

На правах рукописи

Назарова Екатерина Александровна

**ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ СТРУКТУРЫ РЕНАЛЬНОЙ
ТКАНИ ПРЕСНОВОДНЫХ И МОРСКИХ КОСТИСТЫХ РЫБ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Специальность 03.00.16 – экология

Борок-2009

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биологии
внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,

Заботкина Елена Анатольевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,

профессор, член-корреспондент РАН

Моисеенко Татьяна Ивановна

доктор биологических наук,

Корнева Жанетта Вячеславовна

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт проблем
промышленной экологии Севера Кольского научного центра РАН, г. Апатиты

Защита состоится 17 декабря 2009 г в 10⁰⁰ на заседании диссертационного совета ДМ
002.036.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии
внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН по адресу: 152742 Ярославская обл.,
Некоузский район, п. Борок, ИБВВ РАН; тел./факс: (48547) 24-0-42.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской
академии наук Института биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН.

Автореферат разослан « 10 » ноября 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Л. Г. Корнева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Выяснение механизмов адаптаций рыб к различным биотическим и абиотическим факторам, определение нормы и патологии в условиях антропогенного загрязнения является важным аспектом решения одной из проблем экологии – взаимодействия организма и среды. Согласно концепции биомаркеров, признанной в 1990-е гг. прошлого века, наиболее удачными являются биохимические, физиологические и гистологические показатели (Лукин, Шарова, 2005). Почки рыб, наряду с печенью и жабрами являются важнейшими маркерами загрязнения, так как они незаменимы в процессе поддержания стабильной внутренней среды организма, включающей водно-солевой баланс, выведение продуктов обмена веществ и ксенобиотиков, формирование неспецифического и специфического иммунитета, синтез ряда гормонов (Наточин, 1976; Баранникова и др., 2000; Кондратьева и др., 2001; Микряков и др., 2001). Наиболее полно изучена структура почек у рыб разных экологических групп, как в норме, так и при воздействии антропогенных факторов на уровне световой микроскопии (Brown, 1957; Smith et al., 1970; Наточин, 1976; Турдаков, 1977; Boomker, 1979; Аминева, Яржомбек, 1984; Галактионов, 1995). Однако многие вопросы, касающиеся тонких внутриклеточных перестроек в паренхиме про- и мезонефроса у рыб в зависимости от различных факторов среды обитания, отрывочны и не систематизированы. Результаты таких исследований могут иметь теоретическое значение для выяснения адаптивных изменений как к естественным факторам среды, так и к действию токсикантов различной природы, в том числе тяжелых металлов, одним из которых является кадмий. Решением Европейского сообщества он внесен в «черный список» загрязняющих веществ, представляющих наибольшую опасность для гидробионтов (Колпакова и др., 1996). Показано, что уровень аккумуляции кадмия в почках рыб по сравнению с другими органами наибольший (Szebedinszky et al., 2001; Chowdhury et al., 2004; Кашулин, Гладышева, 2005; Franklin et al., 2005; Борисов, 2006; Моисеенко и др., 2006; Чернова и др., 2006), но большинство работ направлено на изучение его действия у важных в рыбоводстве лососевых и карповых рыб (Elasser et al., 1986; De Smet, Biust, 2001; Hansen et al., 2002; Drastichova et al., 2003; Chowdhury et al., 2004), а сведения по исследованию свободноживущих видов представлены скудно. При этом имеющиеся в литературе данные по влиянию ионов кадмия на морфофункциональные характеристики почек достаточно противоречивы, а изменения тонкой структуры клеток почек практически не изучены (Dallinger et al., 1997; De Conto Cinier et al., 1997; Drastichova et al., 2003; Franklin et al., 2005; Panchanathan, Vattapparumbil, 2006). Исследование поставленных вопросов во многом поможет расширить знания об устойчивости различных видов костистых рыб как необходимого компонента водных экосистем к изменению физико-химических свойств природных вод (в том числе при антропогенном загрязнении их тяжелыми металлами).

Цель работы – выявить экологическую пластичность структуры почек костистых рыб на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях в зависимости от факторов среды и физиологических особенностей видов.

Задачи исследования:

1. Исследовать структуру ренальной ткани про- и мезонефроса и выявить ее особенности у пресноводных и морских видов, принадлежащих к отрядам Cypriniformes и Perciformes.

2. Установить зависимость соотношения различных форм лейкоцитов в почках рыб от эколого - физиологических особенностей видов.
3. Исследовать ультраструктуру клеток паренхимы почек рыб и определить степень ее зависимости от условий обитания видов в воде с различной соленостью.
4. Изучить действие ионов кадмия в сублетальных концентрациях на структуру почечной ткани и ультраструктуру ее клеток у карпа, гольца и окуня.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Исследованные пресноводные и морские рыбы имеют одинаковую структурную организацию ренальной ткани, но различаются по морфологии и соотношению некоторых клеточных элементов, что отражает адаптацию организма к различной солености и кислородному режиму среды обитания.
2. При действии кадмия прослеживается не зависящая от его концентрации, срока экспозиции, вида и возраста рыб единая последовательность проявления патоморфологических изменений в тканях почек рыб на клеточном и субклеточном уровнях, что отражает неспецифическую реакцию организма на воздействие токсиканта.

Научная новизна

Для 12 видов рыб отр. Cypriniformes и Perciformes, обитающих в пресных и соленых водах, получены новые данные о количественном соотношении различных форм лейкоцитов в почках. Обнаружена корреляционная связь этого показателя с чувствительностью рыб к дефициту кислорода в воде. Впервые изучена ультраструктура лейкоцитов у *Barbatula barbatula* (L.), *Cobitis taenia* L., *Stizostedion volgense* (Gmelin), *Trachurus mediterraneus* (Staindachner) и *Diplodus annularis* (L.). Выявлены клетки с радиально расположенными везикулами в почках *Carassius auratus* (L.), *Abramis ballerus* (L.), *Barbatula barbatula* (L.), *Cobitis taenia* L., *Diplodus annularis* (L.). Палочковые клетки – в почках *Cobitis taenia* L., *Stizostedion lucioperca* (L.), *Stizostedion volgense* (Gmelin) и *Diplodus annularis* (L.). Бокаловидные клетки – проксимальном отделе канальцев *Stizostedion volgense* (Gmelin). В паренхиме про- и мезонефроса исследованных видов впервые описаны клетки, структура которых подобна ионтранспортирующим клеткам жаберного эпителия рыб.

Впервые установлены отличия в количестве и размерах ряда клеточных органелл у эпителиоцитов морских и пресноводных рыб. Выявлено 2 типа эпителиоцитов проксимального отдела канальцев у всех исследуемых видов, различающихся по линейным размерам и качественным характеристикам. Описана ультраструктура клеток промежуточного отдела канальцев нефрона в мезонефросе синца и судака. Обнаружено наличие микроресничек в щеточной каемке эпителиоцитов проксимального отдела канальцев.

Установлена степень развития некробиоза в интерстициальной ткани мезонефроса карпа, гольца и окуня под действием ионов кадмия, проявившаяся в уменьшении площади, занимаемой интерстициальной тканью. У гольца выявлены изменения в количественном соотношении различных форм лейкоцитов в пронефросе, а также в ультраструктуре клеток лимфомиелоидной и нефрогенной тканей мезонефроса.

Теоретическая и практическая значимость

У костистых рыб выявлена взаимосвязь ультраструктурной организации почек с выполняемыми ими функциями, которая отражает адаптационные возможности рыб к дефициту кислорода и к обитанию в пресных и соленых водах. Полученные данные являются существенным вкладом в общие сведения об экологии этой группы рыб.

Результаты исследований, посвященные действию ионов кадмия на рыб, расширяют знания о неспецифическом ответе клеток и тканей почек и могут использоваться при оценке экологического состояния водных объектов к действию хронического комплексного загрязнения водоемов. Материалы диссертационной работы могут быть использованы при чтении курсов лекций «Сравнительная цитология и гистология» и «Водная токсикология».

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на Всероссийской и международной научно-практических конференциях «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб 1, 2» (Борок, 2004, 2007); XII-XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2005, 2006» (Москва, 2005, 2006); XXI Российской конференции по электронной микроскопии (Черноголовка, 2006); IX съезде гидробиологического общества РАН (Тольятти, 2006); Всероссийской научно-практической конференции «Экологические проблемы уникальных природных и антропогенных ландшафтов» (Ярославль, 2006, 2007); Международной конференции «Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем» (Санкт-Петербург, 2006); XII Европейском ихтиологическом конгрессе (Хорватия, Дубровник, 2007); XIII Международной молодежной школе – конференции «Биология внутренних вод» (Борок, 2007).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 15 статей, 3 из них в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, и 6 тезисов конференций.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 191 странице машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 303 наименования, в том числе 126 на иностранном языке, и содержит 37 таблиц и 27 рисунков, 21 из которых – в приложении (124 микрофотографии).

