

## СЕЗОННІ ТА ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ КОРОПА (CYPRINUS CARPIO L)

*І. З. Дрогомирецька, М. А. Мазена*

Прикарпатський національний університет ім. В. Стефаника

*У препаратах периферійної крові Cyprinus carpio виявлені всі основні типи клітин, що беруть участь в імунній відповіді у вищих хребетних тварин. Встановлені сезонні та вікові особливості лейкоцитів крові риб. У периферійній крові риб, крім зрілих лейкоцитів, присутні і молоді форми клітин, які відрізняються за морфологічними характеристиками. Серед гранулоцитів риб в усі пори року переважали нейтрофіли. Найбільшого значення досягав відсотковий вміст лімфоцитів у формулі крові в однорічних та дворічних особин в усі пори року. Дослідження показників імунітету риб служать для передбачення екологічних змін біогеоценозів. При цьому картина периферійної крові риб представляє надзвичайно інформативний матеріал.*

**Ключові слова:** КОРОП, ЛЕЙКОЦИТАРНА ФОРМУЛА, ПЕРИФЕРІЙНА КРОВ, ГРАНУЛОЦИТИ, АГРАНУЛОЦИТИ, СЕЗОН, ВІК, ІМУННА СИСТЕМА.

Імунна відповідь є комплексом реакцій, спрямованих на відновлення цілісності внутрішнього середовища організму після дії чужорідних агентів молекулярної, надмолекулярної і клітинної організації, а також на знищення власних змінених клітин або їх продуктів. Імунні реакції включають розпізнавання «чужого», видалення його і запам'ятовування. У риб є всі необхідні для розвитку імунної відповіді елементи, що властиві вищим хребетним, проте середовище життя визначає характерні особливості імунітету водних тварин.

Характерною особливістю крові риб є те, що в них у периферійній крові поряд із зрілими лейкоцитами знаходяться і молоді форми лейкоцитів, які відрізняються за величиною, формою і будовою ядер, за розміром цитоплазми і наявністю зернистості в них, за здатністю зафарбовуватися кислими і основними барвниками.

У крові коропа розрізняють 7 груп лейкоцитів на різних стадіях цитогенезу: 5 груп гранулоцитів — нейтрофіли, еозинофіли, псевдоеозинофіли, базофіли, псевдобазофіли і 2 групи агранулоцитів — моноцити і лімфоцити. Крім того, у крові зустрічаються бластні форми: гемоцитобласти, мієлобласти, промієлоцити, мієлоцити і метамієлоцити. Як видно, в імунній системі риб представлені всі типи клітин, що беруть участь в імунних реакціях у вищих хребетних тварин.

Дослідження показників імунної системи риб не тільки представляє матеріал для виявлення нових філогенетичних зв'язків між різними групами тварин, але і служить вирішенню практичних завдань, таких як ефективне промислове розведення риб, екологічне моделювання і передбачення змін екологічної обстановки біогеоценозів.

Успішний розвиток рибного господарства у нас в країні пов'язаний з вирощуванням традиційного об'єкту розведення — коропа, який вражається багатьма інфекційними, інвазійними і незаразними хворобами. Тому, для оцінки фізіологічного стану риб і при діагностиці захворювань необхідно знати картину крові за нормальних умов існування [1].

Показники імунологічних параметрів риб являються чутливими біомаркерами, серед яких стан лейкоцитів периферійної крові посідає одне з чільних місць.

Дані літератури, про особливості складу периферійної крові риб, вказують на суттєві сезонні, вікові і навіть статеві особливості [2]. Склад периферійної крові значно коливається в межах виду, на що вказують більшість авторів [3]. Деякі автори встановили сезонні коливання [4], інші автори це заперечують [2]. У зв'язку з цим. метою роботи було вивчення

морфологічних особливостей лейкоцитів периферійної крові коропа в залежності від сезону та віку.

### Матеріали і методи

У роботі використовували рибу, виловлену з штучних водойм Прикарпаття. Дослідження проводили на *Surginus caprio* в осінній, зимовий, весняний та літній періоди у однорічних та дворічних особин (кількість однорічних особин — 29, кількість препаратів — 58, кількість дворічних особин — 29, кількість препаратів — 58).

Із хвостової артерії кров забирали за допомогою шприца. Невелику краплю крові наносили на край предметного скла для виготовлення тонкого мазка крові. Після висушування мазків проводили фіксацію й фарбування препаратів, використовуючи еозин за Май-Грюнвальдом та азур-еозин за Романовським. Фарбування, як і фіксацію препаратів, робили відразу після виготовлення й просушки мазка. Необхідно зазначити, що при фарбуванні препаратів крові велике значення мала якість води. Добре пофарбовані мазки виходили тільки в тому випадку, коли реакція води була нейтральною або слаболужною.

