

## Некоторые защитные явления у молоди семги и горбуши

Е.Е. Минченок<sup>1</sup>, Н.Г. Журавлёва<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Биологический факультет МГТУ, кафедра биоэкологии

<sup>2</sup> ММБИ КНЦ, Мурманск

**Аннотация.** Приведены результаты исследований антибиотической активности желтка, перивителлиновой жидкости, зародышевых тканей у эмбрионов, а также морфологических, воспалительных и регенеративных перестроек у семги и горбуши на ранних стадиях онтогенеза в ходе действия повреждающего агента. Становление иммунологических реакций у семги и горбуши изучено на разных этапах и стадиях онтогенеза. Работа представляет как теоретический интерес – в плане изучения эволюции иммунной системы позвоночных животных, так и практический – с точки зрения использования полученных результатов для успешного культивирования рыб в искусственных условиях и поддержания численности естественных популяций.

**Abstract.** The paper contains the results of investigations of antibiotic activity of yolk, perivitellinic liquid and tissues of embryos. The data of morphological, inflammation and regeneration processes in the Atlantic salmon and humpback salmon at the early stages of ontogenesis during the action of the damaging agent have been presented. Formation of fish immunological reactions has been researched in respect to comparative ontogenesis. The paper is both of theoretical – in the aspect of studying the evolution of vertebrates' immunological system, and practical aspects – from the point of view of using the received results for fish successful growing in artificial conditions and for stabilization the quantity of natural populations.

### 1. Введение

Иммунная система жизненно необходима живым организмам. В ее состав входят различные клетки, ткани и органы, защищающие организм от токсических веществ окружающей среды. В результате действия иммунной системы поддерживается постоянство внутренней среды организма. Иммунитет регулирует рост, развитие и функционирование нелимфоидных органов и тканей, сохраняет биологическую индивидуальность организма (Фонталини, 1988).

Организация иммунной системы рыб отличается от таковой у высших позвоночных. Во-первых, у рыб кроветворные и иммунные функции осуществляются в одних и тех же органах, тогда как у млекопитающих они пространственно разделены. Во-вторых, пока нет объективных данных, позволяющих разделить иммунные органы рыб на центральные и периферические. Наконец, в иммунитете рыб гораздо большее значение, чем у наземных позвоночных, имеют слизистые покровы кожи, дыхательных путей и пищеварительного тракта. Слизь не только выполняет функцию механической защиты, но и обладает антимикробным действием за счет содержащихся в ней лизоцима, антител и других гуморальных факторов, обеспечивающих немедленную защиту организма от присутствующих в воде патогенов (Кондратьева и др., 2001).

Иммунная система рыб более лабильна, чем у других позвоночных животных. Любое внешнее воздействие активизирует механизмы врожденного иммунитета, обеспечивающего немедленное и кратковременное реагирование на него (Кондратьева, Китаиова, 2002). На начальной стадии инфекционного процесса, возникающего при повреждении, у рыб активизируются кожные и слизистые барьеры, фагоцитоз, гуморальные и физиологические факторы, генотипическая и фенотипическая реактивность клеток и тканей. Затем включаются следующие неспецифические реакции: воспаление, изменение морфологического и химического состава крови и формируется специфический иммунный ответ (Грищенко, Рудиков, 1985). Механизмы неспецифической защиты у рыб на разных стадиях онтогенеза описаны во многих работах (Праздников, Михайлова, 1966; Микряков, 1984; Лукьяненко, 1989; Вихман, 1994; Минченок, Журавлёва, 2003; Ingram, 1980; Manning, Tatner, 1985; Asbakk, 2001; Glenney Gavik, Petrie-Hanson Lora, 2002; Zhuravleva, Minchenok, 2005).

Изучение иммунной системы рыб дает возможность углубить представления о динамике воспаления и защитных свойствах организмов, разработать необходимые профилактические мероприятия при их разведении и акклиматизации, использовать иммунологические параметры рыб для мониторинга экологической обстановки водных экосистем.

В настоящей работе приведены результаты исследований по выявлению антибиотической активности у эмбрионов семги и горбуши, изучению механизмов развития и становления воспалительных и фагоцитарных реакций, а также скорости и характера регенеративных процессов у эмбрионов, предличинок и личинок рыб.

## 2. Материал и методы

Материалом для изучения служили икра (на стадии пигментации глаз), а также предличинки и личинки семги и горбуши (около 40 экземпляров в каждой серии опытов).