Благодарность

Автор выражает глубокую благодарность к.б.н. Е.А. Заботкиной за помощь в выборе направления исследований, руководство работой на основных этапах ее выполнения; д.б.н. Г.М. Чуйко, д.б.н., проф. Н.Н. Тятенковой, к.б.н. Д.Ф. Павлову, к.б.н. Т.Б. Лапировой, к.б.н. В.И. Мартемьянову, к.б.н. Н.Н. Ружинской за ценные советы и замечания при обсуждении результатов работы; лично к.б.н. Ю.В. Герасимову, д.б.н. А.В. Крылову, д.б.н. И.И. Рудневой и сотрудникам их лабораторий за помощь в отборе материала для исследований; В.В. Павловой и сотрудникам ЦКП электронной микроскопии за помощь в обработке материала.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В главе представлены сведения об особенностях анатомии, морфологии и функционирования про- и мезонефроса круглоротых и рыб, а также даны структурно-функциональные характеристики клеток ренальной ткани данных органов у некоторых видов костистых рыб. Обсуждается проблема классификации лейкоцитов и особенности лейкоцитарной формулы рыб. Представлены данные по антропогенной эмиссии кадмия, накоплению и действию этого металла на организм рыб.

Глава 2. Материалы и методы исследований

Объектом исследования из природных водоемов послужили особи 7 видов карпообразных: серебряный карась *Carassius auratus* (L.), лещ *Abramis brama* (L.), линь *Tinca tinca* (L.), плотва *Rutilus rutilus* (L.), синец *Abramis ballerus* (L.), усатый

голец *Barbatula barbatula* (L.), обыкновенная щиповка *Cobitis taenia* L. и 5 видов окунеобразных рыб: берш *Stizostedion volgense* (Gmelin), обыкновенный судак *Stizostedion lucioperca* (L.), речной окунь *Perca fluviatilis* L., средиземноморская ставрида *Trachurus mediterraneus* (Staindachner) и морской карась *Diplodus annularis* (L.). Рыб отлавливали ловушками, тралом, неводом и сачком в летне-осенний период 2005–2006 гг. в Рыбинском водохранилище, реках Ильд и Сутка и бухте Карантинная Черного моря. Размерно-весовые характеристики изученных рыб приведены в таблице 1.

Таблица 1

Объем обработанного материала методом световой и электронной микроскопии в полевых исследованиях

Вид (возраст рыбы)	Длина, см Масса, г	N	Вид (возраст рыбы)	Длина, см Вес, г	N
Отр. Карпообразные (Cypriniformes)			Отр. Окунеобразные (Perciformes)		
Лещ (7+ -8+)	$\frac{31,3 \pm 0,5}{695,7 \pm 28,1}$	10	Окунь (4+)	$\frac{13,1 \pm 0,3}{33,7 \pm 1,6}$	6
Синец (6+ -8+)	$\frac{27,1 \pm 0,6}{322,7 \pm 14,2}$	16	Судак (5+ -7+)	$\frac{43,3 \pm 1,4}{1222 \pm 166}$	24
Плотва (7+)	$\frac{16,8 \pm 1,0}{101,6 \pm 19,5}$	14	Берш (4+ -5+)	$\frac{32,6 \pm 1,9}{470,5 \pm 44,7}$	16
Серебряный карась (5+)	$\frac{20,5 \pm 1,9}{348,8 \pm 44,0}$	10	Ставрида (3+)	$\frac{10,1 \pm 0,2}{14,6 \pm 0,8}$	7
Линь (4+)	$\frac{15,5 \pm 0,7}{90,5 \pm 9,6}$	8	Морской карась (3+)	$\frac{5,6 \pm 0,2}{5,9 \pm 0,5}$	6
Голец (3+)	$\frac{8,5 \pm 0,2}{5,8 \pm 0,3}$	10	Примечание: здесь и далее данные представлены в виде средних значений и их ошибок ($x \pm SE$); для анализа у всех особей были взяты пробы головной и туловищной почек.		
Щиповка	$\frac{8,1 \pm 0,2}{3,7 \pm 0,4}$	16			

Экспериментальную часть работы проводили на обыкновенном карпе (*Cyprinus carpio* L.), усатом гольце (*Barbatula barbatula*) и речном окуне (*Perca fluviatilis*). Карпы и окуни были получены на базе «Сунога» ИБВВ им. И. Д. Папанина РАН в 1996 и 2006 гг. соответственно. Гольцы выловлены летом 2006 г. в р. Ильд. В качестве токсического агента использовали $CdCl_2$. Токсичность кадмия для каждого вида рыб устанавливали в предварительных лабораторных экспериментах. Концентрацию токсиканта поддерживали на постоянном уровне сменой воды раз в 2 дня. Рыб ежедневно кормили искусственным кормом. Условия постановки экспериментов, размерно-весовые характеристики изученных рыб и виды анализа приведены в таблице 2.

Анализ соотношения лейкоцитов проводили на мазках – отпечатках головной и туловищной почек, которые приготавливали по стандартной методике, окрашивали по Романовскому-Гимза (Волкова, Елецкий, 1971). Под световым микроскопом БИОЛАМ-И подсчитывали 200 лейкоцитов, при идентификации которых придерживались классификации Н.Т. Ивановой (1983). Для выяснения количественного отклонения в гематологических параметрах использовали индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ): $ИСЛ = (\Sigma \text{гранулоцитов}) / (\Sigma \text{агранулоцитов})$ (Житенева и др., 2004).

Полутонкие срезы готовили на микротоме УМТП-3, окрашивали метиленовым синим по стандартной методике (Миронов и др., 1994). На микроскопе Olympus CX31 (видеоадаптер JVC) с препаратов получали цифровые фотографии, которые обрабатывали в программе Image Tool 3.0. Измеряли наружный диаметр и площадь боуменовых капсул, канальцев и кровеносных капилляров. Площадь интерстициальной ткани рассчитывали как разность между общей площадью среза и суммой площадей боуменовых капсул, канальцев и кровеносных капилляров.

Таблица 2

Условия постановки экспериментов, размерно-массовые характеристики изученных рыб и виды анализа

Условия экспериментов \ Вид рыбы		Обыкновенный карп (1+)	Усатый голец (3+)	Речной окунь (0+)
1) Длина ($x \pm SE$), см		1) 17,2 \pm 0,9	1) 8,6 \pm 1,2	1) 9,0 \pm 0,6
2) Масса ($x \pm SE$), г		2) 108,3 \pm 15,6	2) 4,2 \pm 0,2	2) 6,8 \pm 1,3
Количество особей	опыт	20	20	10
	контр.	20	20	10
LC ₅₀ при 96 часовая экспозиция	опыт	25 мг/л	25 мг/л	0,1 мг/л
	контр.	водопроводная вода		
Концентрация Cd в опыте (расчет по иону металла)	опыт	5 мг/л; (0,2 от LC ₅₀)	50 мкг/л; (0,002 от LC ₅₀)	20 мкг/л; (0,2 от LC ₅₀)
	контр.	водопроводная вода		
Сроки отбора проб, сут		7,14,21,28	7,14,21,28	7,14
Объем аквариумов, л		150	50	50
Изучаемые органы		пронефрос и мезонефрос		

Материал для электронной микроскопии фиксировали и обрабатывали по стандартной методике (Миронов и др., 1994). Ультратонкие срезы готовили на микротоме LKB 8800 и просматривали под электронными микроскопами JEM 100C и JEM 1011. Измерение клеток и клеточных органелл проводили на негативах и цифровых микрофотографиях, обработанных в программе Adobe Photoshop CS. Измеряли: продольный (d_1) и поперечный диаметр (d_2) лейкоцитов, клеток с радиально расположенными везикулами (КРВ), и палочковых клеток и их субклеточных структур (ядра всех типов выше перечисленных клеток, фагосомы макрофагов, гранулы гранулоцитов и палочковых клеток, везикулы КРВ); длину (L) и ширину (H) мелано-макрофагальных центров и подоцитов боуменовых капсул; степень вытянутости (v) и поперечный диаметр (d_2) хлоридных и бокаловидных клеток, а также продольный (d_1) и поперечный диаметр (d_2) ядер у этих типов клеток, митохондрий хлоридных клеток и секреторных гранул бокаловидных клеток; длину (L) и максимальную ширину (B) эпителиоцитов канальцев, а также средний диаметр (d) микроворсинок и микроресничек, длину (L) зоны эндоцитоза, щеточной каемки, продольный (d_1) и поперечный диаметр (d_2) ядер и митохондрий у этих типов клеток, а также продольный (d_1) и поперечный диаметр (d_2) секреторных гранул эпителиоцитов I типа проксимального отдела канальцев нефрона. Подсчитывали количество гранул в гранулоцитах и палочковых клетках, везикул в КРВ, митохондрий в хлоридных клетках, секреторных гранул в бокаловидных клетках и эпителиоцитах I типа проксимального отдела канальцев нефрона. Вычисляли форм-

фактор (FF) гранул гранулоцитов и палочковых клеток как отношение ширины к длине гранулы. Интенсивность дегрануляции гранулоцитов (ИДГ) рассчитывали как отношение количества опустошенных гранул и гранул с измененной структурой (ИГ) к количеству нормальных гранул (НГ) для данного типа клеток: $ИДГ=(ИГ)/(НГ)$. Для оценки интенсивности разрушения митохондрий (ИРМ) в эпителиоцитах вычисляли отношение количества нормальных (НМ) к разрушенным митохондриям (РМ): $ИРМ=(РМ)/(НМ)$.

