенью – Волжского плеса, то в 1988 г. весной низкий уровень БАСК наблюдался у особей Волжского плеса, станций Торова и Кабачино, летом – Торова, осенью – ст. Любец и Волжского плеса.

Независимо от времени взятия пробы БАСК леща из района д. Мякса в 1988 г. имели близкие значения, что, вероятно, обусловлено физиологической и иммунологической однородностью исследуемых рыб. В то же время лещи, выловленные в 1987–1988 гг. (за исключением осенних выборок) вблизи г. Череповца, особенно у д. Торова, отлича-

Таблица 45

Антимикробные свойства сыворотки крови леща

Сезон	Показатели	Станции				
		Кабачино	Торово	Любец	Мякса	Волжский плес
Весна	n	8 10	13 10	10 10	– 10	15 10
	БАСК, %	11,9 ± 5,3 17,0 ± 3,1	18,1 ± 7,4 8,8 ± 4,8	32,8 ± 4,7 69,4 ± 15,2	– 24,7 ± 9,2	43,5 ± 7,2 0
	ИМД, %	37 90	46 50	10 0	– 20	0 100
	ИМР, %	63 10	54 50	90 100	– 80	100 0
	n	10 10	10 10	14 –	– 10	13 10
	БАСК, %	18,3 ± 4,7 36,0 ± 0,0	11,0 ± 5,9 13,1 ± 4,0	20,2 ± 4,1 –	– 30,9 ± 7,0	19,4 ± 6,0 60,4 ± 12,3
Лето	ИМД, %	20 10	60 70	14 –	– 20	23 10
	ИМР, %	80 90	40 30	86 –	– 80	77 90
	n	14 10	11 10	15 10	15 10	15 10
	БАСК, %	29,5 ± 3,7 21,0 ± 3,0	37,9 ± 7,9 23,0 ± 5,9	26,3 ± 2,9 5,6 ± 3,3	28,9 ± 2,3 25,4 ± 3,4	6,6 ± 1,6 17,0 ± 5,8
	ИМД, %	14 18	18 20	0 70	0 10	47 20
	ИМР, %	86 82	82 80	100 30	100 90	53 80

Примечание: n – число рыб, экз.; ИМД – иммунодефицитные особи; ИМР – иммунореактивные особи; сверху – 1987 г., снизу – 1988 г.

лись более низкими величинами БАСК и высокой долей содержания иммунодефицитных особей (табл. 45). Большое число иммунодефицитных особей при низком уровне БАСК в Волжском плесе осенью 1987 г. и весной 1988 г. и на станциях Кабачино и Любец весной и осенью 1988 г. соответственно свидетельствует либо об имевших место миграциях скоплений рыб из районов загрязнения, либо о распространении отходов промышленных предприятий после аварии за пределы Шекснинского плеса при ветровом перемешивании водных масс. Это подтверждается гистологическими исследованиями состояния иммунокомпетентных органов и анализом содержания антител к фенолу и



нафталину. В сыворотке крови леща присутствовали фенол- и нафталинсвязывающие антитела, что указывает на контакт рыб с некоторыми соединениями токсических веществ. В 1987 г. максимальные титры антител в большинстве случаев обнаружены у рыб со ст. Любец. Меньшие титры наблюдались у особей в районах д. Торова и д. Мякса, а в 1988 г. – д. Торова, ст. Любец, д. Мякса, д. Кабачино, т.е. в районах возможного распространения отходов предприятий Череповецкого промышленного узла. Следует отметить, что в 1987 г. антитела к обоим токсикантам в сыворотках крови рыб имели более высокие титры, чем в 1988 г. (табл. 44, 45). Рыбы отличались не только титрами антител, но и числом рефракторных особей, в сыворотке которых фенол- и нафталинсвязывающие антитела отсутствовали. Причем, таких особей в 1988 г. было больше как в районах выше г. Череповца, так и вблизи него. Различие в уровне содержания антител за период наблюдений, свидетельствует либо об их разрушении, либо о прекращении контакта рыб с соединениями фенола и нафталина. Последнее, вероятно, обусловлено отсутствием поступления фенола, нафталина или их соединений в водоем, либо гибелью пораженных рыб. Таким образом, аварийный сброс отходов промышленных предприятий зимой 1987 г. оказал существенное влияние на иммунную систему рыб. Рыбы, обитающие в районе поступления сточных вод и за его пределами, отреагировали снижением функционального состояния неспецифических факторов иммунитета, синтезом неполных антител к фенолу и нафталину, интенсификацией процессов образования пигментов истощения или гранул липофусцина в иммунокомпетентных органах, явлениями цирроза и скоплением в липофусциновых гранулах токсических соединений, в частности, фенола, свинца и мышьяка. Наличие токсических веществ в иммунокомпетентных органах, признаки цирроза печени, снижение индекса внутренних органов (почки, селезенки) рыб следует считать неблагоприятными для сохранения индивидуальной целостности организма и поддержания устойчивости рыб к инфекционным и инвазионным болезням.

#### ОЦЕНКА ОТДАЛЕННЫХ ПОСЛЕДСТВИЙ ВЛИЯНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ИММУННЫЙ СТАТУС РЫБ

В целях оценки последствий влияния сточных вод промышленных предприятий г. Череповца нами проведен анализ состояния иммунной системы леща, плотвы, синца, щуки и судака, выловленных в Волжском, Моложском и Шекснинском плесах Рыбинского водохранилища за период 1987–1998 гг. Состояние иммунной системы рыб оценивали по данным анализа функциональных и структурных показателей. Функциональное состояние иммунной системы тестировали по киллерной функции сыворотки крови, состоянию антиоксидантной системы, содержанию неспецифических иммунных комплексов, интенсивности зараженности эктопаразитами, содержанию токсикантреагирующих антител к полиароматическим углеводородам и фенолу, а структурное – по составу лейкоцитов и ультраструктурному строению иммунокомпетент-

Таблица 46

#### Состояние иммунной системы леща Рыбинского водохранилища

Исследуемый признак	Место вылова рыб, плесы				
	Волжский Шуморов. о-ва	Моложский Первотомайка	Шекснинский		
			Ягорба	Мякса	Любец
БАСК, %	45,60	70,04	30,80	12,50	40,10
ЦИК, усл. ед.	24,0	15,0	25,0	48,0	39,0
Антитела					
к нафталину	1:114	1:68	1:320	1:640	1:160
к фенолу	1:320	1:160	1:640	1:1200	1:260
ПГЭ, %	–	15,5	–	25,8	27,8
ПОД, %	–	13,7	–	33,4	29,0
Частота встречаемости нейтрофилов, %	3,5	2,01	7,2	10,4	3,4
Эозинофилов, %	2,2	1,02	5,04	6,1	6,4

Примечание: антитела выражены в титрах разведения сыворотки крови.

ных клеток тканей и органов. Проведенные исследования показали, что рыбы из Шекснинского плеса Рыбинского водохранилища (районов поступления сточных вод) от таковых из Моложского и Волжского плеса отличались более низкими величинами БАСК, более высоким уровнем содержания циркулирующих иммунных комплексов, токсикантреагирующих антител, перекисного окисления липидов и перекисного гемолиза эритроцитов, частотой встречаемости сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов и цитопатологическими изменениями иммунокомпетентных клеток, тканей и органов (табл. 46).

Лещи, выловленные в Шекснинском плесе, отличались интенсивностью поражения кожи эритродерматитом (краснухоподобной болезнью) и присутствием язв неизвестной этиологии. Анализ частоты встречаемости иммунореактивных (ИМР) (с высоким уровнем БАСК) и иммунодефицитных (ИМД) (сыворотки которых не обладали киллерными функциями по отношению к тест-микроам) особей показал, что доля ИМД рыб в выборках лещей из района Мяксы, Любца и Ягорбы (Шекснинский плес) колебалась в пределах 80, 50 и 60%, соответственно, тогда как в выборках Волжского и Моложского плесов выявлено по 30 и 15% ИМД лещей. Сравнение исследуемых иммунологических признаков за последние 10–15 лет показало, что состояние иммунной системы леща данного района улучшается. Однако у рыб Шекснинского плеса, как свидетельствуют данные частоты встречаемости ИМД особей и доли рыб с высоким уровнем токсикантреагирующих антител (ТРА) к полиароматическим углеводородам (ПАУ) (нафталину и фенолу), этот процесс идет крайне медленно (табл. 47).

Таблица 47

**Динамика изменения доли ИМД с высоким уровнем ТРА особей  
в выборках леща Шекснинского плеса  
Рыбинского водохранилища по годам, %**

Исследуемый признак	1987	1988	1990	1995	1996	1997	1998
ИМД	70,0	30,0	86,0	65,0	85,0	75,0	68,0
ТРА к ПАУ	90,2	70,7	85,0	30,0	58,0	41,0	30,0
ТРА к фенолу	100,0	98,0	68,0	50,5	47,2	27,4	18,9

*Примечание:* ИМД – иммунодефицитные особи; ТРА к ПАУ – токсикантреагирующие антитела к полиароматическим углеводородам.

Высокий уровень частоты встречаемости ИМД особей, а также рыб с дефицитом антиоксидантной системы и цитопатологическими изменениями (автолиз митохондрий, дегрануляции специфических гранул в гранулоцитах и т.д.) в выборках леща Шекснинского плеса по сравнению с таковыми других плесов свидетельствует о том, что условия обитания в данном плесе следует считать относительно неблагоприятными для сохранения индивидуальной целостности организма и поддержания устойчивости рыб к инфекционным болезням. Об этом, в частности, свидетельствуют данные многолетних наблюдений БАСК, отражающей устойчивость рыб к инфекционным комплексам (ЦИК) (табл. 46, 47). Низкие величины БАСК и высокий уровень ЦИК, выявленный нами у рыб из Шекснинского плеса, свидетельствуют о присутствии в воде иммуносупрессивных факторов, отрицательно влияющих на функциональное состояние гуморальных факторов иммунитета.

#### **ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ РЫБ ИЗ ЗАКИСЛЕННЫХ ВОДОЕМОВ ДАРВИНСКОГО ЗАПОВЕДНИКА**

Защелачивание поверхностных вод в результате воздействия кислотных атмосферных осадков изменяет структуру сообществ водных экосистем, включая конечное звено трофической цепи – рыб. Снижение уровня pH в реках и озерах подавляет у рыб интенсивность процессов дыхания, нарушает водно-солевой обмен и кислотно-щелочное равновесие. Ацидные водоемы населены в основном окунем и щукой. Физиолого-биохимические изменения, происходящие в организме этих рыб под воздействием закисления, практически не исследованы. В целях понимания характера реагирования иммунной системы рыб на закисление среды и ее роли в реализации адаптационных процессов нами проведено исследование иммунологического состояния окуней (*Perca fluviatilis* L.), обитающих в озерах Дарвинского заповедника, по БАСК, составу и структуре лейкоцитов, индексам и структурной организации имму-

нокомпетентных органов (Балабанова, Лапирова, 1994; Заботкина, 1999).

