

ИММУНИТЕТ ПОЙКИЛОТЕРМНЫХ ГИДРОБИОНТОВ

Г.И. ПРОНИНА, А.А. ИВАНОВ, А.Г. МАННАПОВ, О.В. САНАЯ

(ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

В работе показаны особенности иммунной системы пойкилотермных гидробионтов разных систематических групп: ракообразных, рыб, земноводных. Защитные механизмы ракообразных представлены в основном врожденными неспецифическими факторами включая внешние покровы (в том числе экзоскелет), слизь, физико-химические барьеры, лизоцим гемолимфы, профенолоксидазную систему, фагоцитоз. Выделены 4 типа клеток (гемоцитов) циркулирующей жидкости речных раков: агранулоциты, полугранулоциты, гранулоциты, прозрачные клетки, – каждый из которых выполняет разные функции в процессе иммунной защиты. У рыб отсутствует красный костный мозг и лимфатические узлы, а основными органами гемопоэза являются тимус, селезенка, печень, лимфоидная ткань почек, кишечника, перикарда лимфоидный орган черепной коробки. К гуморальным факторам иммунитета рыб относятся лизоцим, комплемент, иммуноглобулины, С-реактивные белки, интерферон, гемагглютинины лизины, гемолизины. Иммуноглобулины у рыб представлены только IgM- подобными антителами. Центральным органом иммунной системы амфибий является красный костный мозг; периферические органы – почки, тимус, селезенка, лимфопилоидные узлы. В зависимости от особенностей иммунной системы гидробионтов предложены разные методы оценки их гуморального иммунитета (определение фенолоксидазы) и клеточного ответа (по фагоцитозу). Клеточный иммунитет, а именно фагоцитарную активность, предлагается оценивать цитохимическими методами через кислороднезависимые факторы (содержание неферментного лизосомального катионного белка в фагоцитах) и кислородзависимые факторы (по НСТ-тесту с нитросиним тетразолием, который фиксирует образующиеся в процессе респираторного взрыва при стимуляции клеток in vitro цитотоксичные кислородные радикалы).

Ключевые слова: иммунитет, фагоцитоз, гуморальные факторы, лимфомилоидные органы, иммунокомпетентные клетки, гемоциты.

Иммунитет (от лат. *immunitas*) – это способ защиты организма от действия различных веществ и организмов, вызывающих повреждение клеток и тканей, характеризующийся изменением функциональной активности иммунокомпетентных клеток с целью поддержания гомеостаза. Реализуется эта защита с помощью механизмов распознавания и уничтожения генетически чужеродных объектов: микроорганизмов, чужеродных клеток, измененных собственных клеток.

Иммунитет ракообразных. Положение в классификации: класс ракообразные (*Crustacea*) относится к подтипу жабродышащие (*Branchiata*), типу членистоногие (*Arthropoda*).

Иммунная система беспозвоночных не имеет специализированных лимфоидных органов, не включает в себя в качестве компонентов ни иммуноглобулины, ни взаимодействующие субпопуляции лимфоцитов. Тем не менее само существование огромного числа особей и видовое разнообразие ракообразных свидетельствуют о наличии у них эффективных систем иммунной защиты. Защитные механизмы ракообразных полностью зависят от врожденной иммунной системы,

которая активируется, когда ассоциированные с патогеном молекулярные структуры распознаются растворимыми или поверхностными белками клеток хозяина – такими, как лектины, антимикробные, свертывающие и распознающие белки. Они в свою очередь активируют клеточные или гуморальные эффекторные механизмы для уничтожения вторгающихся патогенов [41].

Первой линией обороны у ракообразных служат физико-химические барьеры. Так, слизь раков обладает высокой бактерицидной активностью, задерживает и уничтожает потенциально патогенные микроорганизмы. Твердый наружный скелет (кутикула) препятствует инвазии чужеродного генетического материала не только механически, но и с помощью ферментов. Например, в кутикуле широкопалого речного рака *Astacus astacus* содержатся ингибиторы протеолитических ферментов патогенных грибов, в том числе возбудителя чумы раков *Aphanomyces astaci*. В кутикуле речных раков содержится токсичный фермент фенолоксидаза. Хиноны (продукты реакции, катализируемые фенолоксидазой), черный меланиновый пигмент и промежуточные продукты реакции образования меланина тормозят рост патогенного грибка [41].

При нарушении целостности неспецифических барьеров действует целый ряд взаимосвязанных клеточных и гуморальных защитных механизмов, к которым относятся свертывание гемолимфы и заживление ран, фагоцитоз, инкапсулирование, действие врожденных и индуцибельных антимикробных факторов [2].

Лизоцим является гуморальным фактором врожденного иммунитета у разных таксономических групп животных. Лизоцим (мурамидаза) обладает гидролитическими свойствами и способен расщеплять бета-1,4-гликозидную связь между N-ацетилмурамилом и N-ацетилглюкозаминилом пептидогликана – главного полимера бактериальной клеточной стенки. Идентифицированы три основных типа лизоцима: С (куриный, или обычный), G (гусиный) и I (беспозвоночных). У человека и в белке куриного яйца присутствует главным образом С-тип [26].

Система комплемента представляет собой биохимический каскад, направленный на нарушение целостности чужеродных клеток. В состав системы комплемента входит более 20 белков. Система комплемента есть не только у позвоночных, но и у беспозвоночных животных [38, 51].

А.Г. Васильев с соавт. [1] делает предположение о том, что у беспозвоночных несмотря на отсутствие лимфоцитов и антител, есть свои сложные гомологи самораспознающей адаптивной иммунной системы. Оно основано на эмпирических данных о возможности активной иммунизации беспозвоночных. Авторы считают это косвенным свидетельством приоритета самораспознавания над защитной функцией.

Ракообразные имеют незамкнутую циркуляторную систему, поэтому их выживание возможно при условии наличия системы локального свертывания гемолимфы, сопряженного с постоянно действующими иммунными механизмами распознавания, нейтрализации и элиминации патогенов инфекционной природы.

Одним из гуморальных факторов является фенолоксидаза (РО) и инициирующая ее профенолоксидазоактивирующая система (proPO). ProPO-система состоит из нескольких белков, среди которых ведущими являются рекогносцировочные белки, сериновые протеиназы, их ингибиторы и сама профенолоксидаза. РО (медьсодержащий фермент из класса оксиредуктаз, окисляющий фенольные соединения) обнаружена в гемолимфе и целомической жидкости ракообразных. Фермент катализирует окисление фенолов до хинонов, которые в свою очередь неэнзиматическим путем полимеризуются до меланина (рис. 1). Как промежуточные продукты окисления фенолов, так и меланин, являются токсичными для микроорганизмов соединениями [40].

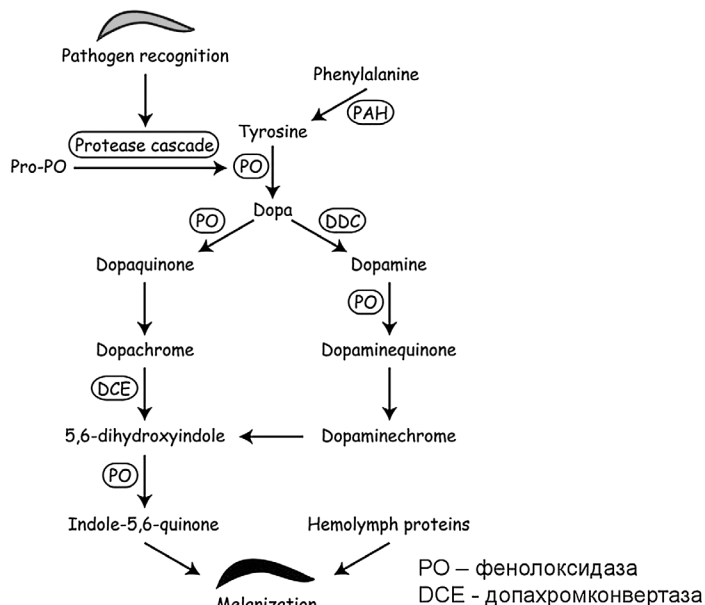


Рис. 1. Синтез меланина [42]

ProPO активируется β -1,3-гликанами низших грибов, липополисахаридами грамотрицательных бактерий и пептидогликанами грамположительных бактерий [41].

С активацией профенолоксидазной системы связывают запуск защитных процессов: фагоцитоз, инкапсуляцию, образование узелков, миграцию и адгезию клеток гемолимфы. Поэтому некоторые паразиты, успешно внедряющиеся в тело животных, часто подавляют именно профенолоксидазоактивирующую систему [42]. Активность proPO- системы также регулируется ингибиторами протеиназ. Например, из плазмы рака *P. leniusculus* выделен высокомолекулярный ингибитор трипсина. Считают, что proPO ракообразных синтезируется в клетках гемолимфы [8].

Гемолимфа, как внутренняя среда ракообразных, проявляет антибактериальную активность. Так, гемолимфа langosta обладает агглютинирующей и бактерицидной активностью по отношению к представителям рода *Vibrio* и штаммам рода *Pseudomonas* [28, 48]. В гемолимфе и гемоцитах креветки *Penaeus japonicus* с помощью моноклональных антител были идентифицированы иммуноактивные белки [36].