Статистическая обработка материала. Результаты обработаны статистически в программах MS Excel 2003 и Statistica 6.0, они представлены в виде средних значений и их ошибок ($\bar{x} \pm SE$). Для оценки достоверности результатов использовали t-критерий Стьюдента и дисперсионный анализ (ANOVA, LSD-тест) при $p=0,05$. Для оценки сходства в соотношении лейкоцитов пронефроса между видами рыб применяли кластерный анализ методом Уорда в программе PAST (Hammer et al., 2001).

Глава 3. Особенности структурной организации почек пресноводных и морских костистых рыб

3.1. Структура почек рыб на тканевом уровне

Пронефрос исследованных видов состоит из ретикуло-лимфомиелоидной ткани и кровеносных сосудов. Большая часть клеток крови представлена эритроцитами и лимфоцитами, встречаются крупные клетки с незернистой цитоплазмой, а также плохо идентифицируемые зернистые лейкоциты. В пронефросе серебряного карася обнаружен относительно толстый слой тяжелой ткани ($72,6 \pm 9,2$ мкм), состоящий из нескольких рядов клеток, имеющих светлую или темную цитоплазму и плотно прилегающих друг к другу. Светлые клетки идентифицированы как стероидогенные, темные – как хромаффинные. Тяжи клеток окружают крупный сосуд и образуют интерренальную ткань.

Мезонефрос, как и пронефрос, состоит из ретикуло-лимфомиелоидной (интерстициальной) ткани, идентификация клеток которой также затруднена. Эта ткань тесно связана со стенками сосудов и петлями нефронов. Следует отметить, что мезонефрос исследованных видов имеет: 1) межвидовые различия в степени развития интерстициальной ткани; 2) у морских видов окунеобразных рыб доля интерстициальной ткани меньше, чем у пресноводных; 3) доля интерстициальной ткани достоверно выше у всех видов карпообразных, по сравнению с таковой у окунеобразных (рис. 1).

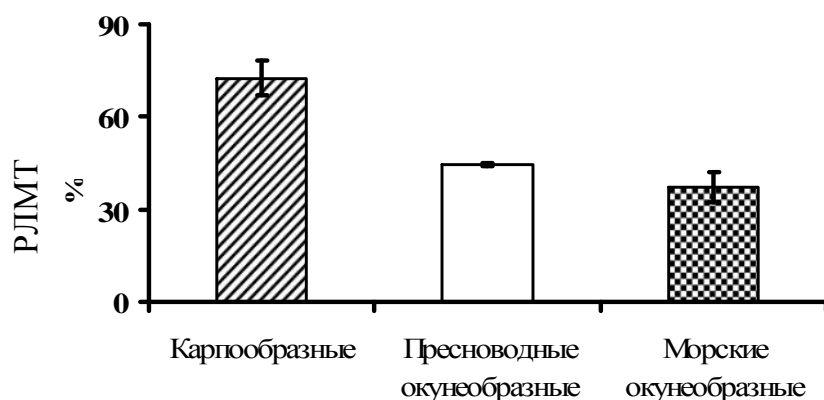


Рис. 1. Степень развития интерстициальной ткани в мезонефросе у исследованных отрядов рыб. РЛМТ–доля интерстициальной ткани от общей площади ренальной ткани мезонефроса, %.

Результаты исследования показали, что головная и туловищная почки всех исследованных видов построены сходным образом, в их состав входят обязательные компоненты: ретикулярная строма, кроветворная ткань и кровеносные сосуды, кроме того, в состав мезонефроса – нефрогенная ткань. Перечисленные компоненты

свойственны почкам всех ныне живущих видов круглоротых и рыб, а основные отделы нефрона и высшим позвоночным (Гинецинский, 1964; Наточин, 1976; Ланге и др., 1990; Говядинова и др., 2000; Микряков и др., 2001). Различную степень развития интерстициальной ткани мезонефроса у карпообразных и окунеобразных видов, вероятно, можно объяснить тем, что по палеонтологическим данным предковая группа карпообразных была генеративно (первично) пресноводной, и ее филогенетическое развитие, включая появление исследованных нами видов, происходило исключительно в пресных водах (Кэрролл, 1992; Справочник для палеонтологов..., 1994). Предковая группа современных окунеобразных возникла и развивалась в морской воде. Лишь значительно позднее относительно малое количество древних видов, включая предковую группу, от которой произошли современные пресноводные окуневые, освоило пресные воды (Кэрролл, 1992; Справочник для палеонтологов..., 1994; Мамилов и др., 1998). Вероятно, этим можно объяснить различное соотношение интерстициальной и нефрогенной тканей в мезонефросе у исследованных видов карпообразных и окунеобразных рыб. Возможно, у окунеобразных в почечно-селезеночном типе кроветворения основную роль играет пронефрос, а мезонефрос в процессе филогенетического развития стал более специализированным. В результате значение одной из функций мезонефроса (лимфо- и миелопоэз) ослабело. Об этом свидетельствует более слабая степень развития интерстициальной ткани у морских окунеобразных, по сравнению с пресноводными. Данное предположение согласуется с тем, что в морской воде почки рыб испытывают гораздо большую нагрузку, чем в пресной воде, т.к. не только реабсорбируют, но и секретируют ионы (Наточин, 1976).

Интерренальная ткань ранее была описана в различных участках головной и туловищной почек осетровых. Среди костистых этот тип ткани наиболее полно изучен в пронефросе лососевых (Баранникова, 1975; 1978а, б; Макеева, 1992). Развитие данной ткани в мезонефросе исследованных видов нами обнаружено не было. Некоторые авторы называют тельца Станниуса задней интерренальной тканью (Аминева, Яржомбек, 1984). Тем не менее, показано, что эти тельца не развиваются из вольфовых каналов и не секретируют кортикостероиды, тогда как интерренальная ткань пронефроса и надпочечники млекопитающих происходят из эпителия целомической выстилки (Межнин, 1978). Поэтому тельца Станниуса вряд ли можно отождествлять с корой надпочечников млекопитающих и интерренальной тканью.

Таким образом, отсутствие интерренальной ткани в мезонефросе костистых рыб (в отличие от осетровых) и уменьшение площади интерстициальной ткани в ряду пресноводные карпообразные – пресноводные окунеобразные – морские окунеобразные возможно связано с увеличением количества нефронов на единицу площади ренальной ткани и последующей специализацией нефрогенной ткани в процессе эволюции, что позволило окунеобразным освоить водоемы с широким диапазоном солености.

3.2. Состав и соотношение лейкоцитов

Так как состав и соотношение различных типов лейкоцитов в лимфомиелоидной ткани почек трудно описать на стандартных гистологических срезах, нами был проведен анализ мазков-отпечатков органов.

Установлено, что лимфомиелоидная ткань почек исследованных видов содержит гемоцитобласты, лимфоциты, макрофаги, плазматические клетки, нейтрофилы и эозинофилы, находящиеся на различных стадиях зрелости. В обоих органах соотношение лейкоцитов носит лимфоидный характер: лимфоциты

составляют 37–68% в пронефресе, 38–79% в мезонефресе. Доля гемоцитобластов в головной почке почти в 1,5–2 раза выше, чем в туловищной, что свидетельствует о более высокой лейкопоэтической активности этого органа. Соотношение остальных типов лейкоцитов в про- и мезонефресе у каждого вида рыб существенно отличается.

Известно, что лейкоцитарная формула периферической крови зависит от миграционной активности рыб, питания, пола, возраста, температуры воды и т.д. (Житенева и др., 2004). Так как пронефрос костистых рыб является основным органом лейкопоэза, можно предположить, что подобные показатели должны отражаться на соотношении лейкоцитов и в этом органе. В качестве возможного фактора мы рассмотрели чувствительность рыб к дефициту кислорода в воде, а также тип питания и миграционную активность видов.

Придерживаясь классификации Г. В. Никольского (1974) и привлекая данные по чувствительности рыб к пороговому содержанию растворенного в воде кислорода (Черфас, 1956; Карпанин, Иванов, 1967; Карпевич, 1975, Яржомбек и др., 1986), исследованные виды условно могут быть разделены следующим образом: карась, лещ и линь относятся к группе рыб, выдерживающих слабое насыщение воды O_2 (0,5 мл/л). Синец, плотва, окунь, ставрида, голец, судак и щиповка (4 мл/л) – к группе, более требовательной к количеству O_2 в воде.

