

**ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ИЗОЛЯЦИИ
НА ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
ЛЕЩА *ABRAMIS BRAMA* НА ПРИМЕРЕ ОЗЕРА ЧАШНИЦКОЕ
И РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА**

© 2017 г. Е.А. Заботкина, Т.Б. Лапирова, Е.А. Флерова*,
Т.Б. Камшилова, Г.М. Чуйко

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН,
пос. Борок, Ярославская обл., 152742*

**Ярославская государственная сельскохозяйственная академия, 150042
E-mail: zabel@ibiw.yaroslavl.ru*

Поступила в редакцию 31.03.2016 г.

В работе исследованы особенности морфофизиологического и иммунологического статуса леща из изолированного бессточного водоема по сравнению с популяцией рыб из проточного водохранилища. Показано влияние длительной изоляции и адаптации к местным условиям существования на уровень белка в плазме крови леща; изучены показатели гуморального и клеточного неспецифического иммунитета, гематологические и генотоксические показатели. Отмечены более низкие значения ряда параметров у рыб из озера по сравнению с рыбами из водохранилища.

Ключевые слова: лещ, *Abramis brama*, общий белок, бактериостатическая активность сыворотки крови, неспецифические иммунные комплексы, клетки крови, микродроза, озеро Чашницкое, Рыбинское водохранилище.

ВВЕДЕНИЕ

Одна из основных задач экологии – изучение динамики структурно-функциональных характеристик популяций в меняющихся условиях внешней среды (Одум, 1986). Пространственно-географическая изоляция части популяции в пределах ареала обитания вида – один из факторов, который может заметно изменить морфофункциональные параметры особей внутри изолированной группы. Кроме того, такая изоляция создает условия для протекания микроэволюционных процессов в отделившейся части популяции за счет отсутствия обмена генетической информацией с исходной. Впоследствии это может привести к дивергенции обеих популяций и послужить началом видообразования. С этой точки зрения исследование морфофункциональных и биохимических изменений у особей

изолированной части популяции в сравнении с этими же параметрами у исходной популяции представляет существенный теоретический интерес.

Примером образования изолированной популяции может служить вселение в 1940-х гг. леща *Abramis brama* из р. Волга в озеро Чашницкое, расположенное на территории Ярославской области и изолированное от Верхневолжских водохранилищ (Озера ..., 1972). Это дало уникальную возможность сравнительного анализа морфофункциональных изменений организма рыб на начальных этапах популяционной изоляции.

Цель исследования – сравнить морфометрические, физиолого-биохимические и иммунологические показатели леща из изолированной популяции оз. Чашницкое и открытой популяции из Волжского плеса Рыбинского водохранилища.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе исследовали выборки леща из оз. Чашницкое и Волжского плеса Рыбинского водохранилища.

Оз. Чашницкое (Чашницы) расположено в южной части Ростовского района Ярославской области ($56^{\circ}56'32''$ с.ш., $39^{\circ}22'43''$ в.д.). Оно имеет овальную форму с длиной по оси с севера на юг 1,18 км и максимальной шириной с востока на запад 0,75 км. Площадь его зеркала – 0,54 км², объем воды – 2,2 км³, средняя и максимальная глубина – 4,1 и 10,0 м соответственно. Особенностью озера является его полная изоляция от ближайших водных объектов. В 1936 г. в озеро из Верхневолжского бассейна был интродуцирован лещ, в настоящее время сформировавший устойчивую локальную популяцию (Озера ..., 1970).

Рыбинское водохранилище ($58^{\circ}30'$ с.ш., $38^{\circ}20'$ в.д.) – одно из самых крупных водохранилищ Волжского каскада, образованное в Молого-Шекснинской низине в период 1941–1947 гг. Его общая длина 250 км, длина и максимальная ширина озерной части – 180 и 60 км, площадь зеркала – 4550 км², объем воды – 25,5 км³ (Буторин и др., 1975; Экологические проблемы ..., 2001).