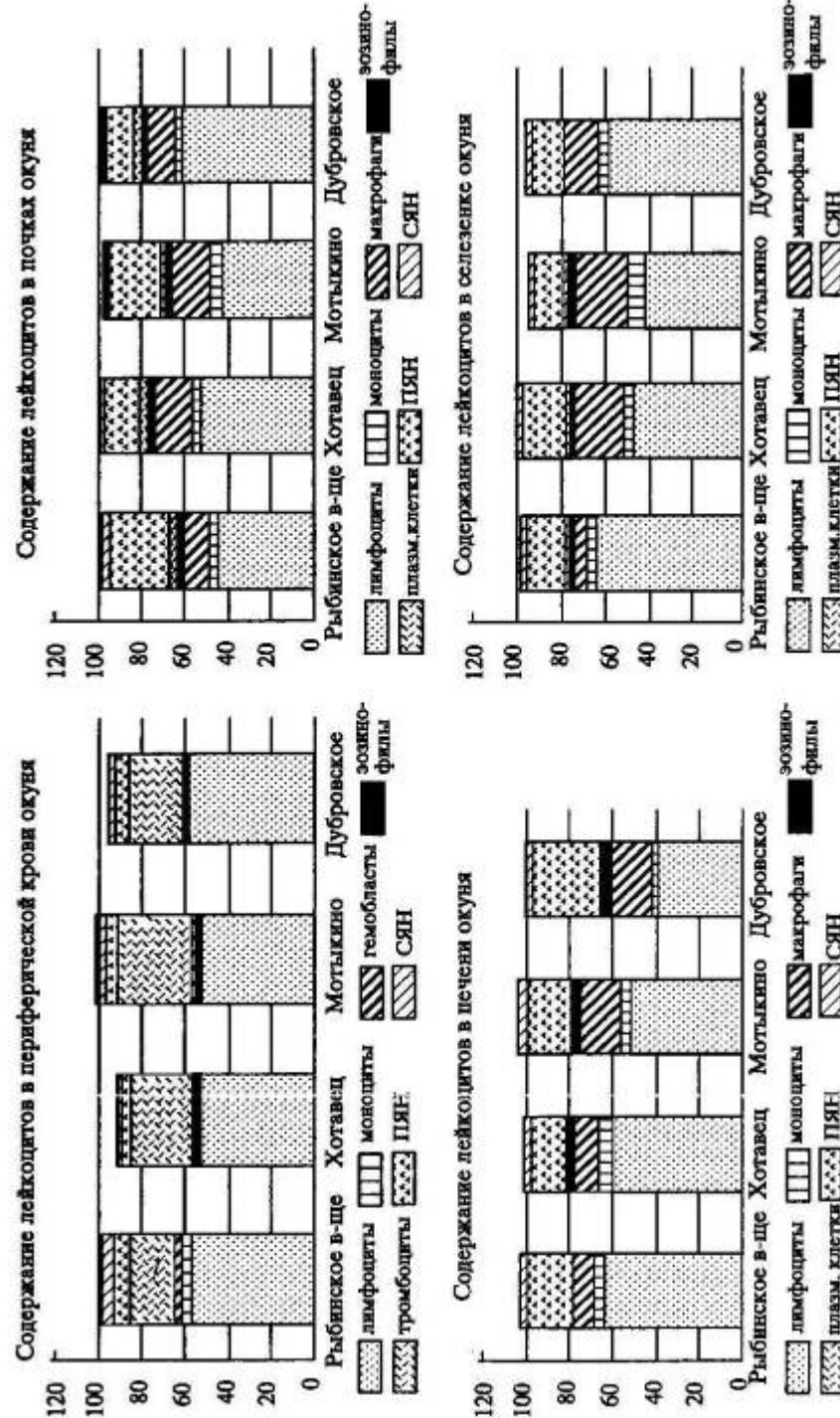
Работа была проведена на 4-х озерах Дарвинского заповедника: нейтральном темноводном (Хотавец), ацидном светловодном (Мотыкино) и ацидных темноводных (Дубровское и Утешково). В течение всего срока наблюдений значения индексов селезенки и печени варьировали в широком диапазоне. Это, вероятно, связано с изменениями физиологического состояния рыб под действием факторов окружающей среды и периодов жизненного цикла.

Как правило, индексы иммунокомпетентных органов у рыб из нейтрального озера были выше. При анализе средних значений этого показателя выявлено отсутствие различий между параметрами рыб из оз. Хотавец и контрольными (из водохранилища): по селезенке 0,12 и 0,13, по печени 1,89 и 1,76 соответственно. Окунь из озера Дубровское и Мотыкино имели достоверно более низкие уровни этих показателей: по селезенке 0,090 и 0,091, по печени 1,29 и 1,14 соответственно.

Таким образом, снижение значений индексов внутренних органов, по-видимому, отражает степень кислотного воздействия на рыб. Средние значения БАСК по озерам различались мало, но были значительно ниже контрольных. Число иммунореактивных (ИМР) особей во всех озерах было почти одинаково и достоверно ниже средних контрольных значений. Эти данные хорошо согласуются с ранее опубликованными о снижении или полном отсутствии БАСК у карпов, содержащихся в кислой среде (Микряков и др., 1984). Изучение состава лейкоцитов окуня из озера с низкими уровнями pH показало, что по ряду рассматриваемых параметров рыбы из озера достоверно отличались от контрольных (рис. 14). Содержание лимфоидных клеток в печени, селезенке и периферической крови было ниже, а в почках – выше, чем в контроле. В клетках макрофагального ряда данная тенденция оказалась сходной во всех изученных органах – содержание этих клеток у окуней из озера было достоверно выше, причем следует отметить, что наиболее низкими были показатели окуней из ацидного темноводного озера.

Это позволяет нам предположить существование адаптационных изменений, в частности, более активную утилизацию поврежденных элементов тканей. Увеличение числа тканевых макрофагов и меланомакрофагальных центров при неблагоприятных условиях среды отмечалось ранее (Naarante et al., 1995). По эозинофилам наблюдалась сходная тенденция. Следует отметить снижение количества нейтрофилов у рыб из озера, исключение составляет содержание их в печени рыб из темноводного ацидного озера, где оно было достоверно выше. Содержание сегментоядерных форм нейтрофилов было выше у рыб из ацидного светловодного озера (кроме селезенки), а у рыб из темноводного ацидного озера было выше, напротив, только в селезенке. Сравнение доли различных типов клеток ретикулолимфоидной ткани окуней, обитающих в водоемах разной кислотности позволяет предположить, что иммунофизиологический статус рыб в закисленных озерах находится в угнетенном состоянии. Об этом свидетельствует и снижение доли лимфоидных клеток, ответственных за синтез антител, и формирова-





ние иммунологической памяти. Увеличение доли эозинофилов отмечалось при развитии местных воспалительных процессов, а также при паразитарном заражении (Пронина, Пронин, 1988). Галина (1993) при исследовании кумжи из закисленных и известковых вод отмечала увеличение относительного количества полиморфноядерных лейкоцитов у рыб из закисленных вод. Изучалась также ультраструктура иммунокомпетентных клеток – лимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов и гранулоцитов. У окуней, выловленных в озерах, малые лимфоциты в основном не отличались по своему тонкому строению от таковых окуней из Рыбинского водохранилища (рис. 15а), только в некоторых клетках рыб из озер наблюдали набухание и разрушение митохондрий (рис. 15б). Летом в некоторых плазматических клетках окуней из оз. Хотавец, а также большинстве этих клеток рыб из озер Мотыкино и Дубровское наблюдали набухшие митохондрии, увеличенные в размерах, внутренняя структура их частично была деградирована, мембраны крист как бы были растворены среди просветленного матрикса (рис. 15г). Особенно сильно эти явления были выражены в незрелых плазматических клетках типа плазмобластов у окуней, выловленных в кислых озерах (рис. 15д). Макрофаги – наиболее крупные клетки из всех изученных. В цитоплазме их содержится, кроме обычных органелл, фагоцитированный материал, часто целые клетки (рис. 16а). В цитоплазме макрофагов окуней из озер Мотыкино и Дубровское встречались митохондрии с деградированной внутренней структурой (рис. 16б). При электронно-микроскопическом исследовании у окуня были ясно различимы 2 типа гранулоцитов, по аналогии с млекопитающими они отнесены к нейтрофилам и эозинофилам. Нейтрофилы у окуней из всех водоемов имели сходное тонкое строение (рис. 16в, г). Эозинофилы этих рыб из всех 3 озер Дарвинского заповедника (в отличие от таковых из водохранилища) (рис. 17а) содержали некоторое количество деградированных гранул, которые увеличивались в размерах, содержимое их становилось рыхлым, а некоторые гранулы были почти полностью опустошены (рис. 17б–г). Нами были отмечены заметные изменения ультраструктуры органелл ряда иммунокомпетентных клеток у рыб из озер Дарвинского заповедника. Наблюдали набухание митохондрий, разрушение крист, просветление матрикса, образование вакуолей в плазматических клетках, что являлось результатом истощения интенсивно функционирующих структур клетки. Как было отмечено рядом авторов (Кондрашова, 1971; Митин, 1967; Мошанский и др., 1971; Струков, Митин, 1971), измененное состояние митохондрий может служить чувствительным показателем состояния клетки, так как между структурой и функциями существует тесная взаимосвязь, и при разрушении их мембран снижается количество синтезируемой АТФ. Деструкция гранул в эозинофилах карпа наблюдалась нами ранее (Балабанова, Заботкина, 1988) как неспецифическая реакция при иммунизации и при содержании рыб

Рис. 14. Содержание иммунных клеток в периферической крови и органах окуня речного *Perca fluviatilis* L.



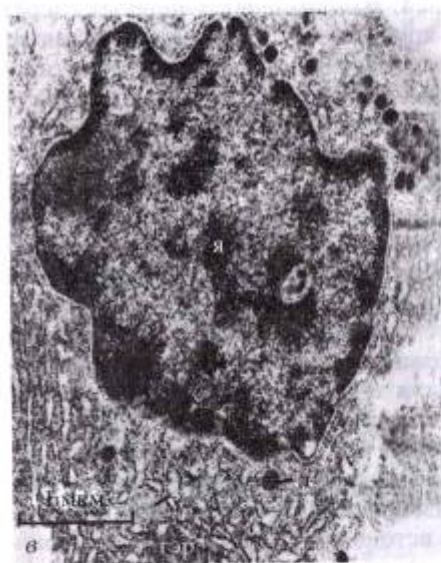
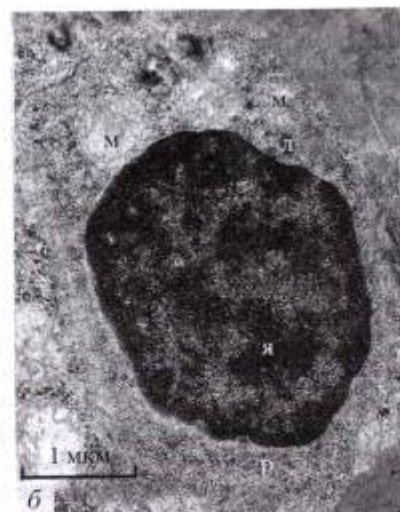


Рис. 15. Ультраструктура малых лимфоцитов и плазматических клеток окуня

а, б – малые лимфоциты окуня из оз. Ховтавец; в – плазматическая клетка окуня из водохранилища; г – плазматическая клетка окуня из оз. Дубровское; д – плазмобласт окуня из оз. Мотыкино. Обозначения те же, что и на рис. 10

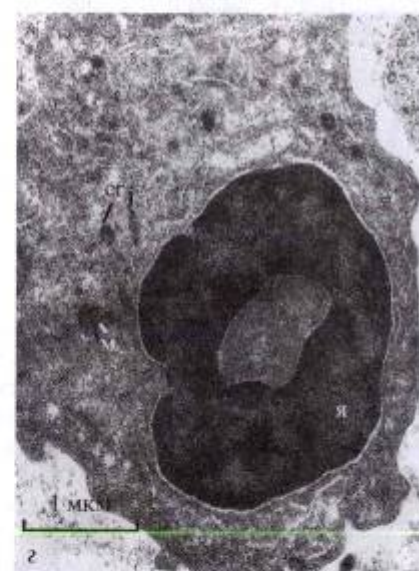


Рис. 16. Ультраструктура макрофагов и нейтрофилов окуня

а – макрофаг окуня из водохранилища; б – макрофаг окуня из оз. Дубровское; в – нейтрофил окуня из водохранилища; г – нейтрофил окуня из оз. Дубровское. Обозначения те же, что и на рис. 10 и 11