Предлагаемый метод имеет преимущества перед другими. В одном и том же эксперименте (введение стерильной нити) можно было одновременно получить характеристику регенерационных процессов и защитных реакций со стороны тканей в районе повреждения. Кроме того, нить является адсорбентом антибиотических субстанций, которые образуются в очаге повреждения. Поэтому была возможность характеризовать гуморальные факторы иммунной системы рыб.

Под кожу хвостового стебля при помощи сосудистых игл вводили простерилизованные хлопчатобумажные нити. Для выявления фагоцитоза их пропитывали взвесью кармина (2 г мелко растертого кармина смешивали с 5 см<sup>3</sup> 96-градусного спирта). Стерилизацию проводили в сушильном шкафу при температуре 180°C в течение 20 минут. Перед введением в ткани рыб нити смачивали в стерильном физиологическом растворе. Нити вводили иглодержателем через все ткани в дорзо-вентральном направлении в одни и те же анатомо-топографические зоны хвостового стебля. Концы нити завязывали узлом на поверхности тела.

В экспериментах на эмбрионах и личинках рыб (в связи с малыми размерами объектов) в качестве инородного тела использовали тонкие стеклянные микроиглы диаметром от 0,05 до 0,1 мм. Введение микроигл в ткани эмбрионов и личинок производилось под контролем бинокулярной лупы.

Материал фиксировали через 5 минут, 1, 3, 6, 12 часов, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30 суток после операции. В качестве фиксатора использовали жидкость Буэна, 10 % нейтральный формалин, абсолютный спирт, смеси Ценкера.

Кусочки тканей заливали в целлоидин, целлоидин-парафин. Срезы окрашивали гематоксилином Бемера и эозином, триоксигематеином Ганзена, по Маллори, по Кларфельду, азур II-эозином, толуидиновым синим и по Унна-Паппенгейму.

Для выявления мукополисахаридов использовали ШИК-реакцию с периодной кислотой, а также метакроматическое окрашивание тионином и толуидиновым синим для идентификации кислых мукополисахаридов. Для этих же целей срезы окрашивались альциановым синим и обрабатывались по методу Гейла. Для выявления дезоксирибонуклеиновой кислоты применяли реакцию Фельгена и окраску галлоцианином, а также реакцию Браше. Клетки крови окрашивали по Романовскому-Гимза.

Для выявления динамики антибиотической активности в очаге повреждения животных использовали неразволокненные хлопчатобумажные нити, которые после указанной обработки вдевались в прямые хирургические иглы № 1. Оба конца вдетых ниток оставляли одинаковой длины и скручивали между собой. После стерилизации нити вводили в ткани рыб. Извлечение из тканей нитей для микробиологических целей было во всех опытах одинаковым. Выступающие из тканей нити обрезали на уровне 0,5 мм от поверхности рыбы. Затем раскаленным на спиртовке заостренным стальным стержнем оставшиеся концы ниток и прилегающие ткани обеззараживали прижиганием. Нить извлекали стерильным глазным пинцетом и переносили на чашку Петри с мясопептонным агаром, засеянным культурой тест-микроба. Чашки Петри помещали в термостат и инкубировали при 30°C.

Исследование антибиотических свойств перивителлиновой жидкости в икринках с развивающимися эмбрионами проводили по той же схеме, что и в случае изучения антибиотических свойств тканей. Простерилизованную хлопчатобумажную нить продевали через оболочку икринки. Нить извлекали из икринки через различные промежутки времени (5 мин., 1, 3, 6, 12, 24 часа) после введения и помещали в чашку Петри на поверхность агара с предварительно занесенными культурами бактерий (*Micrococcus lysodeicticus*, *Sarcina lutea*, *Sarcina urea*, *Mycobacterium album*, *Salmonella pullorum*, *Staphylococcus aureus*).

## 3. Результаты исследования

### 3.1. Изучение антибиотической активности зародышевых жидкостей у эмбрионов семги и горбуши

Эксперименты, проведенные на икре семги, показали, что перивителлиновая жидкость не оказывает антимикробной активности на суточные культуры *Staphylococcus aureus*, *Sarcina urea*, *Salmonella pullorum*. В то же время жидкая часть желтка действует бактериостатически и бактерицидно на *Mycobacterium album*, *Micrococcus lysodeicticus*.