Для исследования рыб отлавливали неводом в июне–июле 2007 г. Из каждого водоема отбирали по 20 особей в возрасте от 3 до 8 лет, измеряли длину и массу тела. Средние значения их массы и длины тела составили 114 ± 18 и 333 ± 56 г и $17,7 \pm 0,8$ и $24,0 \pm 1,4$ см для оз. Чашницкое и Рыбинского водохранилища соответственно.

Сразу после отлова после каудэктомии у рыб собирали кровь для получения сыворотки и делали мазки. Далее рыб вскрывали, выделяли и взвешивали иммунокомпетентные органы (почки, селезенку, печень), делая мазки-отпечатки для последующего анализа состава и соотношения лейкоцитов.

Индекс морфофункционального состояния (упитанность) по Фультону и индексы органов рассчитывали по общепринятой методике (Смирнов и др., 1972).

Концентрацию общего белка в сыворотке крови определяли рефрактометрически (Методические указания ..., 1999). Оценку бактериостатической активности сыворотки крови (БАСК) проводили нефелометрическим методом (Смирнова, Кузьмина, 1966), результаты выражали в процентах угнетения роста тест-культуры бактерий в среде, содержащей сыворотку крови, по сравнению с контролем, где в среду вместо сыворотки добавлен физраствор; содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) – стандартным методом путем осаждения с полиэтиленгликолем (Гриневич, Алферов, 1981).

Для исследования состава лейкоцитов периферической крови и иммунокомпетентных органов приготавливали мазки крови и мазки-отпечатки головного и туловищного отделов почек, селезенки и печени только от половозрелых рыб (от 10 особей из каждого водоема). Стекла фиксировали в течение 15–20 мин в этиловом спирте и окрашивали по Романовскому–Гимза. Подсчитывали по 200 лейкоцитов в крови и каждом органе. При определении типов лейкоцитов использовали классификацию Ивановой (1983), результаты подсчета выражали в процентах. Подсчет тромбоцитов проводили относительно общего количества клеток белой крови и также выражали в процентах.

Фагоцитарную активность нейтрофилов, позволяющую оценить интенсивность неспецифических клеточных защитных механизмов, оценивали по степени образования гранул диформаза в тесте с нитро синим тетразолиевым красителем при спонтанном и активированном фагоцитозе по методу Герасимова и Игнатова (2001), модифицированному нами для рыб (Заботкина и др., 2009). В зависимости от активности образования гранул в цитоплазме клеток нейтрофилы распределили в четыре группы: 0 – отсутствие гранул диформаза в цитоплазме клетки; 1–3 – гранулы занимают соответственно менее 1/3 площади клетки, от 1/3 до 2/3 и более 2/3 площади клетки.

Долю активированных нейтрофилов рассчитывали как отношение количества нейтрофилов в группах 1–3 к общему количеству подсчитываемых клеток, выраженное в процентах.

Индекс активации нейтрофилов (ИАН) определяли по общепринятой формуле (Герасимов, Игнатов, 2001): $ИАН = (0N_0 + 1N_1 + 2N_2 + 3N_3)/100$, где N_0-N_3 – количество нейтрофилов с активностью 0–3 балла соответственно.

Микроядерный тест, являющийся одним из приоритетных методов определения генотоксичности воды и способный дать оценку изменениям, которые происходят в хромосомном аппарате рыб под воздействием различных факторов, проводили на тех же мазках крови. Подсчет микроядер в эритроцитах осуществляли с помощью микроскопа МБИ-3 с иммерсионным объективом при увеличении $\times 630$. Подсчитывали не менее 1000 клеток на каждом мазке, результаты

представляли в промилях (Сычева и др., 2003).