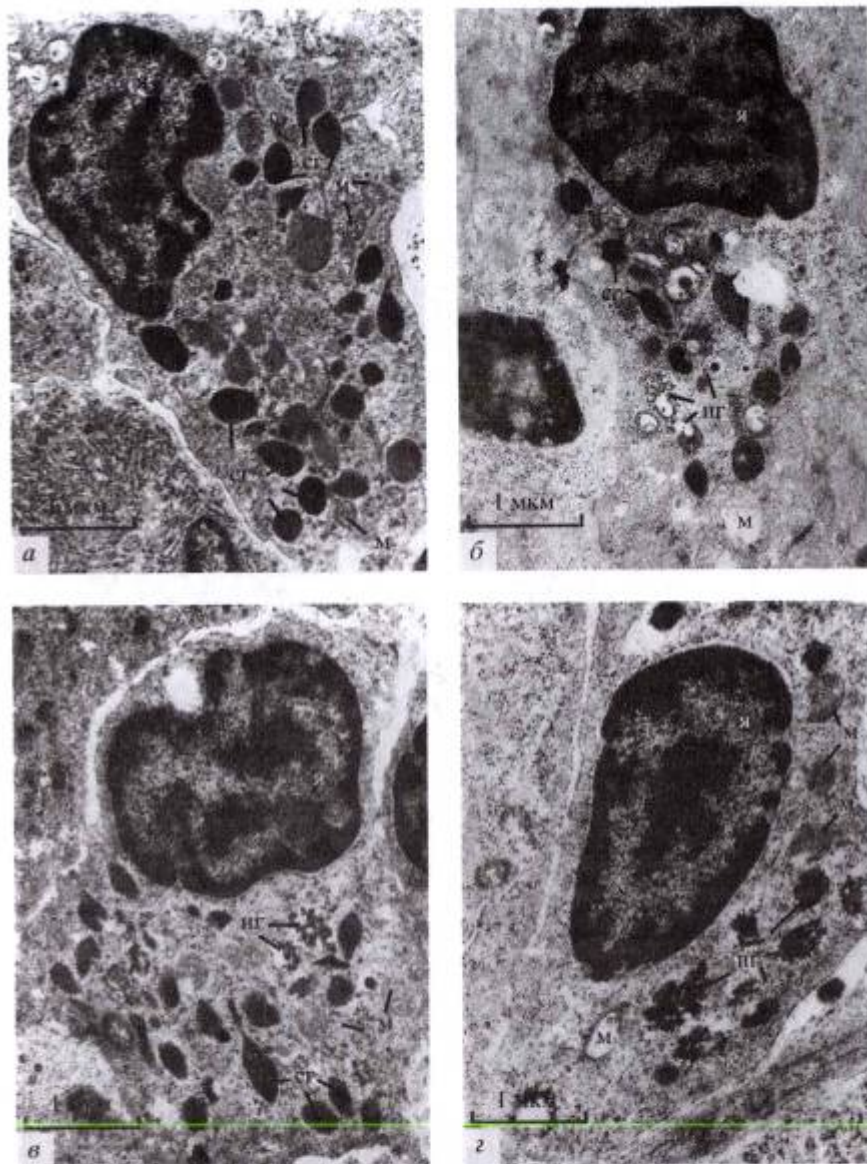


Рис. 17. Ультраструктура эозинофилов окуни

а – эозинофил окуни из водохранилища; б – эозинофил окуни из оз. Хотавец; в – эозинофил окуни из оз. Мотыкино; г – эозинофил окуни из оз. Дубровское. Обозначения те же, что и на рис. 10 и 11

в неблагоприятных условиях, а именно, в декальцинированной среде или при повышенном содержании ионов аммония (Балабанова, 1988, 1989). Возможно, воздействие закисленной воды на окуней является для гранулоцитов стимулирующим фактором, способствующим использованию находящихся в гранулах ферментов в фагоцитозе разрушающихся клеток. По-видимому, этот процесс более интенсивен у окуней из закисленных озер, чем у контрольных рыб.

У окуней из закисленных темноводных озер обнаружено активное выделение секрета гепатоцитов в пространство синусоидов печени (рис. 18 а, б), что позволяет предположить активизацию синтеза липопротеинового комплекса сыворотки крови, поскольку печень является основным местом синтеза альбумина и липопротеидов (Хэм, Кормак, 1983). Это свидетельствует о стрессовом состоянии организма рыб, когда происходит смена углеводного типа обмена на липидный (Панин, 1983), косвенным подтверждением чего можно считать уменьшение количества гликогеновых гранул, как в гепатоцитах печени, так и в полиморфноядерных лейкоцитах. Таким образом, подытоживая данные о воздействии низких рН воды на иммунную систему рыб, можно сделать вывод, что у окуней из озер наблюдается угнетение гуморального звена иммунитета, что проявляется в более низких значениях БАСК и снижении числа иммунореактивных особей по сравнению с контролем. У рыб из озер, особенно кислотных, наблюдаются изменения тонкого строения некоторых органелл (митохондрий лимфоцитов и плазматических клеток и специфических гранул эозинофилов) и структуры печени по сравнению с контролем. Относительная масса печени и селезенки окуней из кислотных озер (Дубровское и Мотыкино) достоверно ниже, чем у рыб из водохранилища. Следует учитывать и тот факт, что в ряде озер с низкими уровнями рН (Утешково, Дубровское) содержание ртути в воде в несколько раз превышает таковое в соседних водоемах. Повышенные концентрации ртути обнаружены и в рыбе из этих озер (Haines, Komov, Jagoe, 1992). По мнению ряда авторов, метилированная ртуть (в такой форме она накапливается в тканях) оказывается более токсичной для организма, чем ее неорганические соединения (Hilmy, Shabana, Saied, 1980). Вероятно, в этом случае следует говорить о сочетанном влиянии низких рН и ртути на организм рыб.

Таким образом, проведенные исследования характера реагирования иммунной системы рыб на техногенное загрязнение воды отходами промышленных предприятий г. Череповца и закисление среды позволили установить разнообразие происходящих в иммунном статусе рыб изменений.

Анализ полученных материалов показал, что у рыб, подвергшихся воздействию техногенного загрязнения и обитающих при низких значениях рН воды, изменяются функциональные и структурные показатели состояния иммунной системы. Независимо от природы возмущающего экологического фактора в популяциях рыб увеличивается доля иммунодефицитных особей по БАСК и с низким уровнем активности киллерных свойств сыворотки крови.



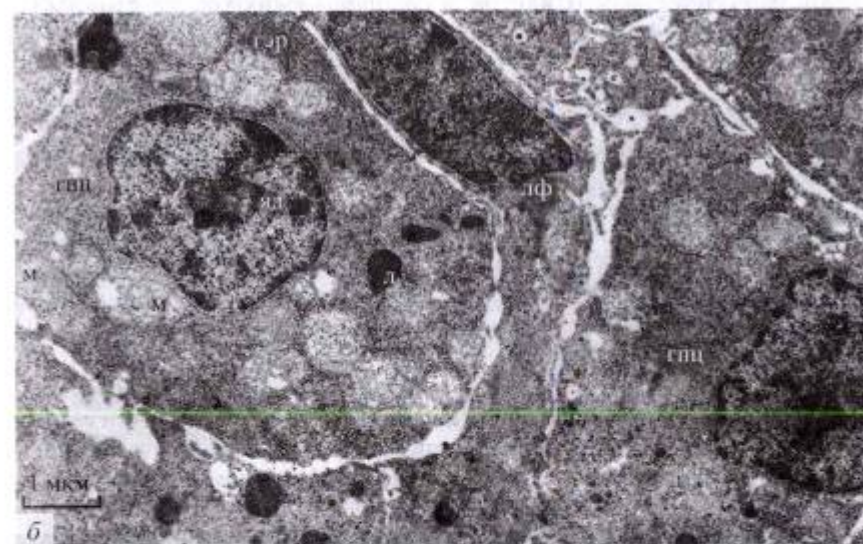
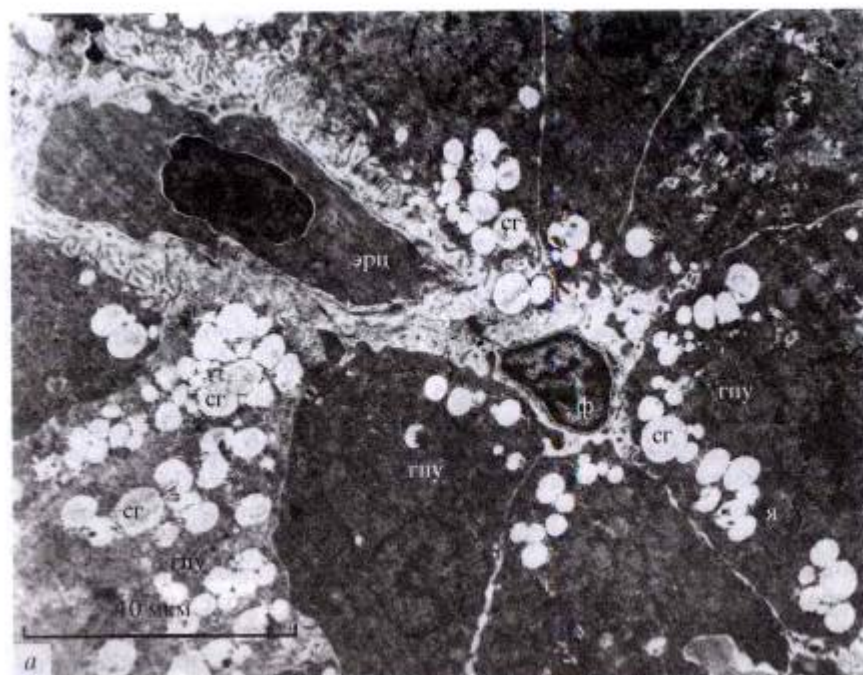


Рис. 18. Структура клеток печени окуня из закисленного и нейтрального озера. а – кислое темноводное озеро. сг – секреторные гранулы; б – кислое светловодное озеро. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2–7

Появление особей с низкими величинами БАСК или без нее свидетельствует о глубоких нарушениях гуморального звена иммунитета, происходящих под влиянием техногенного загрязнения и закисления среды. Вполне вероятно, это обусловлено супрессией синтеза отдельных компонентов гуморальных факторов иммунитета: лизоцима, пропердина, комплемента и других иммунологически активных структур. Не исключено, что это связано с разрушением и деструкцией структур, их вырабатывающих, или переключением функции клеток, осуществляющих синтез неспецифических факторов иммунитета на образование токсикантреагирующих или токсикантнейтрализующих структур.

Исследованиями структурной организации иммунной системы по данным анализа состава лейкоцитов, структурной организации иммунокомпетентных клеток, тканей, органов показано, что под влиянием исследуемых антропогенных факторов нарушается соотношение между отдельными типами клеток, и усиливаются пролиферативные и иммунопатологические процессы. У рыб, обитающих в зоне интенсивного антропогенного воздействия, в составе лейкоцитов изменяется соотношение между лимфоцитами и гранулоцитами, представленными нейтрофилами и эозинофилами: доля лимфоцитов снижается, а нейтрофилов и эозинофилов увеличивается.

У окуней из кислых озер Дарвинского заповедника и у лещей из Шекснинского плеса отмечено повышение доли сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов по сравнению с рыбами, выловленными из нейтральных вод или отдаленных от места поступления сточных вод г. Череповца. Следует отметить, что изменения в составе лейкоцитов у леща Шекснинского плеса были менее значительными, чем у окуней из кислых озер. Сходный характер изменений в составе лейкоцитов рыб нами отмечен у молоди сибирского осетра (Микряков, Лапирова, 1997), двухлетках карпа и караса (Лапирова, в печати) при воздействии на рыб солей тяжелых металлов (ионов кадмия, меди и ртути) и карбофоса в условиях хронического эксперимента.