Данное деление не противоречит распределению лейкограмм пронефроса в кластерном анализе, который позволил выделить группы рыб, обладающие наибольшим сходством в соотношении различных типов лейкоцитов. Более того, виды с близкими значениями порогового содержания кислорода в воде попадают в одну группу при распределении лейкограмм в кластерном анализе (рис. 2).

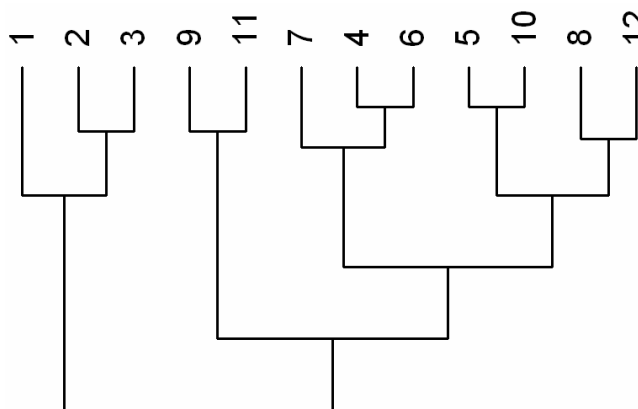


Рис. 2. Распределение по сходству лейкограмм головной почки.

1 группа: 1–серебряный карась, 2–линь, 3–лещ.

2 группа: 9–окунь, 11–ставрида.

3 группа: 7–синец, 4–голец, 6–плотва.

4 группа: 5–щиповка, 10–судак, 8–берш, 12–морской карась.

Выдвинутое предположение подтверждают и данные о содержании основных электролитов в эритроцитах у этих видов рыб, которые, в зависимости от концентрации натрия и калия в клетках, попадают в аналогичные группы. Показано, что концентрация калия в эритроцитах связана со способностью видов адаптироваться к экстремальным изменениям условий среды обитания. Самая высокая концентрация калия в эритроцитах получена у линя и карася, которые живут в условиях периодического дефицита кислорода, населяя стоячие, часто заболоченные водоемы, в которых другие виды обычно не могут обитать (Мартемьянов, 1992). Концентрация натрия в эритроцитах связана с их кислороднесущей емкостью. Показано, что чем ниже концентрация натрия в эритроцитах, тем рыбы более адаптированы к дефициту кислорода. Самая высокая концентрация натрия обнаружена у окуня и судака (Мартемьянов, 1992), что также согласуется с полученными результатами.

По характеру питания и миграционной активности сходства между распределением рыб на основании лейкограмм не наблюдается.

Таким образом, соотношение различных форм лейкоцитов в головной почке коррелирует с чувствительностью рыб к дефициту кислорода в воде и не зависит от типа питания и миграционной активности.

3.3. Ультраструктура клеток ренальной ткани

3.3.1. Лейкоциты

Тонкая структура лимфоцитов, макрофагов и мелано-макрофагальных центров, плазматических клеток у исследованных нами видов сходна с другими костистыми (Zapata, 1979; Temmink, Bayne, 1987; Agius, Roberts, 2003; Балабанова, 1997б, 2005). Размеры этих клеток и субклеточных структур одного типа незначительно варьируют у разных видов и в разных органах, исключение составляют макрофаги и мелано-макрофагальные центры, размеры которых у разных видов рыб различаются более чем в 2 раза. Основные отличия наблюдаются в структуре и количественных характеристиках гранулоцитов.

Нейтрофилы (от 5,7x3,7 мкм у серебряного карася до 11,5x9,4 мкм у морского карася). Характерным признаком этих клеток являются заполняющие цитоплазму специфичные гранулы, количество которых в нейтрофилах карпообразных превышает таковое у окунеобразных. По структуре гранул все исследованные виды можно разделить на **5 групп**. **1 группа**: серебряный карась, лещ, линь, синец, плотва и щиповка – имеют темные гранулы с электронно-плотной палочковидной сердцевинкой (FF от 0,65 у карася до 0,17 у линя). **2 группа** – голец, специфичные гранулы которого темные, зернистые, с электронно-плотной округлой сердцевинкой, занимающей большую часть органелл (FF 0,83). **3 группа**: окунь, судак, берш - гранулы с равномерно распределенными электронно-плотными фибриллами, расположенными вдоль органелл (FF от 0,66 у судака до 0,28 у берша). **4 группа** – ставрида, она имеет фибриллярной структуры гранулы с электронно-прозрачной палочковидной сердцевинкой (FF 0,69). **5 группа** – морской карась, гранулы нейтрофилов которого электронно-плотные без фибриллярной структуры (FF 0,85).

Эозинофилы (от 4,9x4,7 мкм у судака до 8,4x6,5 мкм у линя). Цитоплазма этих клеток также содержит специфичные гранулы, которые, как правило, крупнее, а количество их меньше, чем в нейтрофилах. По структуре гранул виды разделили на **3 группы**. **1 группа**: серебряный карась, лещ, линь, синец, голец, щиповка, окунь, судак, берш и ставрида – имеют электронно-плотные, иногда более светлые гранулы гомогенной структуры. **2 группа** – плотва, она имеет электронно-плотные гранулы и гранулы с эксцентрично расположенным более прозрачным участком. Возможно, ультраструктурные различия гранул эозинофилов у плотвы являются следствием особенностей функциональной активности клеток. **3 группа** – морской карась, специфичные гранулы которого округлые, электронно-прозрачные с электронно-плотной каймой и звездчатой центральной частью. FF гранул большинства видов составляет от 0,67 до 0,85.

Гранулоциты I-II типа обнаружены только у морского карася (7,0x 5,6 мкм). Они меньше по сравнению с нейтрофилами и эозинофилами. Особенностью этих клеток является наличие нейтрофильных и эозинофильных специфичных гранул. Количество гранул I типа превышает таковое гранул II типа в клетках про- и мезонефроса.

Гранулоциты III типа обнаружены только у берша (6,9x 5,3 мкм). Цитоплазма содержит светлые, зернистой структуры специфичные гранулы (FF 0,92), некоторые

из которых имеют электронно-плотное скопление в срединной части. Количество гранул в этих клетках меньше, чем у гранулоцитов берша, описанных выше.

Ранее было показано, что в кроветворной ткани пластинчатожаберных встречаются 3 типа гранулоцитов (нейтрофилы, эозинофилы и базофилы), у круглоротых, большинства осетровых и костистых рыб – 2 типа (нейтрофилы и эозинофилы) (Parish et al., 1986; Ланге и др., 1990; Говядинова и др., 2000; Балабанова, 1997б, 2005). У некоторых видов из отрядов окунеобразных и камбалообразных отмечают только нейтрофилы (Roubal, 1986). Среди костистых лишь у лаврака *Dicentrarchus labrax* L. и карпа *Cyprinus carpio* описаны нейтрофилы, эозинофилы и базофилы. Более того, у карпа выделены гранулоциты II–III типа, содержащие эозинофильные и базофильные гранулы (Cenini 1984; Балабанова, Заботкина, 1988; Meseguer et al., 1990).

Специфичные гранулы обнаруженного нами III типа гранулоцитов берша имеют сходные черты строения с гранулами базофилов других видов, что позволяет нам назвать данный тип клеток базофилами.

Таким образом, на основании полученных результатов и литературных данных можно сделать вывод о том, что у разных видов круглоротых и рыб ультраструктура агранулоцитов подобна и не зависит от условий среды обитания. Несмотря на разнообразие типов и морфологических форм гранулоцитов у пресноводных и морских рыб, нам также не удалось обнаружить зависимости их ультраструктуры от среды обитания видов. Тем не менее, привлекая морфометрические данные, можно сделать вывод о том, что вторичные гранулы клеток миелоидного ряда видоспецифичны. Структура гранул может быть связана с различным набором ферментов и других антибактериальных факторов, а также характером их накопления в гранулах (Шубникова, 1974; Алмазов и др., 1979; Бут и др., 2002).

3.3.2. Палочковые клетки

При описании данного типа клеток использовалась классификация В.Е. Матей, разработанная для жаберного эпителия костистых рыб (Матей, 1996). В почках исследованных видов обнаружены клетки на 3, 4 и 5 стадиях развития. Размеры этих клеток подобны таковым гранулоцитов (от 5,3x3,3 мкм у судака до 9,3x6,6 мкм у окуня). Гранулы в клетках (4–5 стадии зрелости) крупнее клеток зернистого ряда (FF гранулы от 0,75 у линя и морского карася до 0,24 у судака). Клетки **3 стадии** описаны в мезонефросе линя, судака, берша и морского карася; **4 стадии** – в пронефросе щиповки, мезонефросе линя, плотвы и всех окунеобразных. На **5 стадии** палочковые клетки, располагавшиеся между эпителиоцитами, многочисленны в проксимальных участках нефрона линя, окуня, судака и берша. На этой стадии зрелости клетки секретируют свое содержимое в просвет канальца.