Результаты представлены в виде средних и их ошибок, для оценки достоверности использован *t*-критерий Стьюдента при $p \leq 0,05$ (Sokal, Rohlf, 1995).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследования показали, что лещи оз. Чашницкое отличаются от особей из Рыбинского водохранилища по ряду показателей. Коэффициент упитанности, а также индексы иммунокомпетентных органов у лещей из оз. Чашницкое достоверно ниже, чем у леща из Рыбинского водохранилища (табл. 1).

Концентрация общего белка в сыворотке крови исследованных групп рыб была практически одинаковой (табл. 2). Защитные свойства сыворотки крови леща из водохранилища оказались более чем в три раза выше, чем у озерных рыб. При этом треть

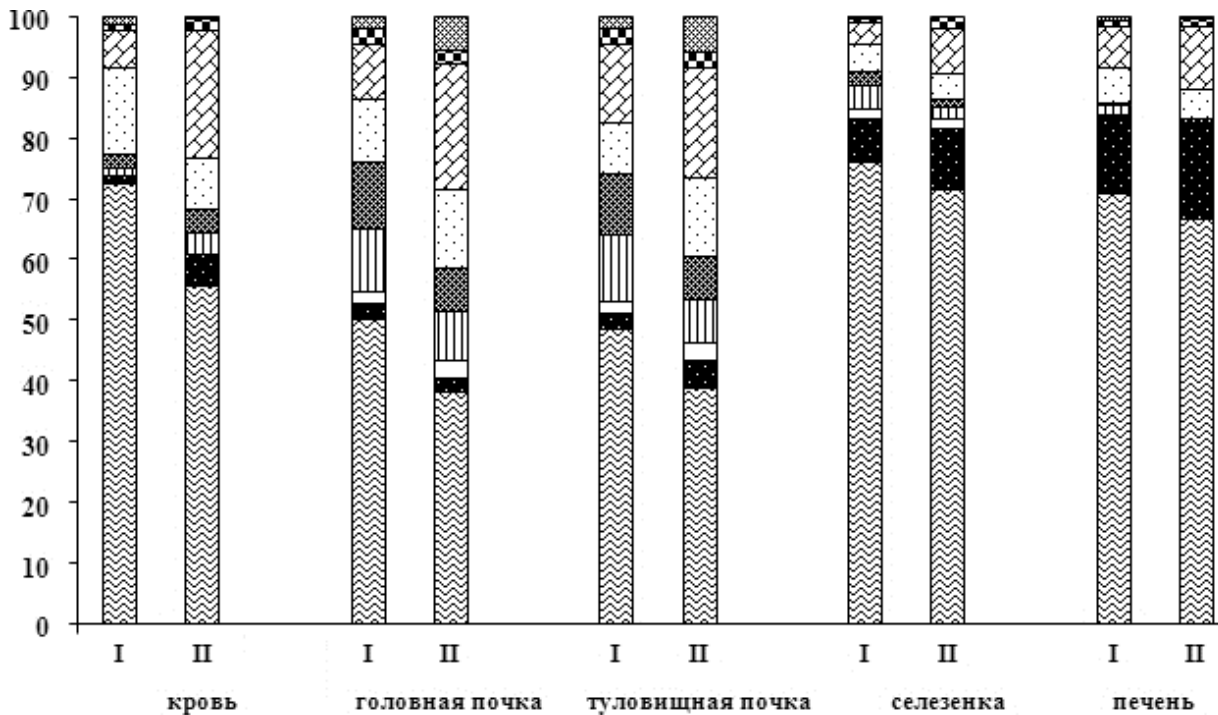
Таблица 1. Морфофункциональные показатели леща исследованных водоемов

Показатель	Оз. Чашницкое	Рыбинское водохранилище
Коэффициент упитанности	$1,81 \pm 0,03^*$	$2,00 \pm 0,06$
Индекс органов, ‰:		
почка	$4,24 \pm 0,31^*$	$8,71 \pm 0,49$
селезенка	$2,20 \pm 0,08^*$	$3,77 \pm 0,29$
печень	$10,65 \pm 0,29^*$	$17,77 \pm 1,33$

Примечание. *Здесь и в табл. 2–3 обозначены различия между значениями, достоверные при $p \leq 0,05$.