У креветок *Penaeus monodon*, в гемолимфу которых вводились штаммы *Escherichia coli* D31, *Vibrio* sp. и зимозан А, обнаружена антибактериальная, бактериолизисная и фенолоксидазная активность гемолимфы [48, 15]. Аналогичные результаты получены при введении креветкам *Penaeus japonicus* возбудителя синдрома белых пятен White Spot Syndrome Virus – WSSV. В результате воздействия вируса у креветок повышается активность фенолоксидазы, гемолизина и пероксидазы [31].

Специальных органов гемопоэза у ракообразных нет, но имеется кроветворная ткань. Она дорсально расположена, окружает глазную артерию, имеет структуру из тонких листов упакованных клеток в дольках, окруженных соединительной тканью [43].

У речных раков описаны 4 типа гемоцитов (Гц): агранулоциты (Гц I), полу-гранулоциты (Гц II), гранулоциты (Гц III) и прозрачные клетки (Гц IV) (рис. 2) [18].

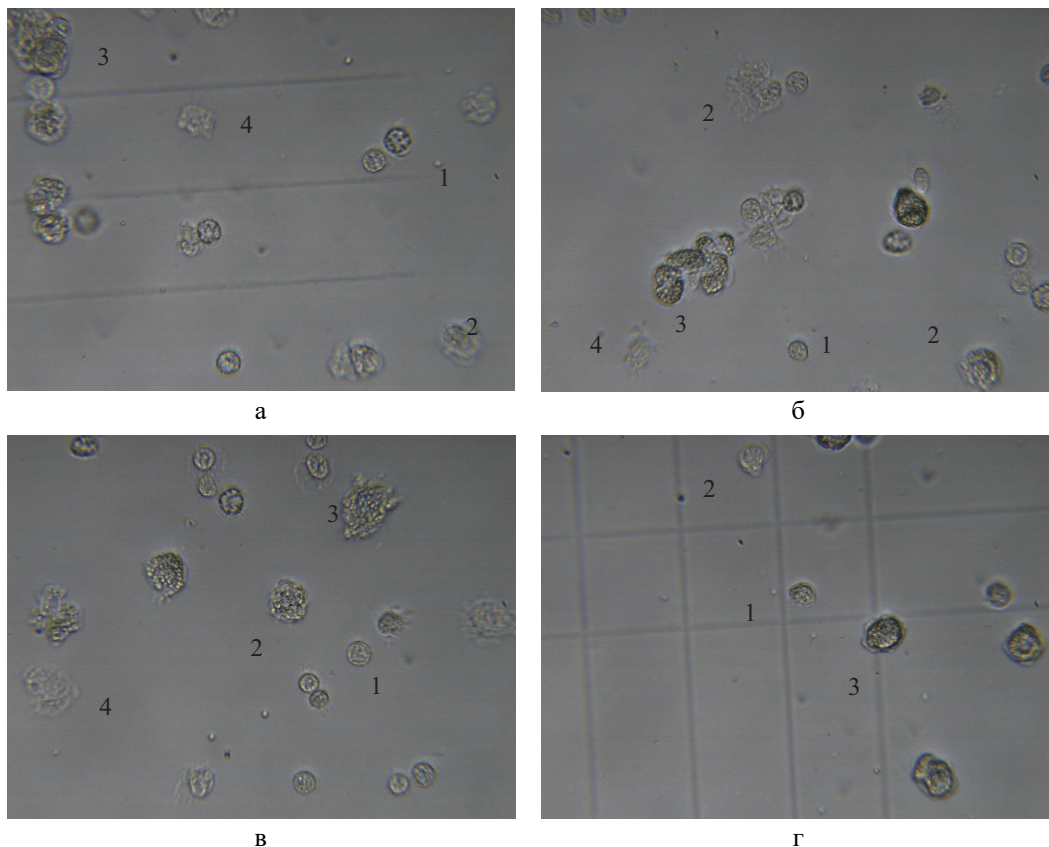


Рис. 2. Гемоциты длиннопалого речного рака (*Pontastacus leptodactylus*) в камере Горяева (увеличение 200):
1 – агранулоциты; 2 – полугранулоциты; 3 – гранулоциты; 4 – прозрачные клетки

Разные типы гемоцитов выполняют неодинаковые функции в процессе иммунной защиты. Мембраны агранулоцитов содержат распознающие рецепторы. При вторжении чужеродных агентов (например, β -1,3-глюканов грибковых или липополисахаридов бактериальных клеток) происходит их распознавание и активация каскада ферментов, которые стимулируют выход proPO-системы из полугранулоцитов и гранулоцитов. Фагоцитоз, инкапсуляция слоями гемоцитов, микробный киллинг, агглютинация осуществляются агранулоцитами и полугранулоцитами (рис. 3) [39].

При воздействии липополисахаридов грамотрицательных бактерий у рака *Procambarus zonangulus* уменьшаются размеры циркулирующих гемоцитов, а также их жизнеспособность [25].

В больших гранулах ГЦ III обнаружен предсердный натрийуретический пептид, который участвует в регуляции водно-солевого баланса, модуляции иммунных реакций, а также влияет на пролиферацию клеток [10].

Относительно противовирусного иммунитета ракообразных известно немного. Отмечено, что вирус синдрома белых пятен WSSV, являющийся серьезным патогеном для водных ракообразных, фагоцитируется в цитоплазме искусственно инфицированного речного рака *Procambarus clarkii*; в ядрах не обнаруживалось ни одной вирусной частицы. В ядра изучаемых гемоцитов и клеток лимфоидного органа креветки *Penaeus vanodoni* был внесен вирус WSSV. После этого вирусы в клетках не были обнаружены, кроме вирусов в ядрах, куда они были привнесены искусственно. Сделан вывод о том, что

гемоциты креветки и речного рака не поддерживают репликацию вируса WSSV [39].

Все компоненты proPO-системы содержатся в гемолимфе и гранулах или мембраносвязанных секреторных узелках-везикулах гемоцитов в неактивном состоянии и активизируются протеолитическим расщеплением пошаговым способом [15]. Активация метаболического каскада proPO ведет в конечном счете к преобразованию профермента профенолоксидазы в активный фермент фенолоксидазу.

У пресноводного рака выделен и проанализирован ряд белков, входящих в proPO систему [15].

Пероксинектин (ПН) является одним из лигандов адгезионных взаимодействий. Именно благодаря адгезии гемоциты формируют капсулы вокруг крупных паразитов и узелки в областях скопления микроорганизмов [41].

Супероксиддисмутаза (СОД) является антиоксидантом, участвует в продукции перекиси водорода. Присоединение ПН к СОД приводит к формированию токсических соединений на поверхности проникших в организм микроорганизмов или паразитов [42].

Маскарадоподобный протеин (МПП) речных раков подобен сериновым протеазам, но у МПП отсутствует протеазная активность. МПП связывает грамотрицательные бактерии и грибы, которые затем обезвреживаются с помощью протеолитических ферментов. МПП предположительно участвует в противопаразитарной защите организма, так как обладает свойством адгезии и опсонизации [34].

Белок, *связывающий β -1,3-глюкан* также обладает адгезивными и опсонизирующими свойствами. С помощью клонирования ДНК показано, что этот белок не имеет гомологии с известными белками. Он синтезируется в форме белка-предшественника, который превращается в зрелый белок путем процессинга N- и C-концевых групп. К структурным признакам белка, связывающего β -1,3-глюкан, относятся две короткие последовательности, сходные с реактивными участками некоторых глюканаз, а также последовательность клеточной адгезии, которая опосредует межклеточные взаимодействия [32, 15].

Другой белок – *α -макроглобулин* – ингибитор широкого набора протеиназ. Оба белка синтезируются клетками гемолимфы. Отличия этого белка от ПН заключается в том, что пероксинектин откладывается в гранулах клеток, α -макроглобулин сразу секретируется в гемолимфу.

К факторам гуморальной защиты ракообразных относят также *бактерицидин* и *лектины* [15].

Многие беспозвоночные обладают способностью к отторжению алло- и ксеногенных трансплантатов. Однако не у всех групп беспозвоночных, способных отторгать

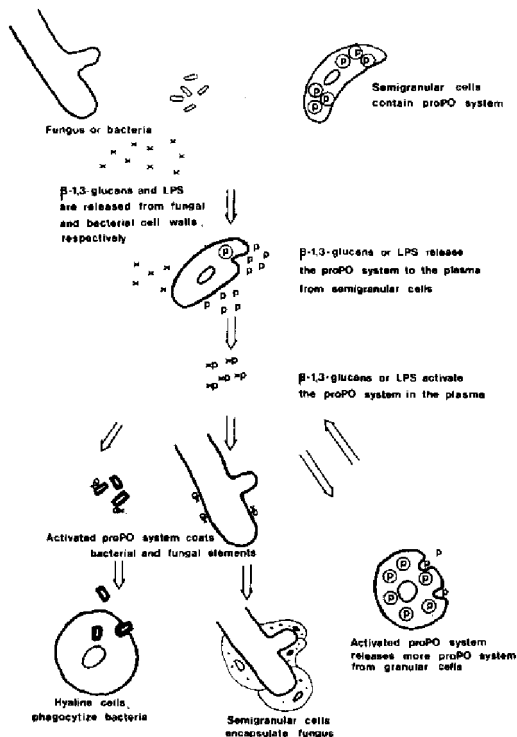


Рис. 3. Схема связи гемоцитов в системе защиты хозяина ракообразных: (p) – proPO; (X) – β -1,3-глюканы или липополисахариды [41]

аллотрансплантаты, эти реакции характеризуются специфичностью и памятью; обычно специфичность их крайне невысока, а память недолговременна [2].