Обнаруженные в составе лейкоцитов сдвиги свидетельствуют, что рыбы на антропогенные факторы реагируют супрессией лимфопоэза и стимуляцией миелопоэза. Вероятно, это обусловлено изменением темпов дифференцировки клеток лимфоидного, миелоидного и плазматического рядов. Выявленное нами снижение доли содержания лимфоцитов свидетельствует о снижении образования антигенраспознающих структур, осуществляющих надзор за биологическим постоянством внутренней среды и нарушении функции распознавания "своего" и "чужого", приводящей к иммунологической толерантности к тканям собственного организма и интенсификации аутоиммунных процессов. Это подтверждается данными исследований состояния иммуноцитов, тканей и органов лимфомиелоидного комплекса: почек, селезенки и печени, интенсивности перекисного окисления липидов, перекисного гемолиза эритроцитов и образования токсикантреагирующих антител.

В частности, при исследовании ультраструктурной организации иммунокомпетентных клеток выявлены иммуноциты с автолизом митохондрий, дегрануляцией специфических гранул в гранулоцитах. В мак-



рофагах отмечено скопление липофусциновых и меланиновых гранул, а в тканях и органах – усиление процессов лизиса, некроза и цирроза лимфоидной ткани, приводящие к снижению функции иммунной системы. Наиболее яркие изменения в состоянии клеток и тканей выявлены в печени, выполняющей функцию нейтрализации ксенобиотиков, затем в селезенке и почках рыб. Обнаруженные нарушения структуры митохондрий иммуноцитов позволяют предположить снижение кислородзависимой функции клеток и увеличение процессов перекисного окисления липидов у рыб, подвергшихся техногенному загрязнению и закислению среды. Интенсификация образования липофусциновых гранул в иммунокомпетентных тканях и органах и замещения их фибробластами свидетельствуют об усилении процессов старения рыб.

В заключение следует отметить, что под влиянием антропогенных факторов техногенного происхождения в организме рыб нарушается структурно-функциональное состояние как всей иммунной системы, так и ее отдельных компонентов, в частности, клеточных и гуморальных факторов иммунитета. Интенсивность проявления дестабилизационных процессов зависит от силы и происхождения воздействующего фактора. Снижение доли содержания ИМД по БАСК и токсикантреагирующим антителам особей в популяциях рыб Шекснинского плеса Рыбинского водохранилища, обнаруженное нами за последние годы, свидетельствует о снижении техногенной нагрузки со стороны промышленных предприятий г. Череповца на Рыбинское водохранилище и улучшении качества вод.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведено комплексное исследование влияния различных по происхождению антропогенных факторов на структуру и функцию иммунной системы рыб. Полученные данные выявили разнообразные изменения структурных и функциональных показателей иммунной системы рыб, обитающих в присутствии загрязняющих веществ как в условиях эксперимента, так и в зоне поступления сточных вод промышленного узла г. Череповца, а также при низких значениях рН воды.

Определены основные механизмы и закономерности этого процесса. Получены новые данные о характере влияния различных по происхождению антропогенных факторов: фосфорорганических веществ и тяжелых металлов в условиях хронического эксперимента, загрязненных отходами промышленных предприятий г. Череповца вод Рыбинского водохранилища и низких рН воды на структуру и функцию иммунной системы рыб. Показано, что под влиянием токсических факторов нарушается структурно-функциональное состояние иммунной системы, связанное с распознаванием “своего” и “чужого”, защитой организма рыб от чужеродных тел и обеспечением индивидуальной целостности особи на разных этапах онтогенеза в колеблющихся условиях среды обитания.

Изменения, происходящие под воздействием токсических факторов, связаны с де- и рестаблизацией структурно-функционального состояния иммунной системы и усилением иммунопатологических процессов.

Определены размах колебаний иммунологических признаков в ответ на присутствие в воде токсических агентов и факторы, регулирующие интенсивность проявления де- и рестаблизационных процессов.

Сделан вывод, что эти процессы, происходящие в иммунной системе на разных этапах пребывания рыб в растворе токсиканта, отражают развитие общего адаптационного синдрома при стрессе. Показано, что на первых этапах токсического процесса рыбы реагируют дестабилизацией структурно-функционального состояния, затем наступает период стабилизации, а на последнем этапе происходит либо процесс восстановления иммунного статуса, либо его необратимое нарушение.

Интенсивность и направленность происходящих в иммунной системе изменений определяется временем экспозиции, природой и концентрацией токсиканта, тогда как у рыб из Рыбинского водохранилища они зависят от загрязненности воды отходами промышленных предприятий г. Череповца, из Дарвинского заповедника – от рН воды.

Впервые электронно-микроскопическими исследованиями иммунных рыб установлены основные закономерности трансформации ультратонкой структуры иммунокомпетентных клеток при действии токсикантов.

Сравнение полученных материалов позволило установить сходство и различие в характере реагирования иммунной системы рыб на разные токсические факторы. Получены новые данные о синтезе токсикант-реагирующих структур иммунной системой рыб в ответ на присутствие в воде загрязняющих веществ.

Сделан вывод, что материалы исследований могут служить основой при разработке методов оценки качества вод и последствий загрязнения на иммунный статус и состояние здоровья рыб, а также при скрининге пораженных и непораженных токсикантами рыб в экотоксикологических исследованиях.

## ЛИТЕРАТУРА

- Аверьянова О.В., Дубник Л.В., Пушкар В.Я. Перекисное окисление липидов у карпа и белого толстолобика с различными темпами роста // Экологическая физиология и биохимия рыб: Тез. докл. IX Всерос. конф. Ярославль, 2000. Т. 1.
- Адо А.Д. Общая аллергология. М.: Медицина, 1979.
- Азнаурян А.В., Бахшиян М.Э. Макрофаги и лимфоидные клетки в условиях антигенной стимуляции // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. 1985. Т. 88, № 2.
- Алексеева О.Г., Дуева Л.А. Аллергия к промышленным химическим соединениям. М., 1978.
- Алексеев А.В. Роль липидов и продуктов перекисного окисления в биосинтезе и функциональной активности ДНК // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М., 1981.
- Андреева А.И. и др. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. 1988. № 11.
- Антоняк Г.Л. Роль протеолитических ферментов в функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов // Успехи соврем. биологии. 1999. Т. 119, № 5.
- Арцимович Н.Г., Настоящая Н.Н., Казанский Д.Б., Ломакин М.С. Печень как орган иммунобиологической системы гомеостаза // Там же. 1992. Т. 112, № 1.
- Арчаков А.И. Микросомальное окисление. М., 1975.
- Балабанова Л.В. Изменения гранулоцитов карпа под влиянием аммонийного загрязнения // V Всесоюз. конф. по вод. токсикологии: Тез. докл. М., 1988.
- Балабанова Л.В. Морфо-функциональные изменения гранулоцитов карпа в бескальциевой среде // VII Всесоюз. конф. по экол. физиологии и биохимии рыб: Тез. докл. Ярославль, 1989.
- Балабанова Л.В. Влияние кадмия на ультраструктуру иммунокомпетентных клеток мозамбикской тилапии *Oreochromis mossambicus* // Цитология. 1997. Т. 39, № 8.
- Балабанова Л.В. Влияние аммония и декальцинации среды на ультраструктуру гранулоцитов карпа // Там же. 1998а. Т. 40, № 2/3.
- Балабанова Л.В. Влияние тяжелых металлов на ультраструктуру иммунокомпетентных клеток селезенки и почек осетра *Acipenser baeri* Brandt // Биология внутр. вод. 1998б. № 2.
- Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. Ультраструктура клеток иммунной системы карпа *Cyprinus carpio* в норме и при иммунизации // Цитология. 1988. Т. 30, № 6.



Балабанова Л.В., Лапирова Т.Б. Иммунологические характеристики окуня озер Дарвинского заповедника // Структура и функционирование экосистем кислотных озер. СПб., 1994.

Балабанова Л.В., Матей В.Е. Ультраструктура палочковых клеток из различных органов карпа и форели // Цитология. 1987. Т. 29, № 7.

Балабанова Л.В., Степанова В.М. Хроническое действие нафталина и дихлофоса на иммунокомпетентные клетки мозамбикской тилпии // Биология внутр. вод. 2000. № 4.

Балахнин И.А., Куровская Л.Я. Активность комплемента и гидролитических ферментов в сыворотке крови карпа при воздействии аэромонад // Доп. НАН Украины. 1995. Т. 1.

Барбой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи соврем. биологии. 1991. Т. 111. № 2. С. 923-936.

Бейли Н. Статистические методы в биологии. М., 1964.

Бергельсон Л.Д. Биологические мембраны. М., 1975.

Бергельсон Л.Д. Мембраны, молекулы, клетки. М., 1982.

Бернет Ф. Клеточная иммунология. М., 1980.

Бисеров В.И., Гапеева М.В., Цельмович О.Л., Широкова М.А. Ртуть в донных отложениях и макрозообентосе Рыбинского водохранилища // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища Рыбинск, 1990.

Блумберга И.А., Дундуре Б.Л. Фотометрический метод определения лизоцима в интраназальной жидкости // Лаб. дело. 1987. № 8.

Браун А.Д., Метелок Т.П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. Л., 1987.

Бухарин О.В., Васильев Н.В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. Томск, 1974.

Ведемейер Г.А., Мейер Ф.П., Смит Л. Стресс и болезни рыб. М., 1981.

Виноградов Г.А., Гдовский П.А., Матей В.Е. Закисление водоемов и его влияние на метаболизм у пресноводных животных // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., 1979.

Виноградов Г.А., Тагунов В.Б. Установка для изучения влияния различных веществ на рыб и беспозвоночных в проточных условиях // Гидробиол. журн. 1989. Т. 25, № 3.

Вихман А.А. Системный анализ иммунологической реактивности рыб в условиях аквакультуры. М.: Экспедитор, 1996.

Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.

Володин В.М. Состояние воспроизводительной системы и плодовитость рыб в Северо-Шекснинском плесе Рыбинского водохранилища // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск, 1990.

Гагарин В.Г. Мейобентос Шекснинского плеса Рыбинского водохранилища // Там же. 1990.

Галактионов В.Г. Графические модели в иммунологии. М.: Медицина, 1986.

Галактионов В.Г. Очерки эволюционной иммунологии. М.: Наука, 1995.

Галактионов В.Г. Иммунология: Учебник. М.: Изд-во МГУ, 1998.

Галина М.С. Рыбы как объект мониторинга закисления пресноводных экосистем // Пробл. экол. мониторинга и моделирования экосистем. 1993. Вып. 15.

Гаряева У.С. Лимфоидное русло серозной оболочки тонкой кишки некоторых костистых рыб // Тр. Перм. мед. ин-та. 1979. Т. 147.

Головина Н.А., Тромбицкий И.Д. Гематология прудовых рыб. Кишинев, 1989.

Гончаров Г.Д. Лабораторная диагностика болезней рыб. М., 1973.

Гончаров Г.Д., Микряков В.Р. Влияние малых концентраций фенола на антителообразование у карпов // Всесоюз. науч. конф. по вопр. вод. токсикологии: Тез. докл. М., 1968.

Гончаров Г.Д., Микряков В.Р. Влияние малых концентраций фенола на антителообразование у карпа (*Cyprinus carpio*) // Вопросы водной токсикологии. М., 1970.

Грубинко В.В., Леус Ю.В., Арсан О.М. Перекисное окисление липидов в тканях карпа при действии аммиака // Гидробиол. журн. 1996. № 4.

Гулак П.В., Дудченко А.М., Зайцев В.В. и др. Гепатоцит: Функционально-метаболические свойства. М., 1985.