Таблица 2. Иммунофизиологические показатели сыворотки крови леща

Показатель	Оз. Чашницкое	Рыбинское водохранилище
Общий белок, г%	$2,59 \pm 0,08$	$2,66 \pm 0,12$
Бактериостатическая активность сыворотки крови, %	$17 \pm 8^*$	61 ± 12
Доля иммунодефицитных особей, %	33^*	0
Циркулирующие иммунные комплексы, усл. ед.	15 ± 6	25 ± 5



Соотношение лейкоцитов в периферической крови и иммунокомпетентных органах лещей из оз. Чашницкое (I) и Рыбинского водохранилища (II): (~~~~) – лимфоциты, (■) – моноциты, (□) – плазмоциты, (||||) – гемоцитобласты, (.....) – промиелоциты, (▧) – миелоциты, (▨) – палочкоядерные нейтрофилы, (▩) – сегментоядерные нейтрофилы, (▪) – эозинофилы.

Таблица 3. Доля активированных нейтрофилов (ДАН), индекс активности нейтрофилов (ИАН) и частота встречаемости эритроцитов с микроядрами в периферической крови лещей из разных водоемов

Показатели	Оз. Чашницкое	Рыбинское водохранилище
ДАН, %:		
спонтанных	25±4	27±7
индуцированных	46±12	38±14
ИАН, усл.ед.:		
спонтанных	0,33±0,07*	0,52±0,09
индуцированных	0,77±0,23	1,07±0,18
Количество микроядер, ‰	2,61±0,30*	1,11±0,35

рыб из оз. Чашницкое оказалась иммунодефицитной, т.е. сыворотка крови у них не подавляла рост тест-бактерий, в то время как сыворотка у особей из водохранилища была активна у всех исследованных лещей.

Уровень ЦИК лещей в озере был ниже, чем в водохранилище, однако эти различия статистически не значимы.

Соотношение лейкоцитов у рыб исследуемых популяций отличалось. Рыбы из озера в периферической крови имели более высокие доли тромбоцитов, лимфоцитов и метамиелоцитов, но более низкие доли зрелых форм нейтрофилов. В иммунокомпетентных органах наблюдалась сходная картина: относительное количество лимфоцитов было

выше, а палочко- и сегментоядерных нейтрофилов — ниже у лещей из озера по сравнению с рыбами из водохранилища (рисунок).

Рыбы из озера и водохранилища обладали сравнимыми долями активных нейтрофилов (ДАН) при спонтанном фагоцитозе, но особи из озера имели более высокие показатели при активированном фагоцитозе, тогда как ИАН у них был ниже (табл. 3).

Встречаемость микроядер в эритроцитах, отражающая частоту нарушений процесса митоза вследствие разрыва хромосом или повреждения веретена деления под действием различного рода мутагенов, у озерных лещей достоверно выше по сравнению с рыбами из водохранилища (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Лещ относится к наиболее многочисленному промысловому виду рыб в каскаде Волжских водохранилищ. Популяции леща, обитающие в разных водоемах, имеют некоторые отличия, связанные с адаптацией рыб к условиям среды — температурному режиму, обеспеченностью пищей, качеству воды и т.д. (Экологические проблемы ..., 2001).

Полученные в нашей работе результаты свидетельствуют о том, что рыбы из оз. Чашницкое и из водохранилища имеют достоверные различия по ряду параметров, в первую очередь, морфометрических.

Индексы органов являются весьма информативными показателями, но при этом необходимо учитывать их зависимость от многих факторов, таких как видовая принадлежность, физиологическое состояние, условия обитания рыб и ряда других.