В следующей серии опытов икра семги помещалась на мясопептонный агар с поверхностным посевом десятидневной культуры *Sarcina lutea*, *Micrococcus lysodeicticus*, *Mycobacterium album*, *Salmonella pullorum*. Отмечены небольшие зоны торможения микроорганизмов шириной 1-2 мм. Рост посторонней микрофлоры не наблюдался. Вокруг раздавленных икринок также возникали как зоны торможения, так и зоны отсутствия роста *Sarcina lutea*, *Micrococcus lysodeicticus*, *Mycobacterium album*. По краям зон торможения роста всегда наблюдались зоны стимуляции роста тест-микробов (шириной 0,5-3 мм). Обнаруживалось непостоянное бактериостатическое действие икринок на рост *Salmonella pullorum*.

При выдерживании икринок в течение суток при температуре 5-8°C с последующим их удалением и помещением чашек Петри в термостат бактериостатическое действие выявлялось с меньшим постоянством. Посторонняя микрофлора на чашках Петри с поверхностным посевом *Sarcina lutea*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Mycobacterium album* не росла.

В следующей серии экспериментов икринка надрезалась в области глаза, перивителлиновая жидкость струйкой вытекала на агар. Чашки Петри помещались в термостат. В 50-70 % случаев обнаружены зоны отсутствия роста и зоны торможения роста *Mycobacterium album*, *Sarcina lutea*. Рост посторонней микрофлоры не наблюдался. Слабое бактериостатическое действие оказывала перивителлиновая жидкость на *Micrococcus lysodeikticus*. Перивителлиновая жидкость не оказывала заметного влияния на *Salmonella pullorum*.

В других вариантах постановки опыта желток выливался на бумажный диск, затем в разные сроки от 30 минут до 12 часов диск убирался. Жидкая часть желтка хорошо диффундировала в агар, через сутки после пребывания чашек Петри в термостате обнаруживались широкие зоны торможения, а в некоторых случаях зоны отсутствия роста, выходявшие за пределы бумажного диска на 5-6 мм. В месте соприкосновения агара с бумажным диском прорастали микроорганизмы, образуя зону разреженного роста. По-видимому, этот факт можно объяснить тем, что желток густой консистенции является хорошей питательной средой для тест-микробов.

Проведенные исследования показывают, что антимикробная активность перивителлиновой жидкости отдельных эмбрионов семги испытывает значительные индивидуальные колебания, в то время как жидкая часть желтка содержит антимикробные субстанции, хорошо диффундирующие в агар. Желток более вязкой консистенции, по-видимому, является прекрасной питательной средой для испытываемых микроорганизмов.

В опытах на эмбрионах горбуши получены сходные результаты. На поверхности хорошо развивающихся икринок семги содержится незначительное количество посторонней микрофлоры из воды, способной расти на мясопептонном агаре. В то же время на поверхности икринок, обрастающих сапролегнией, встречается большое количество сапрофитных микроорганизмов. Особенно много бактерий, хорошо растущих на стерильном мясопептонном агаре, высевается из икринок, имеющих белые пятна на оболочках. Микроорганизмы, поселяющиеся на поверхности икры, служат своеобразным биологическим барьером, препятствующим проникновению микробов в перивителлиновую жидкость и, тем самым, предохраняющим зародыши от инфицирования. Тем не менее, в случае проникновения микроорганизмов через оболочки они встречаются с антимикробными субстанциями желтка и крови зародыша. Характерно, что на более ранних этапах эмбрионального развития до появления кровеносной системы антимикробная активность эмбриональных жидкостей выражена более отчетливо.

### 3.2. Исследование фагоцитарных и воспалительных явлений у эмбрионов семги и горбуши

В качестве повреждающего агента в опыте была использована простерилизованная нитка (стеклянная иглолка) с кармином. Введение тонкой иглой простерилизованной нитки с кармином в ткани эмбрионов семги приводило в большинстве случаев к гибели зародышей, в то время как эмбрионы горбуши сравнительно хорошо переносили эту операцию. Анализ препаратов показал, что в случае введения простерилизованной нитки с кармином наблюдаются в основном те же особенности в реактивности эмбриональных тканей, что и после использования стеклянной иглолки.