Мікроскопіювання пофарбованих препаратів здійснювали під звичайним оптичним мікроскопом Leitz із застосуванням імерсійного об'єктиву, збільшення — 1600. Для підрахунку лейкоцитарної формули крові використовували одинадцятиклавішну рахункову машинку. Підрахунок формених елементів крові починали із середини мазка. Предметне скло пересували поступово: то у вертикальному, то в горизонтальному напрямках. На мазку підраховували двісті клітин білої крові. Форменні елементи крові диференціювали залежно від їхньої приналежності до тих або інших груп клітин. Після цього обчислювали відсотковий вміст клітин.

Для підрахунку кількості лейкоцитів крові використовували камеру Горяєва. Кількість лейкоцитів виражали в тис. шт/мм<sup>3</sup>.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою комп'ютерної програми «MYNOVA». Дані представлені як середнє ± похибка середнього. Для знаходження вірогідної відмінності між досліджуваними групами використовували t-тест Стьюдента»[5].

### Результати та обговорення

Результати підрахунку кількості лейкоцитів периферійної крові показали зниження кількості клітин восени та зимою порівняно із весною та літом (табл. 1). Показники кількості лейкоцитів однорічних та дворічних особин суттєво не відрізнялися.

Таблиця 1

Кількість лейкоцитів (тис. шт/мм<sup>3</sup>) коропа в усі пори року (M±m)

Вік риб	Пора року			
	Осінь	Зима	Весна	Літо
Однорічні особини	79,6±5,7	88,1±10,4	91,1±7,9	95,8±3,0
Дворічні особини	74,9±5,5	95,4±22,2	100,5±4,1	109,8±18,3

Досліджено препарати мазків периферійної крові коропа однорічних і дворічних особин в усі пори року. Як свідчать результати досліджень (табл 2, 3), в осінній та зимовий період у периферійній крові зустрічаються не всі перехідні форми лейкоцитів.

Таблиця 2

Кількість бластних форм лейкоцитів (%) однорічних коропів (M±m)

Пора року	Бластні форми, %				
	Гемоцитобласти	Мієлобласти	Промієлоцити	Мієлоцити	Метамієлоцити
Осінь	1,5±0,2	1,3±0,3	2,0±0,2	0,5±0,2	—
Зима	—	—	0,7±0,4	1,5±0,5	2,8±0,9

Весна	—	—	—	3,0±0,5	7,0±0,9
Літо	—	—	2,0±0,2	4,2±0,2	4,3±0,5

З опрацьованих препаратів периферійної крові гемоцитобласти зустрічалися в однорічних та дворічних коропів восени, а зимою зникали. Інші бластні форми однорічних особи (мієлобласти, промієлоцити, мієлоцити) присутні в периферійній крові восени, однак не виявлено метамієлоцитів. Зимою ж були виявлені метамієлоцити в однорічних коропів, проте зникли мієлобласти. Що стосується дворічних особин, то восени в периферійній крові знайдено мієлоцити та метамієлоцити, а в зимовий період — мієлобласти та метамієлоцити.

На весні та влітку в крові дворічних особин зустрічалися лише мієлоцити та метамієлоцити. В однорічних особин влітку, крім вказаних типів клітин, виявлено ще й промієлоцити (табл. 2, 3).

Таблиця 3

Кількість бластних форм лейкоцитів (%) дворічних коропів (M±m)

Пора року	Бластні форми, %	
	Мієлоцити	Метамієлоцити
Осінь	—	2,3±0,3
Зима	—	1,3±0,4
Весна	4,5±0,5	6,0±0,3
Літо	3,8±0,3	3,3±0,4

Серед гранулоцитів риб переважають нейтрофіли. Ці клітини одними з перших потрапляють в уражені бактеріями тканини, вони завжди багаточислені в зоні запалення. Їх основна функція — виділення речовин, що, по-перше, залучають у зону запалення інші клітини і, по-друге, сприяють елімінації бактерій [6]. Серед клітин нейтрофільного ряду незалежно від сезону, в який проводились дослідження спостерігалась закономірність — з віком кількість паличкоядерних нейтрофілів зростала, а сегментоядерних — знижувалась (табл. 4, 5).