Большое влияние на состояние органов леща оказывает уровень антропогенной нагрузки на водоем, природа загрязняющих его веществ, их концентрация и продолжительность воздействия. Как было показано на примере солей тяжелых металлов (Лапирова, 2001), на начальных этапах воздействия токсикантов на организм рыбы происходит рост значений индексов селезенки и печени, что, скорее всего, вызвано развитием

воспалительного процесса в органах. Далее в зависимости от условий среды эти показатели возвращаются к исходным величинам либо опускаются ниже (Лапирова, 2001).

Как уже указывалось, относительная масса внутренних органов рыб в немалой степени зависит, помимо прочего, от кормовой базы водоема. Так, установлено, что индексы печени и селезенки снижаются при недостатке пищевого рациона рыб (Смирнов и др., 1972). В отсутствие выраженной токсической нагрузки, как в рассматриваемом нами случае, причина разницы значений показателей кроется, скорее всего, в более бедной кормовой базе рыб из оз. Чашницкое. Подтверждением данного предположения служит и достоверно более высокий уровень упитанности леща из водохранилища по сравнению с озерным.

Несмотря на явные различия упитанности и относительной массы органов рыб разных водоемов, уровень общего белка сыворотки в обеих группах рыб очень близок. Это свидетельствует о том, что за столь длительный срок озерная популяция леща хорошо адаптировалась к условиям существования и поддерживает уровень обмена веществ на свойственном уровне.

Параметры гуморального звена неспецифического иммунитета у лещей из озера также оказались значительно ниже, чем у рыб из водохранилища. Низкие значения БАСК и высокая доля иммунодефицитных особей, выявленных у озерных лещей, свидетельствуют об ослаблении защитных свойств крови. Причиной сходного явления, обнаруженного у рыб из оз. Неро (Микряков и др., 2004), считают комплекс неблагоприятных факторов: в этом малопроточном эвтрофном озере выявлено высокое содержание пестицидов. В отличие от оз. Неро оз. Чашницкое относят к параолиготрофным, с крайне низкими уровнями минерализации (14–15 мг/л) воды и биологического потребления кислорода (Озера ..., 1970). Сопоставляя эти данные и учитывая отсутствие источников загрязнения в оз. Чашницкое стоками промышленных или сельскохозяй-

ственных предприятий, можно заключить, что длительное существование в изолированной, бедной пищевыми ресурсами экосистеме оказывает столь же неблагоприятное воздействие на общую резистентность рыб, как и загрязнение водоема.

Отсутствием антропогенного пресса объясняется низкий уровень ЦИК у лещей из озера. В то же время, несмотря на то что лещ из водохранилища испытывает большую токсическую нагрузку, его иммунная система справляется с ней, не позволяя иммунным комплексам задерживаться в кровяном русле и своевременно нейтрализуя их, что и объясняет отсутствие достоверной разницы в значениях ЦИК у особей из разных водоемов. Данное явление — более высокий уровень напряженности врожденного иммунитета у рыб из загрязненных участков по сравнению с более благополучным районом — было описано ранее для леща из Рыбинского водохранилища (Лапирова, Заботкина, 2010).

Обнаруженные более высокие доли лимфоцитов и более низкие — гранулоцитов у рыб из озера также указывают на то, что антропогенная нагрузка на этот водоем значительно ниже. Подобные различия в соотношении белых клеток крови рыб отмечены нами ранее для отличающихся по уровню загрязнения плесов Рыбинского водохранилища (Лапирова, Заботкина, 2005, 2010). Сходный характер изменения показателей отмечен и Минеевым (2007) в крови рыб Саратовского водохранилища. Вместе с тем меньшая доля нейтрофилов и более низкие показатели фагоцитарной активности клеток крови леща из озера Чашницкое в свою очередь свидетельствуют об ослаблении неспецифических защитных функций организма.

Выявленное в клетках озерного леща содержание микроядер в эритроцитах укладывается в рамки спонтанного мутагенеза для костистых рыб (от 0,05 до 0,40%) (Jaylet et al., 1986; Grinfeld et al., 1986; Tates, 1992; Захидов, 1993). Обнаруженные различия в показателях микроядерного теста отражают

частоту нарушений митотических делений клеток красной крови.