Ультраструктура палочковых клеток, изученных в нашей работе, подобна таковой этих клеток в различных органах у других видов пресноводных и морских рыб (Матей, 1996; Kramer, Potter, 2002; Manera, Dezfuli, 2004). Ранее сведения о нахождении палочковых клеток в почках обыкновенной щиповки *Cobitis taenia*, обыкновенного судака *Stizostedion lucioperca*, берша *Stizostedion volgense* и морского карася *Diplodus annularis* отсутствовали.

Дискуссия о происхождении и функциях палочковых клеток, длящаяся более 90 лет, завершилась созданием гипотезы об эпителиальной природе этих клеток и участии их в неспецифическом иммунном ответе (Балабанова, Матей, 1987; Iger, Abraham, 1990; Manera, Dezfuli, 2004). Полученные результаты не противоречат этой гипотезе, хотя нами и не были обнаружены все стадии дифференцировки этих клеток.

Возможно, пролиферация палочковых клеток происходит в покровном эпителии, а далее они разносятся с током крови во все органы и ткани, где и происходит их дальнейшее развитие. В пользу нашего предположения говорит факт обнаружения незрелых палочковых клеток в слое недифференцированных элементов эпителия филламентов жабр и в нижних слоях эпидермиса рыб (Матей, 1996, Manera, Dezfuli, 2004).

3.3.3. Клетки с радиально расположенными везикулами (КРВ)

Ранее эти клетки отмечены в кроветворных органах, периферической крови, перинатальной жидкости и кишечнике рыб. Они очень редки, обнаруживаются не у всех видов рыб и не у всех представителей одного и того же вида (Ferguson, 1976; Lopez et al., 2001; Балабанова, 2006а). Полученные данные показали, что эти клетки встречаются в про- и мезонефросе всех исследованных видов карпообразных. Среди окунеобразных нам удалось обнаружить КРВ лишь в мезонефросе окуня и морского карася. Структура КРВ в почках всех исследованных видов подобна таковой других видов пресноводных и морских рыб (Ferguson, 1976; Lopez et al., 2001; Балабанова, 2006а). Размеры КРВ подобны размерам лимфоцитов (от 4,2x3,0 мкм у гольца до 6,0x4,8 мкм у окуня). Возможно, что эти клетки участвуют в защитных реакциях организма, о чем свидетельствует гранулярная структура КРВ, а также их наличие в кроветворных органах и периферической крови рыб.

3.3.4. Хлоридные (ионтранспортирующие) клетки

В почках всех исследованных видов рыб обнаружены клетки (от 7,17x4,82 мкм в пронефросе линя до 18,4x5,3 мкм в мезонефросе плотвы), имеющие сходную структуру с ионтранспортирующими клетками жаберного эпителия костистых рыб (Матей, 1996; Carmona et al., 2004; Kaneko, Katoh, 2004). Для тех и других клеток характерно развитие гладкого эндоплазматического ретикулума (ГЭР) и обилие митохондрий. Основная особенность обнаруженных клеток заключается в присутствии секреторных гранул. Нами показано, что цитоплазма хлоридных клеток ставриды и морского карася содержит большее количество митохондрий по сравнению с пресноводными, что полностью соответствует сведениям о более высоком уровне энергозатрат на поддержание гомеостаза у морских рыб (Наточин, 1976; Матей, 1996; Виноградов, 2000) и свидетельствует о функциональной активности этих клеток. В про- и мезонефросе хлоридные клетки могут располагаться как диффузно в паренхиме органов, так и вокруг кровеносных сосудов и капилляров, а в мезонефросе - вокруг эпителиоцитов канальцев. Такое их расположение в туловищной почке свидетельствует о возможности транспорта ионов из канальцев в клетку и из клетки в кровь через межклеточную жидкость. В совокупности полученные результаты позволяют предположить, что пронефрос помимо основной функции (лимфо- и миелопоэз) в какой-то мере участвует и в ионрегуляторных процессах.

Таким образом, ультраструктура хлоридных клеток у морских окунеобразных отличается от таковой у пресноводных окунеобразных и карпообразных видов. Это отражает различие в способах ионной регуляции и является адаптивными признаками к жизни в воде с различной соленостью.

3.3.5. Бокаловидные (слизистые) клетки

Обнаружены в мезонефросе берша (клетка 20?8 мкм, гранула 1,7?1,3 мкм; FF 77). Они имеют сходную структуру с клетками, описанными для верхних слоев эпидермиса, мочеточников и жаберного и обонятельного эпителиев пресноводных костистых рыб, слизистых оболочек кишечника, трахеи и бронхов млекопитающих (Хэм, Кормак, 1982; Матей, 1996; Гдовский и др., 2007). Известно, что слизь,

выделяемая гранулами этих клеток, предотвращает слущивание эпителия, содержит лизоцим, протеолитические ферменты и антитела против бактериальных антигенов (Хэм, Кормак, 1982; Матей, 1996). Показано, что слизистые клетки в мезонефросе берша располагаются между разрушающимися эпителиоцитами канальца вместе с большим количеством палочковых клеток. Секрет бокаловидных и палочковых клеток близок по своему физико-химическому составу и предохраняет организм от инфекций (Матей, 1996). Скорее всего, эти клетки включены в механизм физиологической регенерации эпителия канальцев.

3.4. Ультраструктура основных отделов нефрона мезонефроса

Почечное тельце является началом нефрона у всех исследованных видов и имеет единый план строения с таковым у высших позвоночных (Гинецинский, 1964; Хэм, Кормак, 1982; Улумбеков, Челышев, 2002). Основное отличие в структуре почечного тельца морского карася и ставриды заключается в утолщении базальной мембраны, развитии в ней фибриллярного слоя и более узкой полостью боуеновой капсулы по сравнению с пресноводными видами. Данные факты говорят о том, что у морских рыб барьер, отделяющий кровь от полости почечного тельца, трудно проницаем для воды, поступающей в результате ультрафильтрации.

Проксимальный отдел канальцев оказался наиболее дифференцированный. Ранее у некоторых видов костистых рыб было обнаружено до 3 типов эпителиоцитов (Винниченко, 1980). У исследованных нами видов описано лишь 2 типа клеток, отличающихся своей морфологией. В качестве критериев выделения различных типов эпителиоцитов выбраны следующие признаки (табл. 3): **1.** Длина эпителиоцитов (клетки I типа выше таковых II типа); **2.** Длина щеточной каемки (клетки II типа образуют более короткую щеточную каемку, чем клетки I типа); **3.** Развитие зоны эндоцитоза (протяженность зоны у клеток I типа больше, чем у клеток II типа); **4.** Наличие секреторных гранул (клетки II типа данные гранулы не образуют).

Эпителиоциты I типа образуют начало проксимального канальца. Это вытянутые, пирамидальной формы клетки (от 11,7?9,3 мкм у морского карася до 18,8?14,3 мкм у судака), плотно прилегающие друг к другу, ядра округлой формы располагаются в базальной части клеток. Зернистая цитоплазма содержит большое количество митохондрий, которые в базальной части клетки располагаются строго вдоль ее продольной оси. Менее упорядоченно эти органеллы лежат в апикальной части эпителиоцитов. У морских видов в эпителиальных клетках I и II типов количество митохондрий больше, чем у пресноводных. В некоторых случаях данный показатель различается в 2–6 раз. От базальной части клеток тянутся складки клеточной мембраны, которые переходят в каналы ГЭР, образующие у морских видов сложные переплетения. Возможно, образование таких переплетений и большое количество митохондрий, находящихся в непосредственной близости с ними, обусловлено, согласно гипотезе Ю.В. Наточина (1976), формированием в эпителиоцитах системы секреции фосфатов, сульфатов и двухвалентных ионов, для которой необходимо большее количество энергии по сравнению с реабсорбцией ионов. Развитие мембраны, переходящей в ГЭР, напрямую связано с этим механизмом, так как ГЭР представляет собой молекулярную основу для работы насосов. Для этого участка нефрона также характерны лизосомы и крупные секреторные гранулы. Функцию гранул связывают с реабсорбцией белка и транспортом Na^+ и Cl^- (Хэм, Кормак 1982; Аминаева, Яржомбек, 1984; Смит, 1986). Функцию лизосом - с экскрецией креатина, органических кислот и чужеродных веществ (Смит, 1986). В околоядерной цитоплазме хорошо различим аппарат

Гольджи. В апикальной части клеток на границе со щеточной каемкой располагается хорошо развитая зона эндоцитоза (от 7,6 мкм у судака до 1,8 мкм у плотвы). Эта зона характеризуется наличием тубуло-везикулярной системы, образованной микропузырьками и короткими сегментами изогнутых тубул, между которыми локализируются микрофиламенты. Показано, что через эту систему транспортируются полисахариды, а также различные ионы (Смит, 1986; Матей, 1996). Щеточная каемка наиболее высокая для этого типа эпителиоцитов и состоит из большого числа микроресничек и микроворсинок, обращенных в просвет канальца (табл. 3). В эпителиоцитах I типа у пресноводных видов диаметр микроресничек больше такового микроворсинок. У ставриды и морского карася микроворсинки толще микроресничек. Ультраструктура микроресничек подобна таковой, описанной для шейного отдела канальца речной миноги *Lampetra fluviatilis* L., лягушки *Rana temporaria* L. и трахеи высших позвоночных (Винниченко, 1980; Улумбеков, Челышев, 2002).