При введении *простерилизованной стеклянной иглолки с кармином* в икринку семги повреждались не только ткани эмбриона в хвостовой части, но и небольшие участки внезародышевых оболочек и желтка. Основные особенности развития фагоцитарных и воспалительных явлений при повреждении у исследованных эмбрионов семги и горбуши оказались сходными. Так как на эмбрионах семги проведено больше опытов, на них мы и остановимся.

Через **5 минут** по краю раны наблюдались единичные поврежденные клетки с пикнотическими ядрами, у части дезинтегрированных клеток эктодермы и формирующихся поперечнополосатых мышц ядра увеличены (рис. 1). В случае если повреждалась закладка мозга и другие, жизненно важные органы, гибель эмбриона наступала довольно быстро, и уже через несколько часов икринка становилась белой, при этом во всех эмбриональных тканях отмечалась дезинтеграция клеток и дистрофические изменения ядер и цитоплазмы. В желтке появлялись многочисленные светлые вакуоли. В эти же сроки опыта вокруг инородного тела отмечается обособление отдельных клеток внезародышевой эктодермы и мезенхимы, смещение некоторых ядер перибласта в глубокие участки желтка, изменение формы ядер перибласта. Небольшая часть желтка вытекает и попадает в перивителлиновую жидкость.

Через **12 часов** после введения инородного тела около раневого канала видны пикнотические ядра, изредка единичные дезинтегрированные клетки, обособившиеся клетки эктодермы и небольшие скопления тканевой жидкости с мелкими гранулами. Ядра клеток эктодермы вытянуты по направлению

к инородному телу. В тканях зародыша вблизи раневого канала, особенно в тканях, пограничных с внезародышевыми оболочками, много гранул желтка в цитоплазме клеток. Под влиянием травмы усиливаются процессы резорбции желтка. В некоторых участках эмбрионов гранулы желтка видны не только в клетках, но и в межклеточных пространствах (рис. 2). В области внезародышевых оболочек стеклянная иглолка разрушает часть желтка, и в этом месте накапливается небольшое количество жидкости, слабо окрашивающейся толуидиновым синим и анилиновым синим. ДНК ядер перибласта в области раневого канала разрушается на значительном расстоянии от раневого канала ядра без каких-либо изменений. Нередко ядра перибласта ориентированы по ходу инородного тела. Клетки внезародышевой эктодермы вблизи раны вытянуты параллельно базальной мембране. В желтке видны единичные округлившиеся клетки эктодермы и желточной мезенхимы. Ядра подобных клеток уплотнены, иногда со следами лизиса.

Таким образом, через **12 часов** после введения инородного тела в тканях зародыша и внезародышевых оболочках отмечается лишь изменение ориентации ядер и клеток и незначительное накопление тканевой жидкости в очаге повреждения. Наиболее реактивными структурами оказываются внезародышевая эктодерма и перибласт.

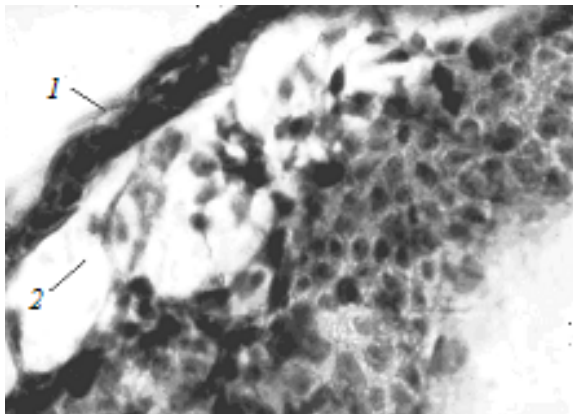


Рис. 1. Ткани эмбриона семги через 5 минут после введения стерильной нитки с кармином. 1 – эпидермис, 2 – раневой канал. Триоксигематеин Ганзена. Увел.: об. 45×, ок. 10×

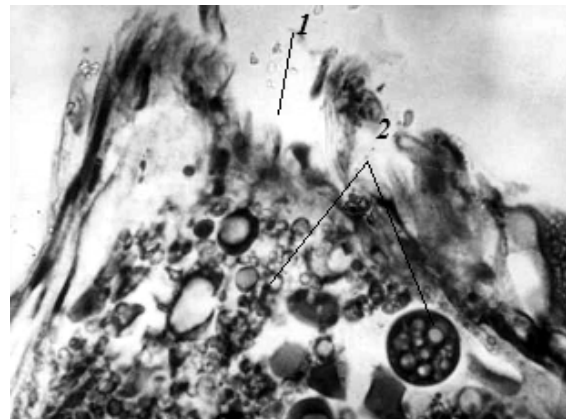


Рис. 2. Ткани эмбриона семги через 12 часов после операции. 1 – раневой канал, 2 – гранулы желтка. Триоксигематеин Ганзена. Увел.: об. 45×, ок. 10×.