Получены обнадеживающие результаты в борьбе с инфекциями ракообразных при использовании иммунизации и иммуномодуляторов [44].

Иммунитет рыб. Надкласс рыбы относится к подтипу позвоночные (*Vertebrata* или *Craniata*), типу хордовые (*Chordata*) и представлен двумя классами: хрящевые (*Chondrichthyes*) и костные рыбы (*Osteichthyes*).

Иммунная система рыб, как и всех живых организмов, обеспечивает способность противостоять агрессивному влиянию патогенных факторов абиотической и биотической природы. Иммунная система рыб имеет ряд отличий от иммунной системы высших позвоночных животных. У рыб отсутствуют красный костный мозг, лимфатические узлы, фабрициева сумка.

Клеточные элементы иммунной системы рыб, состоящие из клеток лимфоидно-макрофагального комплекса (лимфоциты, моноциты и макрофаги, гранулоциты, клеток Купфера, клеток Лангерганса), организованы в тканевые и органы структуры. К ним относятся тимус, селезенка, печень, лимфоидная ткань головного и туловищного отделов почек, скопления лимфоидной ткани черепной коробки, кишечника, перикарда [15]. У хрящевых рыб, кроме того, роль иммунной защиты выполняют орган Лейдига и эпигональные органы [5].

Тимус (вилочковая железа, зубная – *grandula thymus*) – орган, относящийся по своей структуре и функциям одновременно к эндокринной и лимфоидной системе. У рыб тимус представляет собой оформленный орган, расположенный в пазухах черепа. У рыб так же, как и у высших позвоночных, существует гемато-тимусный барьер. Тимус рыб считается центральным лимфоидным органом, так как именно в нем происходит лимфопоэз. Удаление тимуса у костистых рыб приводит к подавлению гуморального иммунного ответа и задержке отторжения трансплантата [3, 29, 45]. Паренхима тимуса костистых рыб состоит из корковой и мозговой зон. Показано, что пролиферация лимфоцитов происходит исключительно в корковом веществе тимуса [3].

Почки рыб являются одним из главных иммунокомпетентных органов, в них активно протекает гемопоэз [7]. В почках костистых рыб нет четкого разделения на красную и белую пульпу. Паренхиму органа образуют разветвленные ретикулярные клетки, некоторые из которых обладают фагоцитарной способностью. Туловищная почка наряду с иммунной функцией выполняет мочевыделительную функцию. Клетки гемопоэтической ткани расположены в синцитии ретикулярной ткани между петлями нефронов и выделительными канальцами [13].

Селезенка рыб также является органом иммунной системы, содержит большое количество клеток лимфоидного и миелоидного рядов [4, 13].

Печень рыб так же, как и у млекопитающих, многофункциональна и принимает участие в пищеварении, синтезе белков плазмы крови, сохранении гомеостатического баланса, детоксикации, аккумуляции антигенов и выведении их из организма. Лимфомиелоидная ткань рыб в виде прослоек расположена по ходу желчных протоков и вокруг стенок более крупных венозных веток. У карповых рыб по ходу более крупных желчных протоков располагаются участки панкреаса, вращая в печень и образуя *гепатопанкреас* – орган, выполняющий одновременно функции печени и поджелудочной железы [13].

К иммунокомпетентным клеткам у рыб относятся все клетки лимфоидно-макрофагальной системы: лимфоциты, плазмоциты, гранулоциты, макрофаги, эндотелиоциты, клетки Купфера, естественные киллеры. По характеру выполняемой функции они подразделяются на антигенраспознающие, антигенразрушающие,

антителосинтезирующие, клетки памяти. Иммунокомпетентные клетки осуществляют синтез медиаторов иммунного ответа: цитокинов, интерферона, лизоцима, лизосомальных ферментов [12, 13, 50].

Иммуноглобулины у рыб представлены только IgM подобными антителами. Известно, что у теплокровных животных в отличие от рыб иммуноглобулины составляют большое семейство белков 5 классов: IgG, IgM, IgF, IgD, IgE [27].

Количество лейкоцитов и соотношение их популяций в крови рыб зависят от воздействия абиотических и биотических факторов внешней среды, а также от видовых, индивидуальных и возрастных особенностей.

Состояние клеточного иммунитета здоровых рыб разных видов находится примерно на одном уровне, однако имеются видовые и породные особенности. Например, содержание катионного белка в лизосомах нейтрофилов зеркальных карпов выше, чем у чешуйчатых [35].

Бактерицидная активность тканей и циркулирующих жидкостей организма обусловлена комплексным действием лизоцима, комплемента, пропердина, хемокин-подобных и других веществ [15, 22].

Лизоцим поражает бактерии путем встраивания в их мембрану и разрушая ее. У разных видов рыб количество лизоцима в органах и тканях различно. Например, содержание лизоцима в органах карпа значительно ниже, чем у сома обыкновенного (табл. 1).

Таблица 1

Содержание лизоцима в органах рыб, мкг/г [9, 15]

Орган	Карп	Сом
Почки	2,9±0,4	83,3±3,8
Селезенка	1,48±0,17	15,2±1,2
Печень	0,74±0,12	4,9±0,3

Иммунитет земноводных. Класс земноводные (*Amphibia*) относится к подтипу позвоночные (*Vertebrata* или *Craniata*), типу хордовые (*Chordata*).

Иммунная система земноводных состоит из центральных и периферических органов.

К центральным органам относится **костный мозг**, в котором находятся гемопоэтические островки. Выявлено, что у лягушки *Xenopus* костный мозг служит местом дифференцировки нейтрофильных гранулоцитов. У лягушки *Rana pipiens* обнаружена костномозговая лимфомиелоидная ткань, продуцирующая В-лимфоциты [20].

К периферическим органам иммунной системы относят лимфомиелоидные органы и ткани. У бесхвостых амфибий созревание В-клеток начинается в почках и (или) печени. Эти органы непосредственно участвуют в процессах ранней дифференцировки эритроидных, лимфоидных и миелоидных клеток [3].

Тимус состоит из наружной (корковой) и внутренней (мозговой) зоны, продуцирует Т-лимфоциты. В тимусе амфибий обнаруживаются стромальные (полипотентные) клетки, дендритные клетки, макрофаги, гранулоциты, дегенерирующие клетки [3].

Селезенка амфибий по общему строению подобна селезенке млекопитающих. В селезенке *Xenopus* имеются тимусзависимые и независимые лимфоидные зоны [3]. Фолликулы белой пульпы содержат множество В-клеток, присутствующих главным

образом в краевой зоне. Они лишены поверхностных иммуноглобулинов, но связывают анти-Т-клеточные моноклональные антитела.

Показано, что в селезенке у амфибий (как на стадии головастиков, так и на стадии имаго) происходит созревание В-клеток [20].

Лимфомиелоидные узлы в эволюции позвоночных впервые появляются у бесхвостых амфибий: лягушки *Rana*, жабы *Bufo*. У хвостатых амфибий и шпорцевых лягушек *Xenopus* они отсутствуют [3]. Лимфомиелоидные узлы амфибий на всех стадиях онтогенеза от головастиков до взрослых особей отличаются от аналогов млекопитающих тем, что служат в основном фильтрующими кровь органами, хотя могут захватывать материал и из окружающей лимфы. В них локализуются клетки, продуцирующие антитела. Лимфомиелоидные узлы в отличие от лимфатических узлов млекопитающих не имеют четкой структуры, в них отсутствуют центры пролиферации [3].

По всей длине тонкой кишки у амфибий выявляются узлы ассоциированной с кишечником лимфоидной ткани. У шпорцевых лягушек лимфоидная ткань кишечника содержит плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины IgM и IgX (аналог IgA млекопитающих) [21].

У амфибий функционирование иммунной системы осуществляется на двух уровнях. Первый, филогенетически более древний, составляют неспецифические защитные механизмы: кожные и слизистые покровы, внутренние барьеры организма, лимфоузлы, фагоцитирующие клетки, а также гуморальные факторы, к которым относятся лизоцим, комплемент, интерферон и др. Второй уровень иммунологических функций составляют механизмы, определяющие способность организма к избирательному (специфическому) ответу на конкретные антигены. Это приобретенный, или адаптивный, иммунитет. Три основных типа клеток: В-лимфоциты, Т-лимфоциты и антигенпрезентирующие клетки – формируют гуморальную и клеточную формы адаптивного иммунного ответа [2, 20, 21].