Эпителиоциты II типа по структуре сходны с клетками I типа, но меньше таковых по высоте (от 8,9?3,6 мкм у плотвы до 13,1?9,6 мкм у синца). Большое количество митохондрий характерно и для этого типа эпителиоцитов, что, скорее всего, обусловлено наличием противогradientных сорбционных и секреторных процессов. Лизосомы, по сравнению с клетками I типа, встречаются реже. Признаком эпителиоцитов II типа является отсутствие специфичных гранул, меньшая протяженность зоны эндоцитоза, высота щеточной каемки, больший диаметр микроворсинок по сравнению с таковым у клеток I типа (табл. 3).

Эпителиоциты промежуточного отдела канальцев обнаружены в нефроне синца и судака. Это самые низкие клетки (8,9?6,3 мкм у судака, 10,4?9,9 у синца). Ядра в них располагаются в базальной части, сформированная зона эндоцитоза отсутствует, изредка в цитоплазме встречаются везикулы и микрофиламенты. Особенностью клеток является почти ровная апикальная поверхность с очень редкими и короткими микроворсинками (табл. 3). По сравнению с рассмотренными выше группами эпителиоцитов щеточная каемка этих клеток у синца короче более чем в 3 раза, а у судака – более чем в 8 раз. Диаметр микроворсинок этого участка больше по сравнению с эпителиоцитами I, II типов (табл. 3). Опираясь на литературные данные (Гинецинский, 1964; Винниченко, 1980; Аминова, Яржомбек, 1984) и собственные результаты, можно предположить, что промежуточный отдел канальцев присутствует у всех видов пресноводных костистых рыб, но так как эти клетки ограничивают небольшой отрезок нефрона, то обнаружить и описать их крайне сложно. Структура этих типов эпителиоцитов свидетельствует об аналогии их с клетками тонкого сегмента петли Генле нефронов млекопитающих, основная функция которых – реабсорбция воды (Улумбеков, Челышев, 2002).

Эпителиоциты дистального отдела канальцев – это высокие и очень широкие у основания клетки (от 17,6?7,1 мкм у линя до 10,3?10,1 мкм у гольца), ядро занимает центральное положение, иногда смещено к базальной части. Для цитоплазмы характерно наличие свободных рибосом, хорошо развитого ГЭР, а также большего числа более крупных по сравнению с другими типами эпителиоцитов митохондрий, что, скорее всего, связано с факультативной реабсорбцией воды, осуществляющейся против большего, по сравнению с другими участками канальца, градиента концентрации (Гинецинский, 1964; Смит, 1986). В цитоплазме встречаются лизосомы и аппарат Гольджи, отдельные каналы шероховатого эндоплазматического ретикулума. Кроме того, в клетках морских видов выявлено большое количество везикул, наличие которых, возможно, обусловлено секрецией K^+ в этом участке

канальца, а также более выраженной факультативной реабсорбцией воды по сравнению с пресноводными (Гинецинский, 1964; Смит, 1986). Апикальная часть клеток образует лопастевидные цитоплазматические выросты.

Таблица 3

Средние морфометрические параметры эпителиоцитов и субклеточных структур всех исследованных видов (мкм)

Отдел канальца	Клетка (L?B)	Зона эндоцитоза (L)	Щеточная каемка (L)	Микро ворсинки (d)	Микро реснички (d)
Проксимальный (эпителиоциты I типа)	(14,8±0,48)? (7,53±0,43)	3,53±0,22	3,27±0,16	0,14±0,01	0,24±0,003
Проксимальный (эпителиоциты II типа)	(10,1±0,33)? (7,64±0,48)	1,47±0,09	1,54±0,06	0,20±0,01	0,24±0,003
Промежуточный	(9,68±0,34)? (8,11±0,83)	—	0,40±0,05	0,28±0,05	—
Дистальный	(14,4±0,49)? (10,3±0,42)	—	—	—	—

Примечание: L – длина, B – максимальная ширина, d – диаметр.

Таким образом, выявленные особенности ультраструктуры эпителиоцитов в основных отделах нефрона у пресноводных и морских рыб отражают различия в способах ионной регуляции у данных видов рыб и являются адаптивными признаками к жизни в воде с различной соленостью. Отличия в размерных характеристиках каждого типа эпителиоцитов у разных видов имеют, по-видимому, видовую специфику, тогда как другие признаки (количество и плотность секреторных гранул и лизосом, положение митохондрий, плотность цитоплазмы, различные включения и т.д.) связаны, скорее всего, не с особенностями морфологии различных типов эпителиоцитов, а со степенью функциональной активности клеток. Вне зависимости от среды обитания для всех видов показано сходное изменение длины эпителиоцитов, зоны эндоцитоза, щеточной каемки, диаметра микроворсинок от проксимального к дистальному отделу нефрона (табл. 3).

Анализ структуры про- и мезонефроса морских и пресноводных костистых рыб, принадлежащих к отрядам Карпообразные и Окунеобразные, позволил выявить как общие черты, характерные для всех видов, так и специфичные признаки, сохранившиеся на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях организации и отражающие связь со средой обитания исследованных видов.

Глава. 4. Влияние сублетальных концентраций кадмия на структуру головной и туловищной почек карпа, гольца и окуня

4.1. Изменения в соотношении лейкоцитов пронефроса

Результаты исследований показали, что под действием токсиканта в головной почке карпа, гольца и окуня изменилось соотношение всех рассматриваемых типов клеток, в первую очередь это выразилось в лимфопении, нейтрофилии и эозинофилии.

Колебания соотношения лейкоцитов в пронефросе, по-видимому, могут быть связаны с перераспределением этих клеток между почками и периферической кровью. Увеличение индекса сдвига лейкоцитов (ИСЛ) относительно контроля во время эксперимента свидетельствует об усилении гранулопоэза в головной почке

рыб, скорее всего, связано с развитием воспалительной реакции в органе под действием ионов кадмия (табл. 4). Уменьшение ИСЛ у карпа на 7 сут опыта может быть вызвано не только уменьшением доли незрелых форм гранулоцитов, но и увеличением долей плазматических клеток и лимфоцитов в органе. Ранее было отмечено, что кадмий модифицирует белки организма, в результате чего иммунная система организма рыб воспринимает их как чужеродные, реагируя синтезом антител (Крючков, Бойко, 2002). Как известно, именно плазматические клетки продуцируют на своей поверхности антитела, а лимфоциты «помогают» им реагировать при гуморальном иммунном ответе (Галактионов, 1995).

Следует отметить, что изменения в соотношении лейкоцитов при действии различных концентраций кадмия носят неспецифический характер, выражающийся в снижении числа лимфоцитов и увеличении клеток миелоидного ряда, свидетельствующий об изменении темпов кроветворения и направленности процессов клеточной дифференцировки в сторону усиления миелопоэза. Подобные изменения в соотношении лейкоцитов ранее были показаны при воздействии различных по химической природе токсикантов (Heath, 1995; Лапирова, 2000; Балабанова и др., 2003; Заботкина, Лапирова, 2003, 2004б; Степанова, 2003; Заботкина и др., 2007).

Таблица 4

Индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ)

Срок экспозиции \ Вид рыбы		Карп	Голец	Окунь
		Карп	Голец	Окунь
Контроль		0,96 ²	0,65 ¹	0,99 ¹
Эксперимент	7 сут	0,60 ¹	0,93 ³	2,17 ³
	14 сут	0,88 ^{1,2}	0,86 ^{2,3}	1,61 ²
	21 сут	1,07 ²	0,89 ^{2,3}	—
	28 сут	1,45 ³	0,81 ²	—

Примечание: здесь и далее значения с различными цифровыми индексами для каждого вида достоверно отличаются между контролем и сроками экспозиции ($p \leq 0,05$; ANOVA, LSD тест). Расчет индекса сдвига лейкоцитов, представленного в таблице, указан в главе «Материалы и методы».

4.2. Изменения структуры мезонефроса

Результаты исследований показали, что в норме структура интерстициальной и нефрогенной тканей и ультраструктура клеток почек карпа, гольца и окуня подобна таковой, описываемой в главе 3, а также в работах других авторов (Bielek, 1980a, b; Senini, 1984; Балабанова, 2002). В ходе эксперимента у исследованных видов обнаружено развитие воспалительной реакции, включающей 2 взаимосвязанных процесса: альтерация и экссудация ткани (табл. 5). Показано, что эти процессы имеют строго определенную последовательность.