Известно, что на частоту хромосомных аберраций влияют мутагены различной природы: полихлорбифенилы, дихлорофос и кадмий (Гришанин и др., 1993, Изюмов и др., 2003а), промышленно загрязненные воды (Изюмов и др., 2003б). Поэтому более высокое содержание микроядер в клетках леща из озерной популяции может свидетельствовать как о присутствии в среде факторов, вызывающих хромосомные нарушения, так и о накоплении рецессивных мутаций при длительной изоляции популяции (более 70 лет) и отсутствии дрейфа генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение физиолого-биохимического статуса лещей из оз. Чашницкое и Волжского плеса Рыбинского водохранилища выявило различия ряда показателей иммунофизиологического состояния рыб открытой и изолированной популяций. Это может быть обусловлено гидрохимическим режимом водоемов, степенью развития кормовой базы, уровнем антропогенной нагрузки, а также длительной изоляцией популяции леща из озера, которая могла привести к постепенному выщеплению рецессивных мутаций, ухудшающих иммунофизиологическое состояние рыб. Несомненным остается необходимость дальнейших исследований, позволяющих прояснить причины обнаруженных различий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Буторин Н.В., Зминова Н.А., Курдин В.П. Донные отложения верхне-волжских водохранилищ. Л.: Наука, 1975. 160 с.
- Герасимов И.Г., Игнатов Д.Ю. Функциональная неравнозначность нейтрофилов крови человека: генерация активных форм кислорода // Цитология. 2001. Т. 43. № 1. С. 432–436.
- Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови

- онкологических больных // Лаб. дело. 1981. № 8. С. 493–496.
- Гришанин А.К., Степанова В.А., Павлов Д.Ф., Чуйко Г.М. Изучение мутагенного действия дихлорофоса, кадмия и нафталина на эритроциты тилапии (*Oreochromis mossambicus* Peters) при помощи метода учета микроядер // Генетика. 1993. Т. 29. № 7. С. 1213–1217.
- Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Назарова Е.А. Влияние ионов кадмия на некоторые морфофункциональные и иммунофизиологические показатели сеголеток речного окуня *Percia fluviatilis* (Perciformes, Percidae) // Вопр. ихтиологии. 2009. Т. 49. № 1. С. 117–124.
- Захидов С.Т., Урываева И.В., Маршак Т.Л. и др. Цитогенетический мониторинг Южного Приаралья. Оценка генотоксической активности воды // Изв. РАН. Сер. биол. 1993. № 1. С. 95–101.
- Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1983. 184 с.
- Изюмов Ю.Г., Таликина М.Г., Чеботарева Ю.В., Чуйко Г.М. Влияние ароклора 1254 на эмбриональную гибель, количество микроядер и митоз в родительском и первом поколениях плотвы *Rutilus rutilus* (L.) // Биология внутр. вод. 2003а. № 4. С. 85–90.
- Изюмов Ю.Г., Таликина М.Г., Чеботарева Ю.В. Количество микроядер в эритроцитах периферической крови плотвы *Rutilus rutilus* (L.) и леща *Abramis brama* (L.) Рыбинского и Горьковского водохранилищ // Там же. 2003б. № 1. С. 98–101.
- Лапирова Т.Б. Влияние сублетальных концентраций ртути, меди и кадмия на иммунофизиологическое состояние молодки ленского осетра // Там же. 2001. № 3. С. 80–84.
- Лапирова Т.Б., Заботкина Е.А. Сравнительная характеристика иммунофизиологического состояния рыб из различных по степени загрязнения участков Рыбинского водохранилища // Матер. Всерос. науч.-практ. конф. «Эпизоотологический мониторинг в аквакультуре: состояние и перспективы». М.: Россельхозакадемия, 2005. С. 53–56.
- Лапирова Т.Б., Заботкина Е.А. Сравнительный анализ показателей иммунофизиологического состояния лещей из различных по степени загрязнения участков Рыбинского водохранилища // Биология внутр. вод. 2010. № 2. С. 86–92.
- Методические указания по определению уровня естественной резистентности и оценке иммунного статуса рыб. М.: Минсельхозпрод, 1999. 38 с.
- Микряков В.Р., Попов А.В., Половкова С.Н. Структурно-функциональные изменения в иммунной системе рыб оз. Неро в связи с загрязнением воды пестицидами // Матер. Всерос. науч.-практ. конф. «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб». М.: Россельхозакадемия, 2004. С. 132–143.
- Минеев А.К. Морфологический анализ и патологические изменения структуры клеток крови у рыб Саратовского водохранилища // Вопр. ихтиологии. 2007. Т. 47. № 1. С. 93–100.
- Одум Ю.П. Экология. М.: Мир, 1986. Т. 1. 328 с.
- Озера Ярославской области и перспективы их хозяйственного использования / Под ред. Рохмистрова В.Л. Ярославль: ЯГПУ, 1970. 388 с.
- Смирнов В.С., Божко А.М., Рыжков Л.П., Добринская Л.А. Применение метода морфофизиологических индикаторов в экологии рыб // Тр. Сев. НИИ озёр. и реч. хоз-ва. 1972. Т. 7. 169 с.
- Смирнова О.В., Кузьмина Т.А. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом нефелометрии // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1966. № 4. С. 8–11.
- Сычева Л.П., Журков В.С., Рахманин Ю.А. Новый подход к диагностике мутагенных и канцерогенных свойств факторов окружающей среды // Гигиена и санитария. 2003. № 6. С. 87–91.