Дудкин С.Н. Биологические и синтетические антиоксиданты как неспецифические адаптогены рыб // II Симпоз. по экол. биохимии рыб: Тез. докл. Ярославль, 1990.

Душкин М.И. Биологическая роль окисленных производных холестерина в клетках млекопитающих // Успехи соврем. биологии. 1991. Т. 111, № 6.

Евтушенко Н.Ю., Малышева Т.Д., Сытник Ю.М., Долинская Г.И. Биохимические реакции организма рыб на действие тяжелых металлов // Всесоюз. конф. "Методология экологического нормирования". Харьков, 1990. Ч. 2.

Еришов Ю.В. Оценка загрязненности воды и грунтов Шекснинского плеса Рыбинского водохранилища битумоидами и нефтепродуктами // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск, 1990.

Заботкина Е.А. Структурно-функциональная трансформация иммунокомпетентных клеток рыб при воздействии антигена, карбофоса и закисления среды: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Борок, 1999.

Заботкина Е.А., Комов В.Т. Сравнительная характеристика клеток печени окуня из озер с различным уровнем рН воды // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1999. Т. 35, № 6.

Заботкина Е.А., Микряков В.Р. Реакция иммунокомпетентных клеток печени карпа на воздействие карбофоса // Докл. РАН. 1997а. Т. 352, № 4.

Заботкина Е.А., Микряков В.Р. Реакция иммунокомпетентных органов карпа на присутствие в воде карбофоса // Итоги научно-практических работ в ихтиопатологии. М., 1997б.

Заварзин А.А. Основы сравнительной гистологии. Л.: Изд-во ЛГУ, 1985.

"Зеленая ветвь" и "Лакокраска": Общественный российский-голландский проект "Волга". Нижний Новгород: Экол. центр "Дракон", 1996.

Зенгбум П. Молекулярная и клеточная биология. М., 1982.

Зимин Н.Л. Иммунофизиологическое состояние карпов при действии полихлоркамфена // Организация мероприятий по борьбе с инфекционными болезнями рыб. Тез. докл. IV Всесоюз. симпоз. по инфекц. болезням рыб. М., 1981.

Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1983.

Иванова Н.Т. Система крови: Материалы к сравнительной морфологии системы крови человека и животных. Ростов н/Д, 1995.

Кагава Я. Биомембраны. М., 1985.

Каграманова Л.К., Еромольева З.В. Сравнительная характеристика методов определения активности лизоцима // Антибиотики. 1966. Т. 11, № 10.

Казлаускене Н., Восилене М. Воздействие сублетальных концентраций меди на физиологические показатели радужной форели // Вопр. ихтиологии. 1995. Т. 35, № 3.

Канаев А.И. Ветеринарная санитария в рыбоводстве М., 1985.

Канаев А.И., Микряков В.Р., Зимин Н.Л. и др. Методические указания по определению уровня естественной резистентности организма рыб (к инфекционным болезням). М.: Борок, 1986.

Каншианов А.Б., Пименов А.М. Каротиноиды как антиоксидантные модуляторы клеточного метаболизма // Успехи соврем. биологии. 1996. Т. 116, № 2.

Кашулин Н.А., Лукин А.А., Амундсен П.-А. Рыбы пресных вод Субарктики как биоиндикаторы техногенного загрязнения. Апатиты, 1999.

Козиненко И.И., Исаева Н.М., Балахнин И.А. Гуморальные факторы неспецифической защиты рыб // Вопр. ихтиологии. 1999. Т. 39, № 3.

Козлов Ю.П. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. М.: Изд-во МГУ, 1973.

Козлов Ю.П. Структурно-функциональные аспекты перекисного окисления липидов в биологических мембранах // Липиды: Структура, биосинтез и функции. М., 1977.

Козловская В.И., Герман А.В. Полихлорированные бифенилы и полиароматические углеводороды в экосистеме Рыбинского водохранилища // Вод. ресурсы. 1997. Т. 24, № 5.

Козловская В.И., Павлов Д.Ф., Чуйко Г.М. и др. Влияние загрязняющих веществ на состояние рыбы в Шекснинском плесе Рыбинского водохранилища // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск, 1990.

Козловская В.И., Флеров Б.А. Фосфорорганические пестициды и их опасность для водных животных // Теоретические вопросы водной токсикологии. Л., 1981.

Козловская В.И., Чуйко Г.М. Холинэстеразы сыворотки крови рыб ссч. Cyprinidae с различной чувствительностью к хлорофосу // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., 1979.

Козловская В.И., Чуйко Г.М., Лапкина Л.Н., Непомнящих В.А. Устойчивость водных животных к фосфорорганическим пестицидам и ее механизмы // Проблемы водной токсикологии, биотестирования и управления качеством воды. Л., 1986.

Комаркин Н.А., Тихомирова Г.И. Влияние комбикормов с окисленным жиром на осмотическую резистентность эритроцитов и заболеваемость карпа в процессе зимовки // Тез. IV Всесоюз. совещ. по рыбохоз. использованию тепловых вод, Курчатова, октябрь, 1990. М., 1990.

Кондрашова М.Н. Градации метаболического состояния митохондрий и реактивность тканей // Митохондрии: Структура и функции в норме и патологии. М., 1971.

Конопля Н.Ф. Эритроциты как иммуномодуляторы при токсических поражениях печени: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Курск, 1995.

Крепс Е.М., Тюрин В.А., Горбунов М.В. и др. Активация перекисного окисления липидов при миграционном стрессе у горбуши: Возможный механизм адаптации // Докл. АН СССР. 1986. Т. 286, № 4.

Крепс Е.М., Тюрин В.А., Челомин В.П. и др. Исследование механизмов инициации перекисного окисления липидов в синапсах мозга морских костистых рыб // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1987. Т. 23, № 4.

Крылов О.Н. Методические указания по гематологическому обследованию рыб в водной токсикологии. Л., 1974.

Кузьмина С.С., Колядинская Е.А. Влияние омайта на кроветворение сеголеток карпа // Тез. докл. II Всесоюз. конф. по рыбохоз. токсикологии. СПб., 1991.

Купер Э. Сравнительная иммунология. М.: Мир, 1980.

Ланге М.А., Потанина Н.В., Хрущев Н.Г. Морфологическое и автордиографическое исследование кроветворных органов личинок ручьевой миноги (*Lampetra planeri*) разного возраста // Журн. общ. биологии. 1990. Т. 51, № 6.

Лапирова Т.Б. Изменения состава иммуноцитов периферической крови карпа под воздействием карбофоса // Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях: XII Рос. науч. конф.: Тез. докл. Челябинск, 1995.

Лапирова Т.Б., Микряков В.Р., Виноградов Г.А. Влияние сублетальных концентраций солей тяжелых металлов на содержание тканевого лизоцима молоди сибирского осетра (*Acipenser baeri* Brandt) // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2000. Т. 37, № 1.

Ларцева Л.В. Гигиеническая оценка по микробиологическим показателям рыбы и рыбных продуктов Волго-Каспийского региона: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1998.

Ларцева Л.В., Зубкова Л.А., Степанова Г.А. и др. Ихтиопатологическая ситуация в дельте Волги // Ветеринария. 1992. № 4.

Латыпова В.З., Перевозников М.А. и др. К разработке принципов ихтиологического мониторинга: Степень ртутного загрязнения экосистем Куйбышевского водохранилища // Влияние антропогенного фактора на экосистему озер. Л., 1990. (Науч. тр. ГосНИОРХ; Вып. 313).

Лебедев А.К., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике. М.: Наука, 1990.

Лебедев К.А., Понякина И.Д. Дискретно-динамический анализ – новый подход к оценке иммунного статуса организма // Итоги науки и техники. Иммунология. М., 1986. Т. 15.

Лебедев К.А., Понякина И.Д., Авдеева В.С. Иммунный статус человека. II. Первые успехи системного подхода // Физиология человека. 1989. Т. 15, № 2.

Лебедев К.А., Понякина И.Д., Нестерина Л.Ф., Иткина Л.Ф. Функциональный подход к оценке иммунного статуса организма: (Применение нагрузочных тестов) // Там же. 1987. Т. 13, № 5.

Лебедева О.А. Влияние антропогенных факторов на ранний онтогенез рыб // Тез. докл. V Всесоюз. конф. по раннему онтогенезу рыб. М., 1991.

Лозовой В.П., Шергин С.М. Структурно-функциональная организация иммунной системы. Новосибирск: Наука, 1981.

Лукьяненко В.И. Токсикология рыб. М.: Пищ. пром-сть, 1967.

Лукьяненко В.И. Иммунобиология рыб. М., 1971.

Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1983.

Лукьяненко В.И. Экологические аспекты ихтиотоксикологии. М., 1987.

Лукьяненко В.И. Иммунобиология рыб: Врожденный иммунитет. М., 1989.

Малинин Л.К., Стрельников А.С. Состояние ихтиофауны Шекснинского плеса Рыбинского водохранилища в 1987–1988 гг. в связи с его загрязнением // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск, 1990.

Малышева Т.Д., Сытник Ю.М. Влияние тяжелых металлов на интенсивность перекисного окисления липидов у самок карпа // Экологическая физиология и биохимия рыб: Тез. докл. IX Всерос. конф. Ярославль, 2000. Т. 2.

Манько В.М., Хаитов Р.М. Макрофаги: Гетерогенность и роль в иммунных реакциях // Успехи соврем. биологии. 1985. Т. 99.

Марков Х.М. Простагландины // Успехи физиол. наук. 1970. Т. 1, № 4.

Машанский В.Д., Комиссарчик Я.Ю., Вишниченко Л.Н. и др. О различных изменениях ультраструктуры митохондрий в связи с функциональными особенностями клетки // Митохондрии: Структура и функции в норме и патологии. М., 1971.



Маянский А.Н. Механизмы рекогносцировочных реакций нейтрофилов // Успехи соврем. биологии. 1986. Т. 102, № 3.

Маянский А.Н. Иммунологические свойства синусоидных клеток печени // Там же. 1992. Т. 112, № 1.

Маянский А.Н., Галиуллин А.Н. Реактивность нейтрофила. Казань: Изд-во Казан. ун-та.

Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск, 1983.

Меньшикова Е.Б., Зелков И.К. Антиоксиданты и ингибиторы радикально-окислительных процессов // Успехи соврем. биологии. 1993. Т. 113.

Меньшикова Е.Б., Зелков И.К. Окислительный стресс при воспалении // Успехи соврем. биологии. 1977. Т. 117, № 3.

Метелев В.В. и др. Экспериментальная водная токсикология // Бюл. Всесоюз. ин-та эксперим. ветеринарии. 1969. Т. 4.

Метелев В.В., Канаев А.И., Дзасохова Н.Г. Водная токсикология. М., 1971.

Методические указания по определению уровня естественной резистентности рыб к инфекционным болезням. М., 1987.

Механизмы иммунопатологии / Под ред. С. Коена и др. М.: Медицина, 1983.

Микряков В.Р. Роль почек карпа в гомеостазе при бактериальном инфицировании // Биология. внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1970.

Микряков В.Р. Актуальные вопросы иммунологии рыб // Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ. Л., 1978.

Микряков В.Р. Закономерности функционирования иммунной системы пресноводных рыб: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1984.

Микряков В.Р. Иммунологические основы контроля последствий влияния антропогенных факторов на рыб // V Всесоюз. конф. по вод. токсикологии: Тез. докл. Одесса, 1988.

Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск, 1991.

Микряков В.Р., Андреева А.М., Лапирова Т.Б., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб Шекснинского плеса после аварии на промышленных предприятиях г. Череповца // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск, 1990.

Микряков В.Р., Балабанова Л.В. Клеточные основы иммунитета у рыб // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л.: Наука, 1979.

Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Силкина Н.И. и др. Функционирование иммунной системы рыб под воздействием биотических и абиотических факторов / ИБВВ АН СССР. Борок, 1991. 93 с. Деп. в ВИНТИ, № 809-В91.