Основные этапы структурных изменений ренальной ткани мезонефроса и ее клеток при действии сублетальных концентраций ионов кадмия

I этап	<ol style="list-style-type: none"> 1. Повреждение митохондрий 2. Образование ядерной петли в лейкоцитах, опустошение гранул в гранулоцитах (табл. 6) 3. Увеличение количества секреторных гранул, размыкание межклеточных контактов в проксимальных канальцах. 4. Лизис содержимого палочковых клеток 5. Увеличение размеров и количества фагосом в макрофагах 6. Некробиоз клеток лимфомиелоидной ткани (табл. 7) <ol style="list-style-type: none"> а. Гиперемия кровеносных сосудов клубочка, утолщение базальной мембраны боуменовой капсулы б. Инфильтрация нефрогенной ткани эритроцитами, лимфоцитами, нейтрофилами и клетками с радиально расположенными везикулами
II этап	<ol style="list-style-type: none"> 1. Расширение цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулама в лимфоцитах и клетках с радиально расположенными везикулами 2. Разрушение эпителиоцитов проксимального отдела канальцев 3. Размыкание межклеточных контактов и последующее разрушение эпителиоцитов дистальных участков канальцев <ol style="list-style-type: none"> а. Появление лейкоцитов и включений в просвете дистальных канальцев
III этап	<ol style="list-style-type: none"> 1. Разрастание соединительной ткани вокруг разрушенных канальцев 2. Белковая дистрофия лимфомиелоидной ткани

Примечание: цифрами обозначены морфопатологии, входящие в процесс альтерации ткани, буквами – в процесс экссудации.

Таблица 6

Влияние сублетальных концентраций ионов кадмия на интенсивность дегрануляции гранулоцитов в туловищной почке исследованных видов рыб

Вид рыбы		Карп		Голец		Окунь
		эозинофил	базофил	нейтрофил	эозинофил	эозинофил
Срок экспозиции						
Контроль		0,21 ¹	0,08 ¹	0,03 ¹	0,04 ¹	0,07 ¹
Эксперимент	7сут	0,79 ²	0,45 ²	0,20 ²	0,04 ¹	1,23 ³
	14сут	1,25 ²	3,63 ⁴	0,46 ³	0,33 ³	0,31 ²
	21сут	2,90 ³	3,04 ³	4,80 ⁴	0,28 ^{2,3}	—
	28сут	4,37 ³	3,55 ⁴	0,58 ³	0,12	—

Примечание: расчет индекса дегрануляции гранулоцитов, представленного в таблице, указан в главе «Материалы и методы».

Степень развития некробиоза в интерстициальной ткани мезонефроса под действием ионов кадмия (%)

Вид рыбы		Карп (N=10)	Голец (N=10)	Окунь (N=10)
		Срок экспозиции		
Контроль		67,7±2,0 ⁴	79,1±0,9 ⁵	44,4±0,6 ²
Эксперимент	7 сут	66,0±1,7 ⁴	65,5±1,6 ⁴	35,7±0,7 ¹
	14 сут	48,3±2,5 ³	56,7±1,8 ³	35,3±0,7 ¹
	21 сут	35,7±3,9 ²	60,5±1,1 ²	—
	28 сут	37,9±4,3 ²	50,7±3,3 ¹	—

Примечание: в таблице указана доля интерстициальной ткани без некробиотических признаков от общей площади ренальной ткани.

Некоторые из наблюдаемых нами морфопатологий зафиксированы у других видов рыб при различных схемах экспериментов по влиянию токсикантов на почки рыб (Shrivastava, Pandey, 1986; Гамбарян, Лаврова, 1989; Ooi, Law, 1989; Singhal, Jain, 1997; Моисеенко, 1998; Степанова и др., 1998; Madden, Fowler, 2000; Заботкина, Лапинова, 2003, 2004; Drastichova et al., 2003) и указывают на тяжелые функциональные изменения органа и возможной интоксикации рыб вследствие нарушения выведения продуктов обмена. Наше предположение подтверждается ранее обнаруженными нарушениями ионрегулирующей и экскреторной функций почек у некоторых карповых и скорпеновых рыб из районов, загрязненных кадмием (Brown et al., 1984; Griffin, 2001; Julian et al., 2001; Фомин, 2002; Feng et al., 2004).

По мнению С.М. Короткова и И.А. Скульского (1996), основное действие кадмия связано с атакой на сульфгидрильные группы белков мембран и с блокированием дыхательных процессов в митохондриях. Эти данные подтверждаются ультраструктурными исследованиями, проведенными в нашей работе, а также результатами других авторов, где показано, что среди прочих мембранных органоидов митохондрии оказались наиболее чувствительны к действию токсиканта. Обнаружены дегградация митохондрий и образование постмитохондриальных вакуолей в хлоридных клетках жаберного эпителия и иммунокомпетентных клетках пронефроса и селезенки различных видов рыб (Матей, 1996; Балабанова, 1997а, 1998). Повреждение мембран митохондрий возможно связано не только с действием кадмия на белки, но и с гипокальциемией в органе, которая приводит к «вымыванию» кальция из матрикса митохондрий (Матей, 1996; Сарис, Карафоли, 2005; Моисеенко и др., 2006; Hollis et al., 1999).

Увеличение размеров макрофагов за счет увеличения количества и размеров фагосом в этих клетках, наличие разрушенных остатков клеток практически во всех фагосомах указывает на гибель большого числа эритроцитов, а также лейкоцитов лимфоидного и зернистого рядов дифференцировки. Проявление фагоцитирующих способностей гранулоцитов, увеличение количества опустошенных гранул в этих клетках показывает участие гранулоцитов в утилизации поврежденных элементов тканей и подтверждает развитие и некробиотических явлений в лимфомиелоидной ткани мезонефроса у всех исследованных особей уже на ранних сроках воздействия

токсикантом. Гибель клеток лимфомиелоидной ткани позволяет предположить снижение устойчивости рыб к различным заболеваниям. Расширение цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулула в цитоплазме лимфоцитов и клеток с радиально расположенными везикулами возможно связано с усилением синтетической функции в клетках, возникшей в результате воздействия токсиканта и не являющейся специфической реакцией на кадмий. Подобные ультраструктурные изменения иммунокомпетентных клеток в почках и селезенке карпа (*Cyprinus carpio* L.) наблюдали ранее при иммунизации рыб без токсического воздействия поллютантов (Балабанова, Заботкина, 1988; Заботкина, Балабанова, 1989).

Утолщение базальной мембраны боуменовской капсулы, гиперемия сосудов клубочка и как следствие появление в них, а также в просвете капсулы большого количества эритроцитов, нейтрофилов и клеток с радиально расположенными везикулами, эмиграция лимфоцитов из просвета сосудов в проксимальные и дистальные участки канальцев, являются следствием изменения физико-химических свойств пораженных тканей и влекут за собой образование экссудата (Ярыгин, Серов, 1977). Наличие большого количества лейкоцитов и включений, предположительно белковой природы, в просвете канальцев к 14 сут экспозиции в токсиканте согласуется с вышеприведенными данными и подтверждает развитие воспалительного процесса в органе.

Следует отметить, что наши исследования согласуются с ранее опубликованными работами, в которых авторы указывают наибольшую чувствительность проксимальных участков канальцев к действию ионов металла (Bhattacharya et al., 1978; Forlin et al., 1986; Shrivastava, Pandey, 1986; Гамбарян, Лаврова, 1989; Hamilfon et al., 1989; Ooi, Law, 1989; Singhal, Jain, 1997; Madden, Fowler, 2000). Некоторые авторы это явление связывают с тем, что металлотионеины парадоксальным образом усиливают действие кадмия на почки, так как показано, что из-за их низкой молекулярной массы белки проникают сквозь гломерулы и поступают в клетки проксимального канальца, где деградируют в лизосомах, высвобождая связанные ионы, в результате чего происходят тяжелые дегенеративные изменения в проксимальных участках канальцев (Райс, Гуляева, 2003).

Увеличение числа секреторных гранул в цитоплазме эпителиоцитов I типа проксимального отдела канальцев, скорее всего, связано с участием этих органелл в деградации металлотионеинов и удалении кадмия из организма (Olsson, Hogstrand, 1987; Malins, Ostrander, 1994; De Smet et al., 2001; Райс, Гуляева, 2003; Немова, 2005).

Наблюдаемое размыкание межклеточных контактов канальцев нефрона связывают с «вымыванием» кальция из кальциевых сайтов этих контактов (Матей, 1996; Улумбеков, Челышев, 2001).

Таким образом, выявленную нами последовательность изменений в ренальной ткани под действием ионов кадмия можно рассматривать как систему неспецифических реакций на действие большинства токсикантов. Данные изменения могут служить дополнительным гистологическим критерием при проведении мониторинговых исследований по оценке влияния на рыб антропогенных факторов среды.

В главе **«Заключение»** приводятся основные результаты и выводы, полученные в диссертационной работе.