Таблиця 4

Кількість гранулоцитів (%) однорічних коропів (M±m)

Пора року	Гранулоцити, %			
	Паличкоядерні нейтрофіли	Сегментоядерні нейтрофіли	Еозинофіли	Базофіли
Осінь	11,7±1,2	8,5±0,4	—	14,0±1,5
Зима	10,8±0,9	9,7±1,4	—	7,5±0,3
Весна	15,5±0,9	8,5±0,5	3,8±0,4	7,2±0,4
Літо	13,2±1,0	5,8±0,4	4,3±0,4	12,3±0,7

Що стосується еозинофілів, то типових еозинофілів восени та зимою в препаратах одно- та дворічних коропів ми не знаходили. Цей факт співпадає з даними літератури [3]. Кількість базофілів у коропів з віком істотно відрізняється, причому в однорічних коропів восени їх у 2,5 рази більше, ніж зимою; у дворічних коропів спостерігається зворотна закономірність — зимою базофілів у 2,7 рази більше, ніж восени (табл. 5).

Таблиця 5

Кількість гранулоцитів (%) дворічних коропів (M±m)

Пора року	Гранулоцити, %			
	Паличкоядерні нейтрофіли	Сегментоядерні нейтрофіли	Еозинофіли	Базофіли
Осінь	12,3±1,2	12,0±0,8	—	4,5±0,4
Зима	18,3±0,7	10,5±0,7	—	5,6±0,4

Весна	16,5±0,7	5,7±0,2	4,2±0,7	3,7±0,3
Літо	15,2±0,6	—	1,7±0,3	6,5±0,4

Кількість паличкоядерних лейкоцитів навесні та влітку не змінюється, однак, сегментоядерні влітку майже відсутні (0,25 %). В обидві пори року в периферійній крові коропів з'являються еозинофіли (2–3,8 %), які були відсутні в інші пори року. Базофілів в однорічних особин навесні зустрічається вдвічі більше, ніж у дворічних.

Із незернистих лейкоцитів в препаратах крові переважали лімфоцити: 47,0 % — в однорічних та 58,2 % — у дворічних особин восени (табл. 6, 7), які мали різну форму клітини — округлу, овальну або витягнуту. Вони складала найбільший відсоток серед усіх форм лейкоцитів. Різко базофільна цитоплазма цих клітин оточує щільне червоно-фіолетове ядро.

Таблиця 6

Кількість агранулоцитів (%) однорічних коропів (M±m)

Пора року	Агранулоцити, %	
	Моноцити	Лімфоцити
Осінь	3,5±0,8	59,0±1,3
Зима	4,7±0,5	63,0±1,0
Весна	5,4±0,5	49,6±1,6
Літо	5,5±0,4	48,3±1,1

Кількість моноцитів з віком зростала восени і знижувалася зимою. Для цих клітин характерні ексцентрично розміщені, крупні червоно-фіолетові ядра округлої, витягнутої форми з характерним малюнком. Гомогенна сірувато-голубувата цитоплазма моноцитів характеризувалася наявністю азурофільної зернистості і вакуолей.

Таблиця 7

Кількість агранулоцитів (%) дворічних коропів (M±m)

Пора року	Агранулоцити, %	
	Моноцити	Лімфоцити
Осінь	5,5±0,3	63,2±1,2
Зима	6,2±0,5	58,1±0,9
Весна	9,3±0,8	50,3±0,9
Літо	8,0±0,6	61,8±0,7

Популяція лімфоцитів у риб здійснює функцію адаптивного імунітету, як і лімфоцити ссавців. В ній розрізняють субпопуляції, подібні за поверхневими маркерами і функціями до Т- і В-лімфоцитів ссавців [7, 8].

В останні роки за допомогою моноклональних антитіл, специфічних до поверхневих маркерів тимоцитів риб, було підтверджено, що в імунній системі риб існує субпопуляція Т-лімфоцитів, подібних до Т-лімфоцитів вищих хребетних [9].

Таким чином, у риб виявлено всі основні типи клітин, які беруть участь в імунній відповіді вищих хребетних. Це не тільки клітини, які забезпечують реакції вродженого

імунітету — гранулоцити, моноцити, макрофаги, але і лімфоцити, які відповідають за реакції антигенрозпізнаючої системи [10].

## **Висновки**

У препаратах периферійної крові *Cyprinus carpio* виявлені всі основні типи клітин, що беруть участь в імунній відповіді у вищих хребетних: клітини, що опосередковують реакції уродженого імунітету — гранулоцити, моноцити і макрофаги, а також лімфоцити, що відповідають за реакції специфічного розпізнавання антигену.