Развитие амфибий осуществляется с метаморфозом, поэтому в онтогенезе можно выделить две фазы иммунного реагирования: личиночную и фазу имаго. Иммунная система личиночной стадии развивается быстро. Затем амфибии испытывают временное подавление иммунитета во избежание отторжения собственных тканей, и железистый кожный покров амфибий остается важным физическим барьером между организмом и патогенами среды [37]. У взрослых амфибий иммунный ответ развивается по классической схеме.

Методы оценки иммунной устойчивости гидробионтов. Для контроля состояния гидробионтов, особенно культивируемых видов, важно контролировать их иммунный статус, который отражает структурно-функциональное состояние иммунной системы в конкретный момент жизни особи. Иммуно-физиологическая оценка проводится с помощью определения гематологических, цитохимических, биохимических, иммунологических показателей.

Фенолоксидазу (у речных раков и других беспозвоночных) выявляют электрофоретическим методом в 7,5%-ном полиакриламидном геле по Дэвису.

Хорошо зарекомендовал себя метод определения бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК) рыб нефелометрическим методом в модификации В.Р. Микрякова [14].

Важной характеристикой врожденного иммунитета являются показатели фагоцитарной активности клеток крови. Снижение фагоцитарной активности может быть результатом недостаточности опсонизирующих факторов сыворотки, морфологических и функциональных нарушений фагоцитов.

Для оценки фагоцитарной активности фагоцитов, а именно кислородзависимых (КЗ) факторов клеточного иммунитета, используется достаточно информативный тест с нитросиним тетразолием (НСТ-тест). В основе теста лежит регистрация высокотоксичных радикалов кислорода, образующихся в фагоцитирующей клетке при ее

активации. В организме такая активация, называемая «респираторным взрывом», происходит под действием чужеродного агента. В этой цитохимической реакции свободные радикалы кислорода активируемой клетки соединяются с нитросиним тетразолием, образуя нерастворимый формазан, который выявляется в клетке в виде темно-синих гранул [33].

Различают спонтанный и стимулированный НСТ-тест. Результаты спонтанного теста указывают на количество активированных клеток в крови. Стимулированный НСТ-тест отражает способность исследуемых фагоцитов (нейтрофилов) к активации *in vitro*. Активацию осуществляют с помощью различных агентов: латекс, опсонизированный зимозан и др. [11, 15].

Интенсивность одного из звеньев фагоцитоза – продукции активных форм кислорода – можно оценить по способности этих клеток восстанавливать нитросиний тетразолий *in vitro* (НСТ-тест). В варианте индуцированного НСТ-теста клетки стимулируют различными агентами (латекс, зимозан и др.). Стимуляция приводит к усилению продукции активных форм кислорода и увеличению количества активных фагоцитов. В фагосомах НСТ восстанавливается в диформазан, который откладывается в виде синих гранул и служит критерием интенсивности реакции.

Фагоцитарная активность может оцениваться косвенно по результатам лизосомально-катионного теста: с помощью цитохимической реакции определения содержания *лизосомальных катионных белков* в фагоцитах. К кислороднезависимым (КНЗ) механизмам иммунной защиты относятся неферментные лизосомальные катионные белки, обладающие прямым бактерицидным действием, основанным на расщеплении мукопептидов и повреждении мембран бактерий: лизоцим, катепсины (G); связывании необходимого для пролиферации железа из микробной клетки (лактоферрин). Даже в анаэробных условиях катионные белки убивают эпидермальный стафилококк, синегнойную палочку, зеленающий стрептококк и другие патогенные микроорганизмы [15].

При ряде болезней отмечают изменение (как правило, увеличение) активности лизосомальных катионных белков, особенно в разгар инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной этиологии [17].

Потенциальную активность фагоцитов циркулирующих жидкостей гидробионтов (гемоцитов ракообразных, нейтрофилов крови рыб и земноводных) можно оценивать по *цитохимическому показателю содержания лизосомального катионного белка*, определяемого по методу Шубича и адаптированного для рыб и речных раков [16]. К преимуществам данного подхода можно отнести его относительную доступность. Неферментный катионный белок положительно заряжен, локализуется в лизосомах гранулоцитов. При цитохимическом исследовании катионного белка используют методы, основанные на применении диахромных анионных красителей.

Цитохимическая реакция с бромфеноловым синим оцифровывается методом дифференциального подсчета клеток по степени интенсивности специфической окраски. Исследуемые клетки подразделяются на 4 группы по степени их фагоцитарной активности на основе концентрации белка (рис. 4–6):

0 степень – гранулы катионного белка отсутствуют;

1 степень – единичные гранулы;

2 степень – гранулы занимают примерно 1/3 цитоплазмы;

3 степень – гранулы занимают 1/2 цитоплазмы и более.

Средний цитохимический коэффициент (СЦК) рассчитывают по формуле:

$$\text{СЦК} = (0 \cdot \Phi_0 + 1 \cdot \Phi_1 + 2 \cdot \Phi_2 + 3 \cdot \Phi_3) : 100,$$

где Φ_0 , Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 – количество фагоцитов с активностью 0, 1, 2 и 3 степени соответственно.

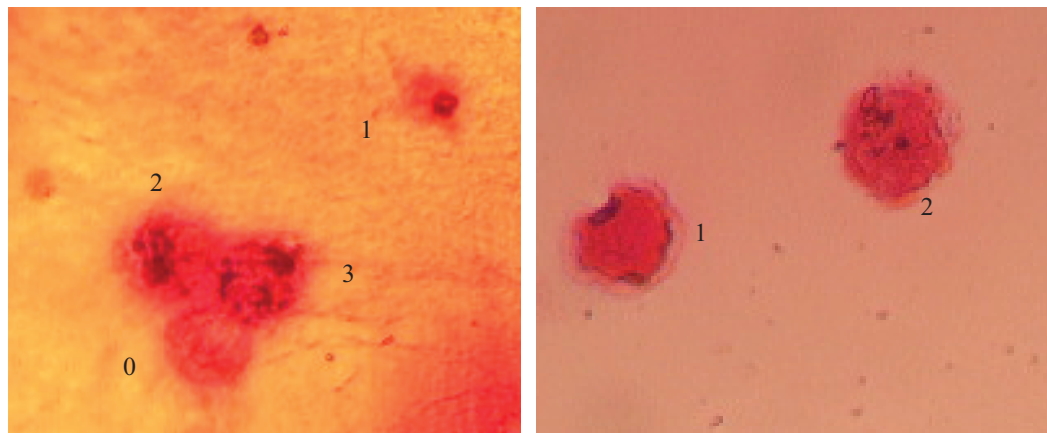


Рис. 4. Гемоциты широкопалого речного рака
(цифры указывают на степень активности клеток от 1 до 3 баллов)

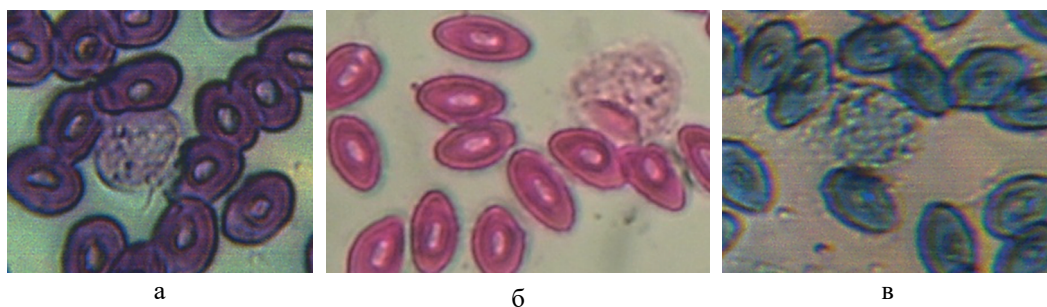


Рис. 5. Нейтрофилы карпа (а) и сома обыкновенного (б, в) разной степени активности:
а, б – 2-я степень; в – 3-я степень активности