Микряков В.Р., Виноградов Г.А., Клерман А.К. и др. Влияние низких значений pH и углекислого газа на иммунофизиологическое состояние карпов // Физиологические и биохимические аспекты пресноводных животных. Борок, 1984. Деп. в ВИНТИ 23.08.84, № 1637-84.

Микряков В.Р., Гончаров Г.Д., Романенко В.И., Трофимова Л.В. К изучению механизма иммунитета рыб // Флора, фауна и микроорганизмы Волги. М.: Рыбинск, 1974.

Микряков В.Р., Лапирова Т.Б. Влияние солей некоторых тяжелых металлов на картину белой крови молоди сибирского осетра *Acipenser baeri* Brandt // Вопр. ихтиологии. 1997а. Т. 37, № 4. С. 538-542.

Микряков В.Р., Лапирова Т.Б. Влияние карбофоса на картину белой крови карпа // Итоги научно-практических работ в ихтиопатологии: Информ. бюл. М., 1997б.

Микряков В.Р., Половков Д.В. Экспериментальное исследование влияния некоторых гербицидов на гуморальные факторы иммунитета карпа // Там же. 1997.

Микряков В.Р., Полякина И.Д., Лебедев К.А. и др. Анализ лейкоцитов крови для скрининга рыб в популяционно-экологических исследованиях на примере караса *Carassius carassius* // Вопр. ихтиологии. 1992. Т. 32, № 5.

Микряков В.Р., Силкин Н.Ф., Силкина Н.И. Антимикробные свойства сыворотки крови рыб // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., 1979.

Микряков В.Р., Силкина Н.И. Оценка последствий резорбции икры на иммунофизиологическое состояние самок леща (*Abramis brama* L.) Рыбинского водохранилища // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: Материалы II(XXV) Междунар. конф. Петрозаводск, 1999. С. 255-257.

Микряков В.Р., Степанова В.М. Влияние митогенов на лимфоциты карпа (*Cyprinus carpio* L.) // Иммунология. 1983.

Микряков В.Р., Флеров Б.А. Картина крови карпа при хронической фенольной интоксикации: Информ. бюл. ИБВВ АН СССР. Борок, 1971.

Митин К.С. Структура митохондрий в норме и патологии // Митохондрии: Биохимия и морфология. М., 1967.

Наздалиев Ф.Ф., Котелевцев С.В. Изменения транспорта ионов и его гормональная регуляция в эритроцитах рыб при стрессе // Вопр. ихтиологии. 1966. Т. 36, № 1.

Наздалиев Ф.Ф., Котелевцев С.В., Козловская В.Н., Герман А.В. Влияние ксенобиотиков на транспорт ионов и его адренергическую регуляцию в мембранах эритроцитов леща *Abramis brama* и карпа *Cyprinus carpio* // Там же. 1995. Т. 35, № 3.

Немова Н.Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск, 1996.

Нефедова З.А., Рипатти П.О. Липиды оболочки икры на некоторых этапах эмбриогенеза лосося // Биохимия экто- и эндотермных организмов в норме и при патологии. Петрозаводск, 1990.

Нормальное кроветворение и его регуляция. М.: Медицина, 1976.

Окориков А.Н., Федоров Н.Е. Перекисное окисление липидов и некоторые показатели метаболизма коллагена и липопротеидов у больных хроническим гепатитом и циррозом печени // Заболевания печени и желчевыводящих путей. М., 1982.

Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. Новосибирск, 1983.

Пестова И.М., Четвертных В.А. Морфофункциональная организация иммунопоза в эволюции // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. 1990. Т. 99, № 11.

Петров Р.В. Иммунология. М.: Медицина, 1982.

Петров Р.В., Лапухин Ю.М., Череев А.Н. и др. Оценка иммунного статуса человека: Метод. рекомендации. М., 1984.

Покровский Б.И., Авербах М.М., Литвинов В.И., Рубцов И.В. Приобретенный иммунитет и инфекционный процесс. М., 1979.

Попов А.В. Хемилюминесценция лейкоцитов карпа в опыте с карбофосом // Тез. докл. Междунар. конф. "Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера". Петрозаводск, 1995.

Попов А.В., Микряков В.Р. Функциональное состояние лейкоцитов карпа при экспериментальном загрязнении воды кадмием // Тез. докл. II Междунар. конф. "Биологические основы изучения, освоения и охраны животного и растительного мира, почвенного покрова Восточной Финляндии". Петрозаводск, 1999.

Попов А.В., Микряков В.Р. Сравнительное исследование функционального состояния лейкоцитов караса (*Carassius carassius* L.) при загрязнении воды

фенолом и нафталином // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре: Тез. докл. М., 2000.

Попов А.В., Половков Д.В., Микряков В.Р. Динамика содержания неспецифических иммунных комплексов в организме леща озера Неро // Итоги научных практических работ в ихтиопатологии: Информ. бюл. М., 1997.

Попова Г.В. Реакция гидробионтов на загрязнение. М.: Медицина, 1982.

Проект "Волга" в Череповце. Нижний Новгород, 1966.

Пронина С.В., Пронин Н.М. Взаимоотношения в системах гельминт-рыбы. М., 1988.

Ривьер И.К. Влияние стоков г. Череповца на зоопланктон Шекснинского плеса // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск, 1990.

Романенко В.И., Захарова Л.И., Романенко В.А. и др. Оценка качества воды по микробиологическим показателям в Рыбинском водохранилище у г. Череповца // Там же. 1990.

Руднева-Титова И.И. Липидный состав и перекисное окисление липидов в сыворотке крови хрящевых и костистых рыб Черного моря // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1995. Т. 31, № 1.

Руднева-Титова И.И. Соотношение процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности в тканях черноморской мидии // Гидробиол. журн. 1996. № 5.

Руднева-Титова И.И. Формирование антиоксидантной системы в раннем онтогенезе морских животных // Успехи соврем. биологии. 1997а. Т. 117, № 3.

Руднева-Титова И.И. Эколого-физиологические особенности активности некоторых антиоксидантных ферментов и содержания антиоксидантов в тканях хрящевых и костистых рыб моря // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1997б. Т. 33, № 1.

Румянцев Н.Н. О ретикуло-эндотелии и строении кроветворных органов некоторых видов костистых рыб // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. 1939. Т. 21, № 2.

Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М.: Медгиз, 1960. 254 с.

Силкин Ю.А., Столбов А.Я. Воздействие хлорида кадмия на внешнее дыхание и катионную проницаемость эритроцитов черноморской скорпены *Scorpena roscus* L. // Гидробиол. журн. 1995. Т. 31, № 5.

Смирнова О.В., Кузьмина Т.А. Определение бактерицидной активности сыворотки методом нефелометрии // Журн. микробиологии. 1966. № 4.

Справочник по болезням рыб / Под ред. В.С. Осетрова, Л.И. Грищенко. М., 1983.

Степанова В.М., Павлов Д.Ф., Чуйко Г.М. Хроническое действие кадмия и ДДВФ на ретикулолимфоидную ткань мозамбикской тилапии // Тез. докл. VIII Всесоюз. конф. по экол. физиологии и биохимии рыб: Тез. докл. Петрозаводск, 1992. Т. 2.

Степанова В.М., Чуйко Г.М., Павлов Д.Ф. Морфологическая структура периферической крови мозамбикской тилапии (*Oreochromis mossambicus*, Peters) при адаптации к хроническому действию токсических веществ // Тез. докл. VIII Всесоюз. конф. по экол. физиологии и биохимии рыб. Петрозаводск, 1992.

Степанова В.М., Чуйко Г.М., Павлов Д.Ф. Хроническое действие кадмия на клетки ретикулолимфоидной ткани селезенки и периферической крови мозамбикской тилапии (*Oreochromis mossambicus*, Peters) // Биология внутр. вод. 1998. № 3.

Строганов Н.С. Проблемы водной токсикологии в свете экологической физиологии // Гидробиол. журн. 1967. Т. 3, № 5.

Струков А.И., Митин К.С. Митохондрии гипертрофированного сердца человека // Митохондрии: Структура и функции в норме и патологии. М., 1971.

Субботкина Т.А. Активность лизоцима в тканях осетра и белуги в приплотинной зоне Волгоградской ГЭС // II Симпоз. по экол. биохимии рыб: Тез. докл. Ярославль, 1990.

Суворов Е.К. Основы ихтиологии. Л., 1948.

Сура В.В., Насонов Е.Л., Борисов И.А. и др. // Терапевт. арх. 1980. № 12.

Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. М., 1975.

Фарапонтов М.Г. Нарушение окислительных процессов в митохондриях печени при длительном поступлении в организм соединений свинца // Метаболическая регуляция физиологического состояния: Тез. докл. Всесоюз. симпозиум. Пушчино, 1984.

Флеров Б.А. Влияние малых концентраций фенола на двигательную, пищевую активность и прирост живого веса карасей // Вопр. ихтиологии. 1965. Т. 5, № 1(34).

Флеров Б.А. К вопросу о приспособлении гидробионтов к токсическому фактору // Гидробиол. журн. 1971. Т. 7, № 6.

Флеров Б.А. Экспериментальное исследование фенольного отравления рыб // Влияние фенола на гидробионтов. Л., 1973.

Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. Л., 1989.

Флеров Б.А. Экологическая обстановка на Рыбинском водохранилище в результате аварии на очистных сооружениях г. Череповца в 1987 г. // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск, 1990.

Флеров Б.А., Виноградов Г.А., Козловская В.И. и др. К вопросу о механизме действия некоторых токсических веществ у водных животных // Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ. Л., 1978.

Флеров Б.А., Микряков В.Р., Куперман Б.И. Инвазионные и инфекционные процессы у рыб при токсическом воздействии // Гельминты в пресноводных биоценозах. М., 1982.

Флоренсов В.А., Пестова И.М. Очерки эволюционной иммуноморфологии. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1990.

Хэм Ф., Кормак Д. Гистология. М., 1983. Т. 2, 5.

Чистяков Г.К. Фенол // Допустимые концентрации ядовитых веществ в водоемах. М., 1941.

Шлейфер Г.С. Влияние ионизирующей радиации на некоторые показатели иммунитета у рыб // Информ. бюл. ИБВВ. 1976. № 32.

Шлейфер Г.С. Влияние ионизирующей радиации на иммунофизиологическое состояние рыб: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1978.

Шлейфер Г.С., Дохолян В.К. Физиологические и иммунологические особенности реакции рыб на изменение среды обитания // Экологическая физиология и биохимия рыб: Тез. докл. IV Всесоюз. конф. Астрахань, 1979. Т. 1.

Шлейфер Г.С., Шеханова И.А. Влияние ионизирующей радиации на некоторые факторы иммунитета у рыб // Радиэкология животных. М., 1977.

Шубик В.М. Проблемы экологической иммунологии. М., 1976.

Ястигискиене Р.М., Лубянкевич В.М. Лизоцимная активность бактерий пищеварительного тракта карпа // Вопросы экологии и поведения животных. Вильнюс, 1986.

Agius C., Roberts R.J. Effects of starvations on the melanomacrophage centres of fish // J. Fish Biol. 1981. Vol. 19, № 1.

Anderson D.P. Fish immunology // Diseases of fishes. Hong Kong, 1974. Vol. 4.