Экологические проблемы Верхней Волги / Под ред. Копылова А.И. Ярославль: ЯГТУ, 2001. 427 с.

Grinfeld S., Jaylet A., Siboulet R. et al. Micronuclei in red blood cells of the newt *Pleurodeles waltl* after treatment with benzo[a]pyrene: dependence on dose, length of exposure post-treatment time and uptake of the drug // Environ. Mutagenesis. 1986. V. 8. P. 41–51.

Jaylet A., Deparis P., Gaschignard D. Induction of micronuclei in peripheral eryth-

rocytes of axolotl larvae following *in vivo* exposure to mutagenic agents // Mutagenesis. 1986. V. 1. P. 211–215.

Sokal R.R., Rohlf F.J. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research N.Y.: Freeman and Co., 1995. 850 p.

Tates A.D. Validation studies with the micronucleus for early spermatids of rats. A tool for detecting clastogenicity of chemicals in differentiating spermatogonia and spermatocytes // Mutagenesis. 1992. V. 7. P. 411–419.

**THE EFFECT OF ENVIRONMENTAL INSULATION
ON IMMUNOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS
IN BREAM *ABRAMIS BRAMA* AT THE EXAMPLE
OF LAKE CHASHNITSKOE AND RYBINSK RESERVOIR**

© 2017 г. Е.А. Zabotkina, Т.В. Lapirova, Е.А. Flerova*,
Т.В. Kamshilova, G.M. Chuyko

*I.D. Papanin Institute of Biology from Inland Waters of RAS,
Borok, Yaroslavl region, 152742*

** Yaroslavl State Agricultural Academy, 150042*

The features of morphophysiological and immunological parameters of bream populations from the isolated drainless reservoir in comparison with population of fishes from a flowing reservoir were research. The effects of prolonged isolation and adaptation to local conditions of existence the levels of protein in the blood plasma, humoral and cellular innate immunity, hematology and genotoxic parameters were shown. Lower parameters in fish from the lake, compared with fish from the reservoir were marked.

Keywords: bream, *Abramis brama*, total protein, bacteriostatic activity of blood serum, nonspecific immune complexes, blood cells, micronuclei, lake Chashnitskoe, Rybinsk reservoir.