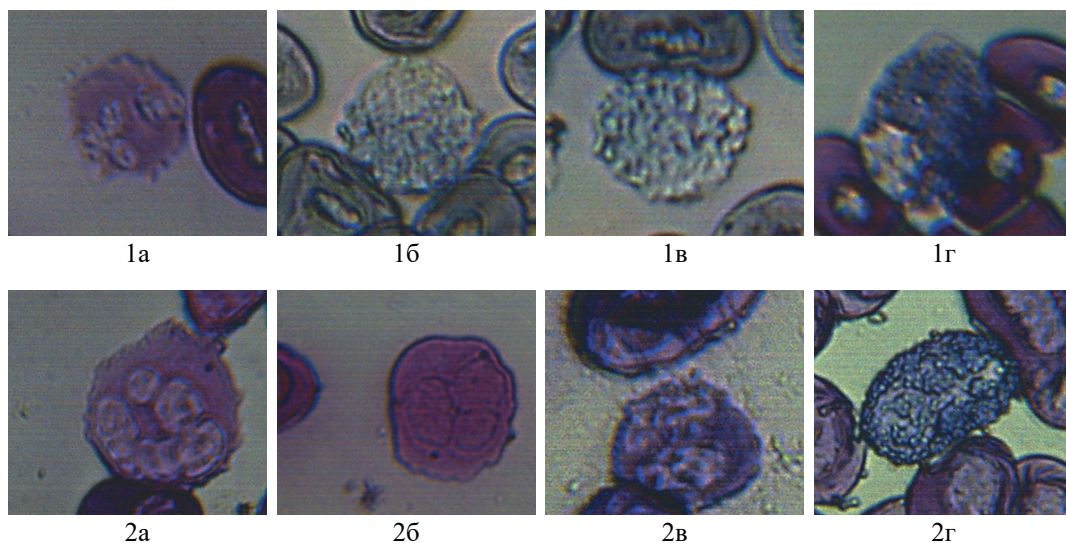


Рис. 6. Нейтрофилы крови земноводных: травяных лягушек (1) и аксолотлей (2):
А – 0; Б – 1; В – 2; Г – 3-я степень активности

У рыб обнаруживаются породные и межвидовые различия СЦК катионного белка в лизосомах. На основании многолетних исследований СЦК различных гидробионтов сделан вывод о возможности его использования в качестве оценочного показателя клеточного иммунитета и в качестве маркера при селекционном отборе карпа и сома. Как правило, высокое значение СЦК положительно коррелирует с фагоцитирующей способностью лейкоцитов [6, 15, 18].

При благоприятных условиях искусственной среды на клинически здоровых животных определены значения констант гомеостаза, которые можно принимать за физиологическую норму только в условиях выполненных наблюдений. Однако эти данные могут служить отправными точками при уточнении значений констант гомеостаза речных раков, рыб, земноводных.

Гемоциты речных раков быстро (30–50 мин) разрушаются *in vitro*, что следует учитывать при определении гемограммы.

Нами определены пределы значений некоторых гематологических и цитохимических показателей речных раков (табл. 2) во временном промежутке от начала забора гемолимфы до 30 мин в камере Горяева.

Таблица 2

Клеточный состав и цитохимические показатели гемолимфы речных раков

Показатели	Вид речного рака	
	<i>Astacus astacus</i>	<i>Pontastacus leptodactylus</i>
Гемоцитарная формула, %		
Агранулоциты	20–45	20–45
Полугранулоциты	20–50	20–50
Гранулоциты	20–45	20–45
Прозрачные клетки	0,5–15	0,3–15
Фагоцитарная активность гемоцитов		
СЦК, ед.	1,5–2,0	1,5–2,0

Гемопоз у рыб имеет ряд особенностей. В частности, у них больше органов гемопоза, чем у высших позвоночных (млекопитающих), поэтому в крови рыб в норме содержится определенное количество бластных форм эритроцитов.

К органам гемопоза у рыб относятся: жаберный аппарат (эндотелий сосудов и ретикулярный синцитий, сосредоточенный у основания жаберных лепестков), кишечник (слизистая), сердце (эпителиальный слой и эндотелий сосудов), почки (ретикулярный синцитий между канальцами), селезёнка, сосудистая кровь, лимфоидный орган (скопления кроветворной ткани – ретикулярного синцития – под крышей черепа).

Для рыб характерен лимфоцитарный профиль (табл. 3) – основу белой крови составляют лимфоциты, доля которых в общем пуле лейкоцитов не опускается ниже 70% и не превышает 94%.

Рост доли гранулярных лейкоцитов свидетельствует о неблагополучии рыб с различной этиологией (воспаление, инфекция, инвазия, аллергия).

Таблица 3

Референтные значения гематологических и цитохимических показателей рыб

Показатели	Карп	Линь	Язь	Толсто- лобик	Белый амур	Сом	Русский осетр	Стер- лядь	Щука
Показатели эритропоза, %									
Гемоцито- бласты, эритробласты	0–2	0,5–1,5	0–1	0–1	0–1	0–2	0–1	0–1	0–1
Нормобласты	0,5–7	2–3,5	2–3	2–3	2–4	0–6	1–6	2–4	2–3
Базофильные эритроциты	5–19	3–8	7–9	6–10	8–25	2–20	8–11	10–20	5–7
Зрелые эритроциты	77–92	89–91	87–91	85–91	75–85	75–98	83–87	80–83	89–92
Лейкоцитарная формула, %									
Миелобласты	0–0,4	0–0,2	0–0,2	0–0,2	0–0,2	0–0,3	0–0,2	0–0,2	0–0,2
Промиелоциты	0–0,4	0,3–1,8	0–0,5	0,3–2,2	0–1	0–2	0–2	0–1,5	0–1,2
Миелоциты	0–3	0–0,5	1–2	3–10	4–12	0–2	0–0,5	1–2,5	1–3
Метамиелоциты	0–8	0–1	1–3	4–11	3–6	1–6	2–4	0–1	0–2
Палочкоя- дерные нейтрофилы	0–10	1–8	2–5	4–7	2–5	0–18	0–3	2–5	1–3
Сегментоя- дерные нейтрофилы	0–9	2–5	1–7	0–3	1–6	0–20	1–4	1–4	2–4
Эозинофилы	0–1	0–0,3	0–0,3	0–2	0–2	0–2	0–0,3	0–0,3	0–0,3
Базофилы	0–1	0–3	0–0,2	0–1	0–0,3	0–2	0–0,1	0–0,1	0–0,1
Моноциты	0–8	1–5	1–7	2–5	3–6	0–5	2–4	3–6	2–4
Лимфоциты	78–93	79–91	80–92	70–88	70–89	73–96	85–90	82–89	86–93
Фагоцитарная активность нейтрофилов									
СЦК, ед.	1,5–2,1	1,6–1,9	1,4–2,0	1,3–1,8	1,6±1,9	1,5–2,2	1,5–1,9	1,6–2,1	1,6–1,9

Данные о составе крови амфибий в научной литературе встречаются редко. Тем не менее анализ литературы и результаты собственных исследований позволяют сделать на этот счет некоторые обобщения.

Кровь лягушек – лимфоцитарного типа, то есть преобладающей популяции, выступают агранулярные клетки – лимфоциты. Обнаружена видовая специфика в соотношении отдельных популяций лейкоцитов, то есть в составе лейкоцитарной формулы разных видов лягушек (табл. 4).

Таблица 4

Гематологические показатели амфибий

Показатели	Травяные лягушки	Гладкие шпорцевые лягушки	Аксолотли
Эритропоэз, %			
Гемоцитобласты, эритробласты	1–2	0–3	3–7
Нормобласты	1–5	3–7	2–7
Базофильные эритроциты	4–15	5–20	10–35
Зрелые эритроциты	78–93	70–90	57–85
Лейкоцитарная формула, %			
Миелобласты	0–0,1	0–0,1	1–8
Промиелоциты	0–1	0–1	0–5
Миелоциты	0–2	0–2	2–5
Метамиелоциты	0–3	0–3	1–6
Палочкоядерные нейтрофилы	0–4	0–3	0–5
Сегментоядерные	9–18	2–3	0–8
Эозинофилы	0–6	1–2	0–20
Базофилы	0–0,3	0–1	0–2
Моноциты	2–4	2–3	1–7
Лимфоциты	76–86	92–93	65–85
Фагоцитарная активность			
СЦК	1,5–2,0	1,8–2,1	1,7–2,1

Как следует из таблицы, количество лимфоцитов у бесхвостых амфибий составляет 80–90% от общего количества белых клеток крови и достигает максимума у гладкой шпорцевой лягушки (91–93%). У травяной и прудовой лягушки на долю нейтрофилов приходится от 10 до 30%. Остальные популяции лейкоцитов представлены единичными экземплярами и в составе лейкоцитарной формулы занимают 1–3%.

У аксолотлей в норме по сравнению с другими видами земноводных – лягушками значительно интенсивнее идет гемопоэз, судя по большой доле бластных форм эритроцитов и лейкоцитов. Вероятно, данный факт связан с тем, что аксолотли

являются личинками и обладают повышенной способностью к регенерации. Это восстановление происходит за счет размножения незрелых клеток эритроидного и лейкоцитарного рядов. В лейкоцитарной формуле крови аксолотлей сравнительно высока доля эозинофилов (до 20%).

Выводы

Анализ иммунологической защиты пойкилотермных гидробионтов разного уровня эволюционной организации (ракообразные, рыбы, амфибии) иллюстрирует эволюционные изменения иммунной системы эукариот. Иммунная система ракообразных представлена неспецифическими факторами, включающими в себя покровные ткани, профенолоксидазную систему, которая активируется β -1,3-гликанами низших грибов, липополисахаридами грамотрицательных бактерий и пептидогликанами грамположительных бактерий.

У рыб отсутствует красный костный мозг, а органами гемопоэза являются почки, тимус, печень, селезенка, лимфомиелоидная ткань. Тем не менее у рыб хорошо развиты гуморальная и клеточная реакции иммунитета. Иммуноглобулины у рыб представлены только IgM- подобными антителами.