- Anderson D.P. Immunological indicators: Effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks // Amer. Fish. Soc. Symp. 1990. Vol. 8.
- Ardavin A.D., Zapata A.G. Ultrastructure and changes during metamorphosis of the lymphohaemopoietic tissue of the larval anadromous sea lamprey *Petromyzon marinus* // Develop. and Comp. Immunol. 1987. Vol. 11.
- Arroosh M.R., Clemons E.H., Sanborn H.R. et al. Leucoproliferative response of splenocytes from tonglich sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to chemical contaminants // Environ. Toxicol. and Chem. 1996. Vol. 15, № 7.
- Blaxhall P.C. Electronmicroscope studies of fish lymphocytes and thrombocytes // J. Fish Biol. 1983. Vol. 22, № 2.
- Chakraborty A., Brattacharjee S., Chatterjee M. Effects of vanadium salts on lipid peroxidation, GSH levels and catalase activity in Indian catfish, *Clarius batrachus* (L.) // Philipp. J.Sci. 1994. Vol. 123, № 3.
- Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs // Physiol. Rev. 1979. Vol. 59, № 3.
- Chiarpotto E., Olivero J., Albano E. et al. Studies on lipid peroxidation using whole liver cells // Experientia. 1981. Vol. 37, № 4.
- Chisari F.V. // Cell. Immunol. 1980. Vol. 52.
- Clawson C.C., Finstad J., Good R.A. Evolution of the immune responses. V. Electron microscopy plasma cells and lymphoid tissue of the paddle fish // Lab. Invest. 1966. Vol. 15.
- Clem L.W., Ford L.A. et al. Humoral and cellular adaptive immune mechanisms in teleosts // Aquaculture and fish health. Rybnoe, 1998.
- Demel R.A., Kluff B. // Biochim. et biophys. acta. 1976. Vol. 457, № 2.
- Dunier M. Effects des pesticides et des métaux lourds sur le système immunitaire de la carpe *Cyprinus carpio* // Ichtyol. acta. 1991.
- Eldridge E.F. Phenolis wastes: Rep. N 1 // J. Amer. Water Works Assoc. 1936. Vol. 28.
- Ellis A.E. Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice *Pleuronectes platessa* L. // J. Fish Diseases. 1980. Vol. 3.
- Ellis A.E. Ontogeny of the immune system in teleost fish // Fish vaccination. 1988.
- Espenes A., Press C.M.L., Dannevig B.H., Landsverk T. Investigation of the structural and functional features of splenic ellipsoids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Cell and Tissue Res. 1995. Vol. 279, № 3.
- Ewing M.S., Ewing S.A., Zimmer M.A. Sublethal cooper stress and susceptibility of chennal catfish to experimental infections with *Ichthyophthirius multifiliis* // Bull. Environ. and Contam. Toxicol. 1982. Vol. 28, № 6.
- Fänge R. A comparative study of lymphomieloid tissue in fish // Develop. and Comp. Immun. 1982. Vol. 6, suppl. 2.
- Fänge R. Lymphomieloid tissues in fishes // Vid. medd. dan.naturhist. fören. 1984. Vol. 145.
- Fänge R., Mattison A. The lymphmyeloid (hemopoietic) system of the Atlantic nurse shark, *Ginglymostoma cirratum* // Biol. Bull. 1981. Vol. 160, № 2.
- Fänge R., Nilsson S. The fish spleen: Structure and function // Experientia. 1985. Vol. 41, № 2.
- Fänge R., Sundell G. Lymphomieloid tissues, blood cells and plasma proteins in *Chimaera monstrosa* (Pisces, Holocephali) // Acta zool. 1969. Vol. 50, P. 155.
- Fiho W.D. Fish antioxidant defences: A comparative approach // Brazil. J. Med. and Biol. Res. 1996. Vol. 29, № 12.
- Finco-Kent D., Thune R.L. Phagocytosis by catfish neutrophils // J. Fish Biol. 1987. Vol. 31, suppl. A.
- Gambarian S.P. Kidney morphology in sturgeons: A microdissectional and structural study // Ibid. 1988. Vol. 33, № 3.
- Good R.A., Finstad J., Pollare B., Gabrielsen A.E. Morphological studies on the evolution of the lymphoid tissue among the lower vertebrates // Philogeny of immunity. Gainesville, 1966.
- Good R.A., Finstad J., Pollare B., Gabrielsen A.E. Morphological studies on the evolution of the lymphoid tissue among the lower vertebrates // Philogeny of immunity. Gainesville, 1977.
- Haaparanta A., Valtonen E.T., Hoffmann R., Holmes J. Do macrophage centres in freshwater fishes reflect the differences in water quality // Aquatic Toxicol. 1995. Vol. 1.
- Haines T.A., Komov V.T., Jagoe C.H. Lake acidity and mercury content of fish in Darwin National Reserve, Russia // Environ. Pollut. 1992. Vol. 78.
- Harme K., Lei D. L-Tokopherol levels in different organs of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) – effect of smoltification, dietary levels of polyunsaturated fatty acids and vitamin E // Comp. Biochem. and Physiol. 1995. Vol. 111, № 4.
- Hart S., Wrathmell A.B., Harris T.E., Doggett T.A. Gut-associated lymphoid tissue (GALT) in the common goldfish *Scyllorhinus canicula* L., an ultrastructure study // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 1987. Vol. 67, № 3.
- Herraez M.P., Zapata A.G. Structure and function of the melanomacrophage centres of the goldfish *Carassius auratus* // Vet. Immunol. and Immunopathol. 1986. Vol. 12, № 1/4.
- Hilmy A.M., Shabana M.B., Saied M.M. Blood chemical levels after acute and chronic exposure to  $HgCl_2$  in fish *Aphanius dispar* // Water, Air and Soil Pollut. 1980. Vol. 17.
- Hine P.M., Wain J.M. Ultrastructural and cytochemical observations on the granulocytes of the sturgeon, *Acipenser brevirostrum* (Chondrostei) // J. Fish Biol. 1988. Vol. 33, № 2.
- Hinton D.E., Pool C.R. Ultrastructure of the liver in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) // Ibid. 1976. Vol. 8.
- Hogberg J., Moldeus P., Arborg B. et al. The consequences of lipid peroxidation in isolated hepatocytes // Europ. J. Biochem. 1975. Vol. 59, № 2.
- Holmberg G., Jensen S., Larsson A. et al. Metabolic effects of technical pentachlorophenol (PCP) on the el *Anguilla anguilla* L. // Comp. Biochem. and Physiol. B. 1972. Vol. 43.
- Holme J.A., Wirth P.J., Dybing E. et al. Cytotoxic effects of N-hydroxyparacetamol in suspensions of isolated rat hepatocytes // Acta pharmacol. et toxicol. 1982. Vol. 51, № 2.
- Jensen F.B. Regulatory volume decrease in carp red blood cells: Mechanisms and oxygenation dependency of volume-activated potassium and amino acid transport // J. Exp. Biol. 1995. Vol. 198, № 1.
- Kappus H., Sies H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism redox cycling and lipid peroxidation // Experientia. 1981. Vol. 37, № 12.
- Khangarot B.S., Roy P.K., Singh K.P. Influence of copper treatment on the immune response in an air-breathing teleost, *Saccobranchius fossilis* // Bull. Environ. Contam. and Toxicol. 1988. Vol. 41, № 2.
- Kon Y., Hashimoto Y., Kitagawa H., Kudo N. Morphological and immunohistochemical studies of juxtaglomerular cells in the carp // Jap. J. Vet. Sci. 1987. Vol. 49, № 2.
- Kunio Y. Lipid peroxides in biology and medicine. N.Y.: Acad. press, 1982.
- Lebedev K.A., Ponjakina I.D. A systems approach to the assessment of human immune status // Sov. Med. Rev. D. Immunol. 1989. Vol. 2.
- Leeman M.G., Brindley W.A. Effect of toxic agents upon fish immune systems: A review // Immunol. Considerations Toxicol. 1981. Vol. 6.
- Legler D.W., Evans E.E., Dupree H.K. Comparative immunology serum complement of freshwater fishes // Trans. Amer. Fish Soc. 1967. Vol. 96, N 3.

Makherjee D., Bhattacharya S., Kumar V., Moitra J. Biological significance of [<sup>14</sup>C]-phenol accumulation in different organs of a murrelet *Channa punctatus*, and the common carp, *Cyprinus carpio* // *Biomed. Environ. Sci.* 1990. Vol. 3.

Makherjee D., Guha D., Kumar V., Chakabarty S. Impairment of steroidogenesis and reproduction in sexually mature *Cyprinus carpio* by phenol and sulfide under laboratory conditions // *Aquat. Toxicol.* 1991. Vol. 21.

March P.E., Reisman H.M. Seasonal changes in hepatocyte ultrastructure correlated with the cyclic synthesis of secretory proteins in the winter flounder (*Pleuronectes americanus*) // *Cell and Tissue Res.* 1995. Vol. 281. N 1.

Marchalonis J.J. Immunity in evolution // Cambridge. 1977.

Meseguer J., Esteban M.A., Ayala A.J. et al. Granulopoiesis in the head-kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): An ultrastructural study // *Arch. Histol. Cytol.* 1990. Vol. 53. № 3.

Micalt V., Perdicchizzi F. A quantitative and histochemical study on melanomacrophage centres in the spleen of the teleost fish *Diplodus annularis* L. // *J. Fish Biol.* 1990. Vol. 37. № 2.

Mock A., Peters G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, stressed handling, transport and water pollution // *Ibid.* 1990. Vol. 37. № 6.

Muller L. Influence of paracetamol (acetaminophen) on cadmium-induced lipid peroxidation in hepatocytes from starved rats // *Toxicol. Lett.* 1983. Vol. 15. № 2/3.

Nakao M., Yano T. Characterization of the classical complement pathway of rainbow trout // *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 1988. Vol. 33. N 1.

Obach A., Bandin Lanreicin F. Effects of dietary oxidized fish oil and deficiency of anti-oxidants on the immune response of turbot *scophthalmus maximus*: Pap. of IV Intern. collig. pathol. mar. aquacult. (PAMAQ IV), Vigo, 17–21 Sept., 1990. // *Aquaculture.* 1992. Vol. 107. N 2/3.

O'Neill J.G. The humoral immune response of *Salmo trutta* (L.) and *Cyprinus carpio* (L.) exposed heavy metals // *J. Fish Biol.* 1981. Vol. 19. № 3.

Page M., Rowley F. The reticulo-endothelial system of the adult river lamprey, *Lampetra fluviatilis* (L.): The fate of intrascularily injected colloidal carbon // *J. Fish Diseases.* 1984. Vol. 7. № 5.

Pulsford A., Fange R., Morrow W.J.W. Cell types and interactions in the spleen of the dogfish *Scyliorhinus canicula* L.: An electron microscopy study // *J. Fish Biol.* 1983. Vol. 21. № 6.

Pulsford A.L., Lemaire-Gony S., Farley S. Effects of stress on the immune system of fish // *Water quality and stress indicators in marine and freshwater systems: Linking levels of organization.* 1994.

Quesada J., Villena M.J., Aquileiro B. Structure of the spleen of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A light and electron microscopy study // *J. Morphol.* 1990. Vol. 206.

Radi A.R., Matkovics B. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, proteins contents and lipid peroxidation of carp tissues // *Comp. Biochem. and Physiol.* 1988. Vol. 906. N 1.

Riely C.A., Cohen G., Lieberman M. Ethane evolution: A new index of lipid peroxidation // *Science.* 1974. Vol. 183. N 4121.

Rijkers G.T. Kinetics of humoral and cellular immune reactions in fish // *Develop. and Comp. Immunol.* 1982. Suppl. 2.

Rise C.D., Weeks B.A. The influence of in vivo exposure reactive oxygen formation in oyster toadfish macrophages // *Arch. Environ. Contam. and Toxicol.* 1995. Vol. 19. N 6.

Roales R.R., Perlmuter D.J. The effects of sublethal doses of methylmercury and copper, applied singly and jointly, on the immune response of the blue gourami to viral and bacterial antigens // *Ibid.* 1977. Vol. 5.

Robohm R.A. Paradoxal effects of cadmium exposure on antibacterial antibody responses in two fish species: Inhibition in cunners (*Tautoglabrus adspersus*) and enhancement in striped bass (*Morone saxatilis*) // *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 1986. Vol. 12.