Встановлені сезонні та вікові особливості лейкоцитів крові риб. Серед гранулоцитів риб в усі пори року переважали нейтрофіли. Найбільшого значення досягав відсотковий вміст лімфоцитів у формулі крові в однорічних та дворічних особин.

Клітини імунної системи кісткових риб наявні в обсязі, достатньому для функціонування всіх механізмів природного і набутого імунітету, характерних для вищих хребетних тварин, проте є ряд морфологічних і фізіологічних особливостей, властивих тільки для риб.

*I. Z. Drogomyretska, M. A. Mazepa*

## **SEASONAL AND AGE-RELATED CHARACTERISTICS OF PERIPHERAL BLOOD LEUCOCYTES OF CARP (*CYPRINUS CARPIO* L)**

### **S u m m a r y**

All main type of cells, that participate in immune response of higher vertebrates, founded in peripheral blood preparations of *Cyprinus carpio*. Seasonal and age-related characteristics blood leucocytes of fish were investigated. In peripheral blood of fishes, except for mature leucocytes present also young forms of cells which differ morphological descriptions. Neutrophiles prevailed among granulocytes of fish blood in all times. Most of value was achieved by the percentage of lymphocytes in the hemogram in one- and two years old fishes during the year. Research of indexes of immunity of fishes serves for the foresight of ecological changes of biogeocenoses. Thus the state of peripheral blood of fishes presents extraordinarily informing material.

Precarpathian National University

*И. З. Дрогомирецкая, М. А. Мазепа*

## **СЕЗОННЫЕ И ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КАРПА (*CYPRINUS CARPIO* L)**

### **А н н о т а ц и я**

В препаратах периферической крови *Cyprinus carpio* обнаружены все основные типы клеток, которые принимают участие в иммунном ответе у высших позвоночных животных. Установлены сезонные и возрастные особенности лейкоцитов крови рыб. В периферической крови рыб, кроме зрелых лейкоцитов, обнаружены и молодые формы клеток, которые отличаются за морфологическими характеристиками. Среди гранулоцитов рыб во все времена года преобладали нейтрофилы. Наибольшего значения достигало процентное содержание лимфоцитов в формуле крови у однолетних и двухгодичных особей во все времена года. Исследования показателей иммунитета рыб служат для предвидения экологических изменений биogeоценозов. При этом картина периферической крови рыб представляет чрезвычайно информативный материал.

1. *Серпунин Г. Г.* Гематологические показатели сеголеток карпа во время зимовки [Текст] : сб. тр. / Серпунин Г. Г. // Калинингр. техн. ин-т рыб. пром.хоз-ва. — 1980. — Вып. 91. — С. 66–69.
2. *Аmineва В. А.* Физиология рыб. [Текст] / Аmineва В. А., Яржомбек А. А. — Москва : «Легкая и пищевая промышленность», 1984. — 200 с.
3. *Иванова Н. Т.* Атлас клеток крови рыб. [Текст] / Иванова Н. Т. — Москва, 1983. — 179 с.
4. *Лукьяненко В. И.* Иммунобиология рыб. Врожденный иммунитет. [Текст] / Лукьяненко В. И. — Москва, 1989. — 269 с.
5. *Brooks S. P. J.* A simple computer program with statistical test analysis of enzyme kinetics [Text] / Brooks S. P. J. // Bio Techniques. — 1992. — P. 906–911.
6. *Weyts F. A. A.* A common carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocyte cell line shares morphological and functional characteristics with macrophages. [Text] / Weyts F. A. A., Rombout J. H. W. M., Flik G., Verburg-Van Kemenade B. M. L. // Fish Shellfish Immunol. — 1997. — 7. — P. 123–133.
7. *Huttenhuis H. B. T.* Carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune factors are present before hatching. [Text] / Huttenhuis H. B. T., Grou C. P. O., Taverne-Thiele A. J., Taverne N., Rombout J. H. W. M. // Fish Shellfish Immunol. — 2005.
8. *Huttenhuis H. B. T.* Rag expression identifies B and T cell lymphopoietic tissues during the development of common carp (*Cyprinus carpio*). [Text] / Huttenhuis H. B. T., Huisin M. O., Van der Meulen T. et. all. // Dev Comp Immunol 29. — 2005. — P. 1033–1047.
9. *Scapigliati G.* Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes[Text] / Scapigliati G., Romano N., Abelli L. // Aquaculture. — 1999. — 172. — P. 3–28.
10. *Huttenhuis H. B. T.* Ontogeny of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune system. [Text] / Huttenhuis H. B. T., Taverne-Thiele A. J., Grou C. P. O. et all // Dev Comp Immunol. — 2005.