Центральным органом иммунной системы амфибий является красный костный мозг, однако его роль в иммунной защите земноводных недостаточно изучена. Периферические органы иммунной системы амфибий представляют почки, тимус, селезенка, лимфомиелоидные узлы.

Гуморальный ответ у ракообразных предлагается оценивать по содержанию в гемолимфе фенолоксидазы. Клеточный ответ иммунитета гидробионтов предлагается оценивать в цитохимических реакциях, а именно: кислороднезависимые факторы – по содержанию лизосомального катионного белка в фагоцитах; кислородзависимые факторы – в НСТ-тесте, регистрирующем свободные радикалы кислорода при респираторном взрыве фагоцитирующей клетки *in vitro*.

Статья подготовлена при финансовой поддержке РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, тема проекта «Повышение иммунитета дискусов с помощью пробиотика *Bacillus Subtilis*», № 1.2.13.

Библиографический список

1. *Васильев А.Г.* Эволюция иммунной системы и регуляторные эффекты антител / А.Г. Васильев, Л.П. Чурилов, А.П. Трашков, В.И. Утехин // Цитология. – 2018. – Т. 60. – № 2. – С. 71–80.
2. *Галактионов В.Г.* Эволюционная иммунология. – М.: Академкнига, 2005. – 408 с.
3. *Грушко М.П.* Сравнительная характеристика гемопоэтических органов воibly (*Rutilus rutilus caspicus*) и озерной лягушки (*Rana ridibunda*) // Экологические проблемы и социально-экологические аспекты обустройства и развития территорий Российской Федерации. – М.: Изд-во «Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук», 2009. – С. 135–139.
4. *Житенева Л.Д.* Эволюция крови / Л.Д. Житенева, Э.В. Макаров, О.А. Рудницкая. – Ростов н/Д: Деловой мир, 2001. – 114 с.
5. *Журавлева Н.Г.* Биоэкологические аспекты защитных реакций рыб и беспозвоночных / Н.Г. Журавлева, Г.Г. Матишов, О. Оттесен, Е.Е. Минченков. – Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 2011. – 272 с.

6. *Иванов А.А.* Катионные неферментные белки лизосом фагоцитов как универсальные индикаторы биоцидности внутренней среды гидробионтов / А.А. Иванов, Г.И. Пронина, Н.Ю. Корягина // Известия ТСХА. – 2013. – № 4. – С. 95–103.
7. *Иванов А.А.* Физиология гидробионтов / А.А. Иванов, Г.И. Пронина, Н.Ю. Корягина. – СПб.: Издательство «Лань», 2015. – 480 с.
8. *Кокряков В.Н.* Очерки о врожденном иммунитете. – СПб.: Наука, 2006. – 261 с.
9. *Лукьяненко В.И.* Иммунобиология рыб: врожденный иммунитет. – М.: Агропромиздат, 1989. – 271 с.
10. *Мартынова М.Г.* Синтез нуклеиновых кислот и локализация предсердного натрийуретического пептида в гемоцитах речного рака / М.Г. Мартынова, О.М. Быстрова, В.Н. Парфенов // Цитология. – 2007. – Т. 50. – № 3. – С. 243–248.
11. *Маянский А.Н.* Фагоцитоз: проблемы и перспективы // Вестник РАМН. – 1993. – № 4. – С. 52–55.
12. *Микряков В.Р.* Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. – Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. – 153 с.
13. *Микряков Д.В.* Влияние некоторых кортикостероидных гормонов на структуру и функцию иммунной системы рыб: Дис. ... канд. биол. наук. – М., 2004. – 128 с.
14. *Микряков В.Р.* Влияние катехоламинов и глюкокортикоидов на отторжение аллотрансплантата у карпа *Cyprinus carpio* L. / В.Р. Микряков, Д.В. Микряков // Иммунология. – 2016. – Т. 37. – № 3. – С. 140–142.
15. *Пронина Г.И.* Физиолого-иммунологическая оценка культивируемых гидробионтов: карпа, сома обыкновенного, речных раков: Дис. ... д-ра биол. наук. – М.: РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2012. – 246 с.
16. *Пронина Г.И.* О возможностях повышения иммунной устойчивости гидробионтов в аквакультуре // Известия Оренбургского ГАУ. – 2014. – № 3. – С. 180–183.
17. *Пронина Г.И.* Физиолого-иммунологические адаптации карпа к краснухе / Г.И. Пронина, Н.Ю. Корягина, А.А. Иванов // Известия ТСХА. – 2015. – № 5. – С. 94–105.
- Pronina G.I., Koryagina N.YU., Ivanov A.A.* Fiziologo-immunologicheskaya adaptatsiya karpa k krasnukhe // Izvestiya TSKHA, 2015. № 5. S. 94–105.
18. *Пронина Г.И.* Методология физиолого-иммунологической оценки гидробионтов: Учебное пособие / Г.И. Пронина, Н.Ю. Корягина. – М., 2017. – 96 с.
19. *Ройт А.* Иммунология / А. Ройт Дж. Бростофф, Д. Мейл: Пер с англ. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
20. *Романова Е.Б.* Экологические аспекты организации иммунной системы амфибий / Е.Б. Романова, В.Ю. Николаев, Д.Б. Гелашвили // Современная герпетология. – 2014. – Т. 14. – Вып. 3/4. – С. 126–133.
21. *Хаитов Р.М.* Иммунология. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 320 с.
22. *Ярилин А.А.* Иммунология. – М.: ГЕОТАР, 2010. – 737 с.
23. *Babik W.* Contrasting patterns of variation in MHC loci in the Alpine newt / W. Babik, M. Pabijan, J. Radwan // Molecular Ecology. – 2008. – Vol. 17. – P. 2339–2355.
24. *Barribeau S.M.* Major histocompatibility complex based resistance to a common bacterial pathogen of amphibians / S.M. Barribeau, J. Villinger, B. Waldman // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3. – № 7. – P. 2692.
25. *Bengtén E.* Channel catfish immunoglobulins: Repertoire and expression / S.M. Barribeau, J. Villinger, B. Waldman // Developmental & Comparative Immunology. – 2006. – Vol. 30 (1–2). – P. 77–92.
26. *Callewaert L.* Lysozymes in the animal kingdom / t L. Callewaert, C.W. Michiels // J. Biosci. – 2010. – Vol. 35. – № 1. – P. 127–160.

27. *Cardenas W.B.* Cellular response of crustacean hemocytes to lipopolysaccharides / W.B. Cardenas, J.R. Dankert, J.A. Jenkins // 4 International Symposium on Aquatic Animal Health, New Orleans, La Sept. 1–5, 2002: ISAAH 2002: Proceedings. New Orleans (La), 2002. – P. 108.
28. *Chrisholm J.R.S.* Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species / W.B. Cardenas, J.R. Dankert, J.A. Jenkins // *Compar. Biochem. and Physiol.* – 1995. – № 1. – P. 39–45.
29. *Fange R.* Lymphoid organs in sturgeons (*Acipenseridae*) // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 1986. – № 12. – P. 153–161.
30. *Grzimek B.* Animal Life Encyclopedia. 2-th edition. Farmington Hills: Gale Group. – 2003. – Vol. 6. – Amphibians. – 590 p.
31. *He N.* Differential profile of genes expressed in hemocytes of Whi Spot Syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization / N. He, Q. Qin, X. Xu // *Antiviral Research.* – 2005. – Vol. 66. – P. 39–45.
32. *Johansso M.W.* Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells / M.W. Johansso, K. Soderhall // *J. Cell Biol.*, 1988. – № 106. – P. 1795–1803.
33. *Kuriyama T.* Changes of physiological functions in rats induced by immobilization stress / T. Kuriyama, K. Oishi, H. Kakazu et al. // *Nippon Eiseigaku Zasshi.* – 1998. – № 52 (4). – P. 647–653.
34. *Lee S.Y.* Initiation of innate immune responses in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* // *Acta univ. ups. Compr. Summ. Uppsala Diss. Fac. Sci. and Technol.*, 2001. – Vol. 613. – P. 1–42.
35. *Pronina G.I.* Physiological and immunological features of males and females of the immunologically resistant carp breed (*Cyprinus carpio* L.) // *AACL Bioflux.* – 2017. – Vol. 10. – Issue 2: 335–340.
36. *Rodriquez J.* Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies / J. Rodriquez, V. Boulo, E. Mialhe, E. Bachere // *J. Cell Sci.* – 1995. – Vol. 108 (3). – P. 1043–1050.
37. *Rollins-Smith A.L.* Amphibian immune defenses against Chytridiomycosis: impacts of changing environments / A.L. Rollins-Smith J.D. Ramsey, J.D. Pask, L.K. Reinert, D.C. Woodhams // *Integrative and Comparative Biology.* – 2013. – Vol. 51. – № 4. – P. 552–562.
38. *Rus H.* The role of the complement system in innate immunity / H. Rus, C. Cudrici, F. Niculescu // *Immunologic Research.* – 2005. – Vol. 33 (2). – P. 103–112. Doi:10.1385/IR:33:2:103.
39. *Shi Z.* Response of crayfish, *Procambarus clarkii*, haemocytes infected by white spot syndrome virus / Z. Shi, H. Wang, J. Zhang, Y. Xie, L. Li, X. Chen, B. – F. Edgerton, J. – R. Bonami // *Journal of Fish Diseases.* – 2005. – Vol. 28 (3). – P. 151–156.
40. *Söderhäll I.* Crustacean hematopoiesis // *Developmental & Comparative Immunology*/ 2016. Vol. 58: 129–141. URL: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.009https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X15300926?via%3Dihub>
41. *Söderhäll K.* Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity / K. Söderhäll, L. Cerenius // *Curr. Opin. Immunol.* – 1998. – № 10. – P. 23–28.
42. *Söderhäll K.* Internal Defence Mechanisms / K. Söderhäll, M.W. Johansson, V.J. Smith // *Freshwater crayfish: Biology, management and exploitation* (edited by D.M Holdich and R.S. Lowery). – 1988. – P. 213–235.
43. *Söderhäll K.* The crayfish Plague Fungus: History and Recent Advances / K. Söderhäll, L. Cerenius // *Freshwater Crayfish.* – 1999. – Vol. 12. – P. 11–35.
44. *Takahashi, Yukinori.* Immunodefense system of crustacean / *Yukinori Takahashi, Toshiaki Itami, Masakazu Kondo* // *Fish Pathology.* – 1995. – Vol. 2 (30). – P. 141–150.