Rocha E., Monteiro R.A.F., Pereira C.A. The liver of the brown trout: A light and electron microscope study // *J. Anat.* 1984. Vol. 185. № 2.

Rocha E., Monteiro R.A.F., Pereira C.A. Presence of rodlet cells in the intrahepatic biliary ducts of the brown trout, Linnaeus, 1758 (Teleostei, Salmonidae) // *Canad. J. Zool.* 1994. Vol. 72. № 9.

Rocha E., Monteiro R.A.F., Pereira C.A. Microanatomical organization of hepatic stroma of the brown trout, *Salmo trutta fario* (Teleostei, Salmonidae): A qualitative and quantitative approach // *J. Morphol.* 1995. Vol. 223. № 1.

Rocha E., Monteiro R.A.F., Pereira C.A. The pale-grey interhepatocytic cells of brown trout are a subpopulation of liver resident macrophages or do they establish a different cellular type // *J. Submicrosc. Cytol. and Pathol.* 1996. Vol. 28. № 3.

Rocha E., Monteiro R.A.F., Pereira C.A. Liver of the brown trout: A stereological study of light and electron levels // *Anat. Rec.* 1997. Vol. 247. № 3.

Ruparellia S.G., Verma Y., Saiyed S.R., Rawal U.M. Effect of cadmium on blood of tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), during prolonged exposure // *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.* 1998. Vol. 45.

Saha N.C., Bhunia F., Kaviraj A. Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems // *Ibid.* 1999. Vol. 63.

Sarot D.A. Immune capabilities of the Zebrafish *Brachydanio rerio*. 2. Effects sublethal doses of zinc on the immune response to viral and bacterial antigens // *Arch. Environ. Contam. and Toxicol.* 1977. Vol. 5. N 3.

Saxena M.P., Gopal K., Jones W., Ray P.K. Immune responses to *Aeromonas hydrophila* in cat fish (*Heteropneustis fossilis*) exposed to cadmium and hexachlorocyclohexane // *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.* 1992. Vol. 48. № 2. P. 194–201.

Schaperclaus W. Fischkrankheiten. B., 1979.

Scott A.L., Klesius P.H. Chemiluminescence: A novel analysis of phagocytosis in fish // *Develop. Biol. Stand.* 1981. Vol. 49.

Secombes C.J., Manning M.J., Ellis A.E. The effect of primary and secondary immunization on the lymphoid tissue of the carp, *Cyprinus carpio* L. // *J. Exp. Zool.* 1982. Vol. 220. N 3.

Secombes C.J., Van Groningen J.M., Egberts E. Ontogeny of the immune system in carp (*Cyprinus carpio* L.): The appearance of antigenic determinants on lymphoid cells detected by mouse anti-carp thymocyte monoclonal antibodies // *Develop. and Comp. Immunol.* 1983. Vol. 7.

Siwicki A., Studnicka M. The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio*, L. // *J. Fish Biol.* 1987. Vol. 31.

Smith M., Thor H., Hartzell S. et al. The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes // *Biochem. Pharmacol.* 1982. Vol. 31. № 1.

Sovenyi J.F., Kusuda R. In vitro interaction of *Aeromonas salmonicida* bacteria and head kidney leucocytes of carp, *Cyprinus carpio* L. // *Bull. Sci. and Fish.* 1989. N 11.

Spitsbergen G.M., Schat K.H. et al. Interactions of 2,3,7,8-tetrachlorobenzop-dioxin (TCDD) with immune responses of rainbow trout // *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 1986. Vol. 12.

Stacey N.H., Klassen C.D. Cadmium uptake by isolated rat hepatocytes // *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 1980. Vol. 55.

Stacey N.H., Klaassen C.D. Inhibition of lipid peroxidation without prevention of cellular injury in isolated rat hepatocytes // *Ibid.* 1981. Vol. 58. № 1.

Stave J.M., Roberson B.S., Hetrick F.M. Factors affecting the chemiluminescent response of fish phagocytes // *J. Fish Biol.* 1984. Vol. 25.



*Svobodova Z., Pecena M.* Changes in the red and white blood picture of carp after acute exposure to toxic substances // Pr. VORN Vodnany. 1988. N 17.

*Temmink J.H.M.* Characterization of leucocytes pronefros of carp (*Cyprinus carpio* L.) // Europ. J. Cell. Biol. 1985. Vol. 39, N 11.

*Temmink J.H.M., Bayne C.J.* Ultrastructural characterization of leucocytes in the pronefros of carp (*Cyprinus carpio* L.) // Develop. and Comp. Immunol. 1987. Vol. 11, N 1.

*Thuvander A.* Cadmium exposure of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson: Effects of immune function // J. Fish. 1989. Vol. 35, N 4.

*Viale G., Calamari D.* Immune response in rainbow trout *Salmo gairdneri* after longterm treatment with low levels of Cr, Cd and Cu // Environ. Pollut. 1984. Vol. 35.

*Walczak B.L., Blunt B.R., Hodson P.V.* Phagocytic function of monocytes and haematological changes in rainbow trout injected intraperitoneally with benzo(a)-pyrene(B(a)P) and benzo(a)anthracene(B(a)A) // J. Fish Biol. 1987. Vol. 31, suppl. A.

*Waluga D.* Pheno-induced changes in the peripheral blood of the breams (*Abramis brama* L.) // Acta hydrobiol. 1966. Vol. 8.

*Wdzieczak G., Zalesna G., Wujec E., Peres G.* Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species // Comp. Biochem. and Physiol. B. 1982. Vol. 43.

*Weeks B.A., Anderson D.P. et al.* Immunological biomarkers to assess environmental stress // Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Keystone, 1989.

*Weeks B.A., Warinnerr J.E., Rice C.D.* Recent advances in the assesment of environmentally-induced immunomodulation // Ocean'89: Intern. conf. adress. meth. understand global ocean, Seattle, Wash., Sept. 18-21, 1989. N.Y., 1989. Vol. 2.

*Wenning R.J., Di Glulio R.T.* The effects of paraquat on microsomal oxigen reduction and antioxidant defences in ribbed mussels (*Glukensia demissa*) and wedge clams (*Rangia areata*) // Mar. Environ. Res. 1988. Vol. 29, N 1/4.

*Winston G.W.* Oxidants and antioxidants in aquuatic animals // Comp. Biochem. and Physiol. 1991. Vol. 100, N 1/2.

*Winston G.W., Di Glulio R.T.* Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms // Aquat. Toxicol. 1991. Vol. 19.

*Witeska M.* Changes in selected blood indices of common carp after acute exposure to cadmium // Acta vet. (Brno). 1998. Vol. 67.

*Wlasow T.* Selected inacies of immunologic resistance in rainbow trout during prolonged, subacute phenolic intoxication // Acta ichthyol. et piscator. 1985. Vol. 15, N 2.

*Wofford H.W., Thomas P.T.* Effect of xenobioties on peroxidation of hepatic microsomal lipids from stipped Mulet (*Mugil cephalus*) and Atlantic croaker (*Microgonias undulatus*) // Mar. Environ. Res. 1988. Vol. 24, N 1/4.

*Zapata A.* Ultrastructural study of the teleost fish kidney // Develop. and Comp. Immunol. 1979. Vol. 3.

*Zapata A.* Lymphoid organs of teleost fish. II. Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio* // Ibid. 1981. Vol. 5, N 4.

*Zapata A.* Phylogeny of the fish immune system // Bull. Inst. Pasteur. 1983. Vol. 81.

*Zikic R., Stain A., Zivkovic R.* The activity of superoxidate dismutase and catalase in the tissues and erythrocytes of the carp (*Cyprinus carpio*) exposed to manganese // Acta biol. jugosl. 1988. Vol. 24, N 3.

Научное издание

**РЕАКЦИЯ  
ИММУННОЙ  
СИСТЕМЫ РЫБ  
на загрязнение воды  
токсикантами  
и закисление среды**

Утверждено к печати

Ученым советом

Института биологии внутренних вод  
РАН им. И.Д. Папанина

Зав. редакцией *Р.С. Головина*

Редактор *Н.А. Степанова*

Художник *Ю.С. Шлепер*

Художественный редактор *Т.В. Болотина*

Технический редактор *В.В. Лебедева*

Корректоры

*Г.В. Дубовицкая, Н.П. Круглова, Р.В. Молоканова*

*В.М. Ракитина, Т.И. Шеновалова*

Набор и верстка выполнены в издательстве  
на компьютерной технике

ЛР № 020297 от 23.06.1997

Подписано к печати 02.07.2001

Формат 60 × 90<sup>1/16</sup>. Гарнитура Таймс

Печать офсетная

Усл.печ.л. 8,0. Усл.кр.-отт. 8,3. Уч.-изд.л. 9,3

Тираж 340 экз. Тип. зак. 1120

Издательство "Наука"

117997 ГСП-7, Москва В-485, Профсоюзная ул., 90

Санкт-Петербургская типография "Наука"

199034, Санкт-Петербург В-34, 9-я линия, 12

**АДРЕСА КНИГОТОРГОВЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ  
ТОРГОВОЙ ФИРМЫ "АКАДЕМКНИГА"**

**Магазины "Книга-почтой"**

121009 Москва, Шубинский пер., 6; 241-02-52  
197345 Санкт-Петербург, ул. Петрозаводская, 75; (код 812) 235-05-67

**Магазины "Академкнига" с указанием отделов "Книга-почтой"**

690088 Владивосток, Океанский пр-т, 140 ("Книга-почтой"); (код 4232) 5-27-91  
620151 Екатеринбург, ул. Мамина-Сибиряка, 137 ("Книга-почтой"); (код 3432  
55-10-03  
664033 Иркутск, ул. Лермонтова, 298 ("Книга-почтой"); (код 3952) 46-56-20  
660049 Красноярск, ул. Сурикова, 45; (код 3912) 27-03-90  
220012 Минск, проспект Ф.Скорины, 72; (код 10375-17) 232-00-52, 232-46-52  
117312 Москва, ул. Вавилова, 55/7; 124-55-00  
117192 Москва, Мичуринский пр-т, 12; 932-74-79  
103054 Москва, Цветной бульвар, 21, строение 2; 921-55-96  
103624 Москва, Б. Черкасский пер., 4; 298-33-73  
630091 Новосибирск, Красный пр-т, 51; (код 3832) 21-15-60  
630090 Новосибирск, Морской пр-т, 22 ("Книга-почтой"); (код 3832) 35-09-22  
142292 Пущино Московской обл., МКР "В", 1 ("Книга-почтой"); (13) 3-38-60  
443022 Самара, проспект Ленина, 2 ("Книга-почтой"); (код 8462) 37-10-60  
191104 Санкт-Петербург, Литейный пр-т, 57; (код 812) 272-36-65  
199164 Санкт-Петербург, Таможенный пер., 2; (код 812) 328-32-11  
194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр-т, 4; (код 812) 247-70-39  
199034 Санкт-Петербург, Васильевский остров, 9-я линия, 16;  
(код 812) 323-34-62  
634050 Томск, Набережная р. Ушайки, 18; (код 3822) 22-60-36  
450059 Уфа, ул. Р. Зорге, 10 ("Книга-почтой"); (код 3472) 24-47-74  
450025 Уфа, ул. Коммунистическая, 49; (код 3472) 22-91-85

**Коммерческий отдел, г. Москва**

**Телефон 241-03-09**

**Е-mail: AKADEM. KNIGA @ g. 23. relcom. ru**

**Склад, телефон 291-58-87**

**Факс 241-94-64**

---

*По вопросам приобретения книг  
просим обращаться также  
в Издательство по адресу:  
117997 Москва, ул. Профсоюзная, 90  
тел. факс (095) 334-98-59  
E-mail: initsiat @ naukaran.ru*

---