ВЫВОДЫ

1. В мезонефросе костистых рыб доля интерстициальной ткани от общей площади ренальной ткани убывает в ряду: пресноводные карпообразные – пресноводные окунеобразные – морские окунеобразные. Различие в соотношении нефрогенной и интерстициальной тканей является адаптацией, позволившей окунеобразным освоить водоемы с широким диапазоном солености.
2. Соотношение различных форм лейкоцитов в головной почке коррелирует с чувствительностью рыб к дефициту кислорода в воде и не зависит от типа питания и миграционной активности.
3. У пресноводных и морских костистых рыб ультраструктура агранулоцитов, бокаловидных, палочковых клеток и клеток с радиально-расположенными везикулами сходна. Среди клеток миелоидного ряда выявлено 5 типов нейтрофилов и 3 типа эозинофилов по структурным признакам вторичных гранул. Зависимость ультраструктуры гранул от обитания видов в морской или пресной воде не обнаружена.
4. Ультраструктура основных отделов нефрона и хлоридных клеток у морских окунеобразных отличаются от таковой у пресноводных окунеобразных и карпообразных толщиной базальной мембраны боуменовой капсулы, большим количеством митохондрий в эпителиоцитах и хлоридных клетках, большим количеством везикул, а также более развитой системой клеточных мембран и гладкого эндоплазматического ретикулула в эпителиоцитах канальцев. Это отражает различие в способах ионной регуляции и является адаптациями к жизни в воде с различной соленостью.
5. У пресноводных и морских видов рыб длина эпителиоцитов, зоны эндоцитоза и щеточной каемки, диаметр микроворсинок меняются сходным образом от проксимального к дистальному отделу нефрона и являются критерием для выделения двух типов эпителиоцитов проксимального отдела канальцев. Различия же в количестве и плотности секреторных гранул, лизосом, положение митохондрий в цитоплазме эпителиоцитов отражают только их функциональную активность.
6. Негативное влияние кадмия выражается в развитии воспалительной реакции почек, выявленной на клеточном и субклеточном уровнях уже на начальном этапе воздействия. Опустошение специфичных гранул гранулоцитов, расширение цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулула в лимфоцитах и клетках с радиально расположенными везикулами, увеличение количества и размеров фагосом в макрофагах свидетельствуют об усилении секреторной, синтетической и фагоцитарной активности лейкоцитов и способствуют снижению повреждающего эффекта токсиканта. Последовательность проявления выявленных изменений не зависит от концентрации кадмия, вида и возраста рыб.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Назарова Е.А. Влияние сублетальных концентраций кадмия на ультраструктуру лейкоцитов головной и туловищной почек годовиков карпа (*Cyprinus carpio* L.) // Токсикол. вестник. 2007. №1. С. 7–10.
2. Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Назарова Е.А. Влияние ионов кадмия на некоторые морфофункциональные и иммунофизиологические показатели сеголеток речного окуня *Perca fluviatilis* (PERCIFORMES, PERCIDAE) // Вопросы ихтиологии. 2009. Т. 49. №1. С. 117–124.

3. Лапирова Т.Б. Сравнительный анализ иммунофизиологических механизмов реагирования молоди осетра сибирского и карпа обыкновенного на действие кадмия / Т.Б. Лапирова, Е.А. Заботкина, Л.В. Балабанова, **Е.А. Назарова** // Вопр. рыболовства. 2009. Т. 10. № 1 (37). С. 81–91.

Статьи и тезисы конференций в других изданиях

4. Бубенкова Е.В., Назарова Е.А. Действие фенола и нафталина на структуру селезенки и туловищной почки карася серебряного // В сб. Биотехнология – охране окружающей среды. М.: МГУ, 2005. С.68–71.

5. Назарова Е.А. Влияние ионов кадмия на структуру туловищной почки карпа // Мат. докл. XV мол. науч. конф. Сыктывкар, 2004. С. 120–121.

6. Заботкина Е.А., Бубенкова Е.В., Назарова Е.А. Влияние сублетальных концентраций ионов кадмия на структуру иммунокомпетентных органов карпа // Мат. Всер. науч.-практ. конф. «Пробл. иммун., патол. и охраны здоровья рыб». Москва, 2004. С. 92–100.

7. Лапирова Т.Б. Реакция иммунной системы карпа на действие сублетальной концентрации кадмия / Т.Б. Лапирова, Е.А. Заботкина, Л.В. Балабанова, В.Р. Микряков, Е.В. Бубенкова, **Е.А. Назарова** // Мат. Всер. науч.-практ. конф. «Экол. пробл. уникальных природных и антропогенных ландшафтов». Ярославль, 2004. С. 229–234.

8. Назарова Е.А. Влияние сублетальной концентрации кадмия на состояние выделительной системы карпа // Тез. XII междун. конф. студ., аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2005». М., 2005. С. 155–156.

9. Назарова Е.А. Влияние токсикантов различной природы на иммунокомпетентные клетки туловищной почки представителей семейства карповых (Cypriniformes) // Мат. II Всер. науч. конф. «Принципы и способы сохранения биоразнообразия». Йошкар-Ола, 2006. С. 205–206.

10. Назарова Е.А. Изменения тонкой структуры клеток головной и туловищной почек карпа в результате воздействия сублетальной концентрации кадмия // Тез. XIII междун. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. «Ломоносов 2006». М., 2006. С. 164–165.

11. Назарова Е.А., Заботкина Е.А. Возрастные, видовые и экологические особенности состава лейкоцитов головной почки трех видов пресноводных костистых рыб Рыбинского водохранилища // Тез. докл. IX съезда гидробиологического общества РАН. Тольятти, 2006. С. 53.

12. Заботкина Е.А., Назарова Е.А. Сравнительная характеристика лейкоцитарного состава периферической крови и иммунокомпетентных органов пресноводных и морских костистых рыб // Мат. Всеросс. науч.-практич. конф. «Экол. пробл. уникальных природных и антропогенных ландшафтов». Ярославль, 2006. С. 57–60.

13. Заботкина Е.А., Назарова Е.А. Изменение соотношения лейкоцитов в периферической крови и иммунокомпетентных органах сеголеток окуня как показатель загрязнения среды // Тез. докл. конф. «Биоинд. в мониторинге пресноводных экосистем». С-Пб., 2006. С. 57–58.

14. Назарова Е.А., Заботкина Е.А. Влияние сублетальных концентраций кадмия на соотношение и структуру лейкоцитов головной и туловищной почек речного окуня (*Perca fluviatilis* L.) // Мат. межд. науч.-практич. конф. «Пробл. иммун., патологии и охраны здоровья рыб-2». Борок-Москва, 2007. С. 68–72.

15. Назарова Е.А., Заботкина Е.А. Изменение соотношения лейкоцитов в головной и туловищной почках усатого гольца при острой и хронической интоксикациях солями

- кадмия // Мат. 2 науч. конф. с уч. стран СНГ «Совр. проблемы физиол. и биохим. водных организмов». Петрозаводск, 2007. С. 104
16. Nazarova E.A., Zobotkina E.A. Comparative characteristic of kidney cells of freshwater and sea bony fishes (order Perciformes) // XII European Congress of Ichthyology. Croatia. Dubrovnik, 2007. P. 78–79.
17. Назарова Е.А. Влияние сублетальной концентраций кадмия на ультраструктуру клеток туловищной почки речного окуня (*Perca fluviatilis* L.) // Тез. докл XIII Межд. мол. школы-конф. «Биол. внутр. вод». Борок, 2007. С. 47.
18. Заботкина Е.А. Некоторые особенности гуморального и клеточного иммунитета лещей оз. Чашницкое и Рыбинского водохранилища / Е.А. Заботкина, Т.Б. Лапилова, Г.М. Чуйко, **Е.А. Назарова** // Мат. Всер. науч.-практ. конф. «Экол. пробл. уникальных природных и антроп. ландшафтов». Ярославль, 2007. С. 63–68.
19. Назарова Е.А., Заботкина Е.А., Балабанова Л.В. Оценка степени токсичности сублетальных концентраций кадмия для головной и туловищной почек пресноводных костистых рыб // Мат. всер. науч.-практ. конф. «Экол. пробл. уник. природ. и антроп. ландшафтов». Ярославль, 2007. С. 188–193.
20. Назарова Е.А., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. Изменение соотношения лейкоцитов в головной почке карпа, гольца и окуня при хронической интоксикации солями кадмия // Мат. III Всер. конф. по водной токсик., посвящ. пам. Б. А. Флерова. «Антроп. влиян. на водные организмы и экосис.». Ч. 2. Борок, 2008. С. 105–109.
21. Nazarova E.A., Zobotkina E.A. Specific and nonspecific reactions of miesonephros cells of whiskered loach (*Barbatula barbatula* (L.)) at influence of cadmium ions sublethal concentration // XIII European Congress of Ichthyology. Klaipeda. Lithuania, 2009. P. 36–37.
22. Назарова Е.А. Особенности структуры эпителиоцитов канальцев туловищной почки костистых рыб и их взаимосвязь с выполняемыми функциями // Мат. XXVII междун. конф. «Биол. ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европ. Севера». Петрозаводск, 2009. С.380-385.