45. Tatner M.F. The ontogeny of humoral immunity in rainbow trout, *Salmo gairdneri* // Vet. Immunol. Immunopathol. – 1986. – № 12. – P. 93–105.
46. Vazquez L. Review: Immunity mechanisms in crustaceans / L. Vazquez, J. Alpuche, G. Maldonado, C. Agundis, A. Pereyra-Morales E. Zenteno // Innate Immun., 2009. – Vol. 15 (3). – P. 179–88. Doi: 10.1177/1753425909102876.
47. Verburg-van Kemenade L.B.M., Weyts F.A.A., Debets R., Flik G. Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor. Dev. Comp. Immunol., 1995. – Vol. 19. – P. 59–70.
48. Wang Hong-Wei, Wang Zhi-yong, Wu Chang-gong, Ji rong-xing. Hebei nongye daxue xuebao // J. Agr. Univ. Hebei., 2006. – Vol. 29. – № 5. – P. 86–90.
49. Wang, Lei. Studies on the activities and characteristics of the antibacteria, bacteriolysis and phenoloxidase in the haemolymph of *Penaeus chinensis* / Lei Wang, Guangyou Li, Yuanxing Mao // Oceanol. Et limnol. Sin. – 1995. – Vol. 26. – № 2. – P. 179–185.
50. Zapata A. Lymphoid organs of teleost fish. II Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio* // Developmental and Comparative Immunology, 1981. – V. 5. – P. 685–690.
51. Zicai L. Characterization and cloning of some immune molecules from the crayfish *Pacifastacus leniusculus* // Acta Universitatis Upsaliensis, Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, 1995. – № 149. – P. 1–35.

IMMUNE SYSTEM OF POIKILOTHERMIC AQUATIC ORGANISMS

G.I. PRONINA, A.A. IVANOV, A.G. MANNAPOV, O.V. SANAYA

(Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy)

The paper shows features of the immune system of poikilothermic aquatic organisms of different taxonomic groups: crustaceans, fish, and amphibians. Defense mechanisms of crustaceans are presented by largely innate non-specific factors: external covers (including the exoskeleton), mucus, physical and chemical barriers lysozyme in the hemolymph, propanolamine system, and phagocytosis. The authors identified 4 types of cells (hemocytes) found in the circulating fluid of crayfish, depending on the morphological and functional properties: agranulocytes, progranulin, granulocytes, and transparent cells. Each type performs different functions in the process of immune defense. In fish, there is no red bone marrow and lymph nodes, the main organs of hematopoiesis include thymus, spleen, liver, lymphoid tissue of the brain and the trunk of the kidneys, accumulation of lymphoid tissue of the cranial box, intestine, and pericardium. Humoral components of the immune response of fish are represented by immunoglobulins, system complement components, lysozyme, C-reactive protein, interferon, lysine, hemolysin, hemagglutinin. Only IgM-like antibodies represent immunoglobulins in fish. The central organ of the amphibian immune system is the red bone marrow, but its role in the immune defense of amphibians has not been sufficiently studied. Peripheral organs of the immune system include kidneys, thymus, spleen, lymphomyeloid organs. Depending on the characteristics of the immune system of poikilothermic hydrobionts of different types, the authors offer methods for assessing their humoral immunity (by determining phenoloxidase) and cellular response (by phagocytosis). Cellular immunity, and phagocytic activity, in particular, can be evaluated using cytochemical methods taking into account oxygen-independent factors – the content of enzymatic lysosomal cationic protein in phagocytes – and oxygen-dependent ones – NBT-test with nitrosonium tetrazolium that records cytotoxic oxygen radicals generated during the respiratory explosion of cell stimulation in vitro.

Key words: immunity, hemocytes, phagocytosis, humoral factors, lymphomyeloid organs, immunocompetent cells.

References

1. *Vasil'yev A.G., Churilov L.P., Trashkov A.P., Utekhin V.I.* Evolyutsiya immunnnoy sistemy i regulatorynykh effektov antitel [Evolution of the immune system and the regulatory effects of antibodies]. *Tsitologiya*. 2018; 60; 2: 71–80. (In Rus.)
2. *Galaktionov V.G.* Evolyutsionnaya immunologiya [Evolutionary immunology]. M.: Akademkniga, 2005: 408. (In Rus.)
3. *Grushko M.P.* Sravnitel'naya kharakteristika gemopoeticheskikh organov vobly (*Rutilus rutilus caspicus*) i ozerney lyagushki (*Rana ridibunda*) [Comparative characteristics of the hematopoietic organs of the vobla (*Rutilus rutilus caspicus*) and the marsh frog (*Rana ridibunda*)]. M.P. Grushko. *Ekologicheskie problemy i sotsial'no-ekologicheskie aspekty obustroystva i razvitiya territoriy Rossiyskoy Federatsii*. M.: Izd-vo "Vestnik Rossiyskoy akademii sel'skokhozyaystvennykh nauk", 2009: 135–139. (In Rus.)
4. *Zhiteneva L.D., Makarov E.V., Rudnitskaya O.A.* Evolyutsiya krovi [Evolution of blood]. Rostov n/D: Delovoy mir, 2001: 114. (In Rus.)
5. *Zhuravleva N.G., Matishov G.G., Ottesen O., Minchenok E.E.* Bioekologicheskie aspekty zashchitnykh reaktsiy ryb i bespozvonochnykh [Bioecological aspects of the defense reactions of fish and invertebrates]. Apatity: Izd-vo KNTS RAN, 2011: 272. (In Rus.)
6. *Ivanov A.A., Pronina G.I., Koryagina N.Yu.* Kationnye nefermentnye belki lizosom fagotsitov kak universal'nye indikatory biotsidnosti vnutrenney sredy gidrobiontov [Cationic non-enzymatic proteins of lysosomes of phagocytes as universal indicators of the biocidal nature of the internal environment of aquatic organisms]. *Izvestiya TSKHA*. M., 2013; 4: S. 95–103. (In Rus.)
7. *Ivanov A.A., Pronina G.I., Koryagina N.Yu.* Fiziologiya gidrobiontov [Physiology of aquatic organisms]. SPb: Izdatel'stvo "Lan", 2015: 480. (In Rus.)
8. *Kokryakov V.N.* Ocherki o vrozhdennom immunitete [Essays on innate immunity]. SPb: Nauka, 2006: 261.
9. *Luk'yanenko V.I.* Immunobiologiya ryb: vrozhdenniy immunitet [Immunobiology of fish: innate immunity]. M.: Agropromizdat, 1989: 271. (In Rus.)
10. *Martynova M.G., Bystrova O.M., Parfenov V.N.* Sintez nukleinovyykh kislot i lokalizatsiya predserdnogo natriyureticheskogo peptida v gemotsitakh rechnogo raka [Nucleic acid synthesis and localization of atrial natriuretic peptide in hemocytes of crayfish]. *Tsitologiya*, 2007; 50; 3: 243–248. (In Rus.)
11. *Mayanskiy A.N.* Fagotsitoz: problemy i perspektivy [Phagocytosis: problems and prospects]. *Vestnik RAMN*. 1993; 4: 52–55. (In Rus.)
12. *Mikryakov V.R.* Zakonomernosti formirovaniya priobretnennogo immuniteta u ryb [Regularities of the development of acquired immunity in fish]. Rybinsk: IBVV RAN, 1991: 153. (In Rus.)
13. *Mikryakov D.V.* Vliyanie nekotorykh kortikosteroidnykh gormonov na strukturu i funktsiyu immunnnoy sistemy ryb [Influence of some corticosteroid hormones on the structure and function of the immune system of fish]. PhD (Bio) thesis. M. 2004: 128. (In Rus.)
14. *Mikryakov V.R., Mikryakov D.V.* Vliyanie katekholaminov i glyukokortikoidov na otorzhenie allotransplantata u karpa *Cyprinus carpio* L. [Influence of catecholamines and glucocorticoids on allograft rejection in carp *Cyprinus carpio* L.]. *Immunologiya*. 2016; 37: 3: 140–142. (In Rus.)
15. *Pronina G.I.* Fiziologo-immunologicheskaya otsenka kul'tiviruemykh gidrobiontov: karpa, soma obyknovennogo, rechnyykh rakovin [Physiological and immunological assessment of cultivated aquatic organisms: carp, catfish, and crayfish]. DSc (Bio) thesis. M.: RGAU-MSKHA im. K.A. Timiryazeva, 2012: 246. (In Rus.)

16. *Pronina G.I.* O vozmozhnostyah povysheniya immunnogo ustoychivosti gidrobiontov v akvakul'ture [On the possibilities of increasing the immune resistance of aquatic organisms in aquaculture]. *Izvestiya Orenburgskogo GAU*, 2014; 3:180–183. (In Rus.)
17. *Pronina G.I., Koryagina N.Yu., Ivanov A.A.* Fiziologo-immunologicheskaya adaptatsiya karpa k krasnukhe [Physiological and immunological adaptation of carp to rubella]. *Izvestiya TSKHA*, 2015; 5: 94–105. (In Rus.)
18. *Pronina G.I., Koryagina N.Yu.* Metodologiya fiziologo-immunologicheskoy otsenki gidrobiontov [Methodology of physiological and immunological assessment of aquatic organisms]. Study manual. 2017: 96. (In Rus.)
19. *Royt A. Brostoff Dzh., Meyl D.* Immunologiya [Immunology]. M.: Mir, 2000: 592. (In Rus.)
20. *Romanova E.B., Nikolaev V.Yu., Gelashvili D.B.* Ekologicheskie aspekty organizatsii immunnogo sistema amfibi [Environmental aspects of the organization of the immune system of amphibians]. *Sovremennaya gerpetologiya*, 2014; 14; ¾: 126–133. (In Rus.)
21. *Khaitov R.M.* Immunologiya [Immunology]. M.: GEHOTAR-Media, 2006: 320. (In Rus.)
22. *Yarilin A.A.* Immunologiya [Immunology]. M.: GEOTAR, 2010: 737. (In Rus.)
23. *Babik W., Pabiyani M., Radwan J.* Contrasting patterns of variation in MHC loci in the Alpine newt. *Molecular Ecology*, 2008; 17: 2339–2355.
24. *Barribeau S.M., Villinger J., Waldman B.* Major histocompatibility complex based resistance to a common bacterial pathogen of amphibians. *PLoS ONE*, 2008; 3; 7: 2692.
25. *Bengtén E., Clem L.W., Miller N.W., Warr G.W., Wilson M.* Channel catfish immunoglobulins: Repertoire and expression. *Developmental & Comparative Immunology*, 2006; 30(1–2) 77–92.
26. *Callewaert L., Michiels C.W.* Lysozymes in the animal kingdom. *J. Biosci.* 2010; 35; 1: 127–160.
27. *Cardenas W.B., Dankert J.R., Jenkins J.A.* Cellular response of crustacean hemocytes to lipopolysaccharides. 4 International Symposium on Aquatic Animal Health, New Orleans, La Sept. 1–5, 2002: ISAAH 2002: Proceedings. New Orleans (La), 2002: 108.
28. *Chrisholm J.R.S., Smith V.J.* Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. *Compar. Biochem. and Physiol.*, 1995; 1: 39–45.
29. *Fänge R.* Lymphoid organs in sturgeons (Acipenseridae). R. Fänge. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1986; 12: 153–161.
30. *Grzimek B.* Animal Life Encyclopedia. 2nd edition. Farmington Hills: Gale Group, Amphibians. 2003; 6: 590.
31. *He N., Qin Q., Xu X.* Differential profile of genes expressed in hemocytes of White Spot Syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. *Antiviral Research*, 2005; 66: 39–45.
32. *Johansson M.W., Soderhall K.* Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. *J. Cell Biol.*, 1988; 106: 1795–1803.
33. *Kuriyama T., Oishi K., Kakazu H., et al.* Changes of physiological functions in rats induced by immobilization stress. *Nippon Eiseigaku Zasshi*. 1998; 52 (4): 647–653.
34. *Lee S.Y.* Initiation of innate immune responses in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Acta univ. upsala. Compr. Summ. Uppsala Diss. Fac. Sci. and Technol.* 2001; 613: 1–42.
35. *Pronina G.I.* Physiological and immunological features of males and females of the immunologically resistant carp breed (*Cyprinus carpio* L.). *AACL Bioflux*, 2017; 10; 2: 335–340.

36. *Rodriquez J., Boulo V., Mialhe E., Bachere E.* Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.*, 1995; 108(3): 1043–1050.
37. *Rollins-Smith AL., Ramsey J.D., Pask J.D., Reinert L.K., Woodhams D.C.* Amphibian immune defenses against Chytridiomycosis: impacts of changing environments. *Integrative and Comparative Biology*, 2013; 51; 4: 552–562.
38. *Rus H., Cudrici C., Niculescu F.* The role of the complement system in innate immunity. *Immunologic Research*. 2005; 33 (2): 103–112. Doi:10.1385/IR:33:2:103.
39. *Shi Z, Wang H, Zhang J, Xie Y, Li L, Chen X, Edgerton B-F, Bonami J-R.* Response of crayfish, *Procambarus clarkii*, haemocytes infected by white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, 2005; 28(3): 151–156.
40. *Söderhäll I.* Crustacean hematopoiesis. *Developmental & Comparative Immunology*. 2016; 58: 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.009><https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X15300926?via%3Dihub>
41. *Söderhäll K., Cerenius L.* Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 1998; 10: 23–28.
42. *Söderhäll K., Johansson M.W., Smith V.J.* Internal Defence Mechanisms. *Freshwater crayfish: Biology, management and exploitation* (edited by D.M Holdich and R.S. Lowery), 1988: 213–235.
43. *Söderhäll K., Cerenius L.* The crayfish Plague Fungus: History and Recent Advances. *Freshwater Crayfish* 1999; 12: 11–35.
44. *Takahashi Yukinori, Itami Toshiaki, Kondo Masakazu.* Immunodefense system of crustacean. *Fish Pathology*, 1995; 2 (30): 141–150.
45. *Tatner M.F.* The ontogeny of humoral immunity in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. M.F. Tatner. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1986; 12: 93–105.
46. *Vazquez L, Alpuche J, Maldonado G, Agundis C, Pereyra-Morales A, Zenteno E.* Review: Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immun.*, 2009; 15(3): 179–88. doi: 10.1177/1753425909102876.
47. *Verburg-van Kemenade L.B.M., Weyts F.A.A., Debets R., Flik G.* Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor. *Dev. Comp. Immunol.*, 1995; 19: 59–70.
48. *Wang Hong-Wei, Wang Zhi-yong, Wu Chang-gong, Ji rong-xing.* Hebei nongye daxue xuebao. *J. Agr. Univ. Hebei.*, 2006; 29; 5: 86–90.
49. *Wang Lei; Li Guangyou; Mao Yuanxing.* Studies on the activities and characteristics of the antibacteria, bacteriolysis and phenoloxidase in the haemolymph of *Penaeus chinensis*. *Oceanol. Et limnol. Sin.*, 1995; 26; 2: 179–185.
50. *Zapata A.* Lymphoid organs and teleost fish. II Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Developmental and Comparative Immunology*, 1981; 5: 685–690.
51. *Zicai L.* Characterization and cloning of some immune molecules from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Acta Universitatis Upsaliensis, Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology*, 1995; 149: 1–35.

Пронина Галина Иозеповна, профессор ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, д-р биол. наук (127550, г. Москва, Тимирязевская ул., 49, Российская Федерация; e-mail: gidrobiont4@yandex.ru).

Иванов Алексей Алексеевич, заведующий кафедрой ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, д-р биол. наук, профессор (127550, г. Москва, Тимирязевская ул., 49, Российская Федерация; e-mail: aivanov@rgau-msha.ru).

Маннапов Альфир Габдулович, заведующий кафедрой ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, д-р биол. наук, профессор (127550, г. Москва, Тимирязевская ул., 49, Российская Федерация; e-mail: 54alfir@mail.ru).

Саная Ольга Владимировна, аспирант ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, Тимирязевская ул., 49, Российская Федерация; e-mail: sanaya2020@list.ru).

Galina I. Pronina, DSc (Bio), Professor. Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str. 49. e-mail: gidrobiont4@yandex.ru).

Aleksei A. Ivanov, DSc (Bio), Professor. Head of the Department, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str. 49. e-mail: aivanov@rgau-msha.ru).

Alfir G. Mannapov, DSc (Bio), Professor. Head of the Department, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str. 49. e-mail: 54alfir@mail.ru).

Olga V. Sanaya, postgraduate student. Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str. 49. e-mail: sanaya2020@list.ru).