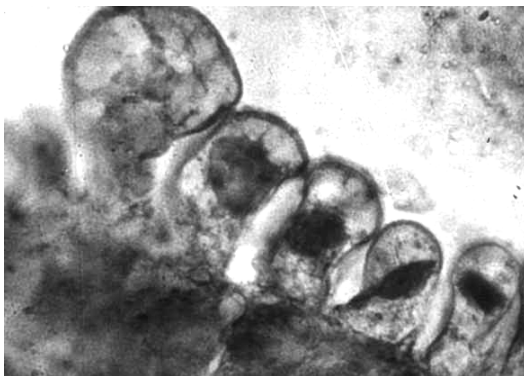


Рис. 3. Ткани эмбриона семги через 1 сутки после операции. Обособленные отдельные клетки внезародышевой эктодермы. Окрашено по Маллори. Увел.: об. 100×, ок. 10×

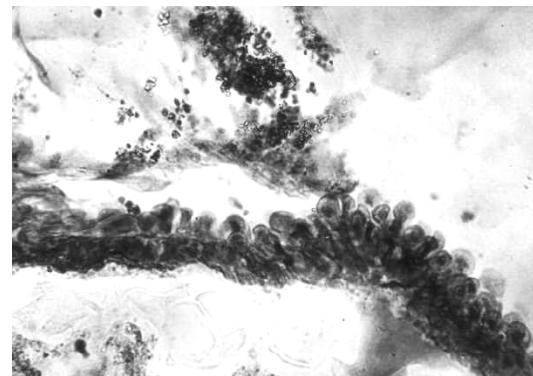


Рис. 4. Ткани эмбриона семги через 3 суток после операции. Общая картина повреждения тканей эмбриона без блуждающих клеток. Триоксигематеин Ганзена. Увел.: об. 24×, ок. 10×

Спустя **сутки** после травмы в эктодермальных клетках зародыша усиливаются процессы набухания и слущивания, главным образом, поверхностных клеток. Вблизи раневого канала поверхностные плоские клетки эктодермы приобретают грушевидную форму и выступают над поверхностью эпителия (рис. 3). В цитоплазме поврежденных клеток наблюдаются вакуоли. Во внезародышевых оболочках часть клеток эктодермы слущивается, иногда при этом обнажается базальная мембрана. Вокруг раневого канала большая часть клеток отмирает. Цитоплазма отмирающих клеток светлая с вакуолями, ядра темные, сморщенные. В месте введения стеклянной иглолки первичная яйцевая оболочка спаивается с

поврежденными участками внезародышевой эктодермы. Как и в более ранние сроки наблюдения, часть клеток внезародышевой эктодермы дезинтегрирована, клетки отделены друг от друга, сохраняются лишь их связи с базальной мембраной. В мало поврежденных клетках встречаются митозы. Ядра перибласта в очаге повреждения разрушены. В некоторых ядрах выявляется вакуоли.

Через **трое суток** после введения инородного тела в тканях хвостового стебля эмбриона видны отмирающие клетки с вакуолизированной цитоплазмой и пикнотическими ядрами (рис. 4). Эктодермальные клеточные элементы вблизи повреждения отслаиваются от подлежащих тканей, по-видимому, вследствие накопления тканевой жидкости. По сравнению с интактными зародышами в тканях травмированных эмбрионов фагоцитов с гранулами желтка больше. В области раневого канала фагоцитов нет. Во внезародышевых травмированных участках наблюдается та же картина, что и через сутки после введения инородного тела. На некотором расстоянии от раневого канала усиливаются процессы утилизации желтка. Почти каждая клетка желточной мезенхимы и внезародышевой эктодермы содержит гранулы желтка, особенно около ядер. В одном случае отслоилась на значительном расстоянии внезародышевая эктодерма, и через раневой канал в желток проникли гифы грибов. Каких-либо фагоцитов или блуждающих клеточных элементов около растущих грибов не наблюдалось.

Спустя **5-7 суток** после повреждения отторгаются погибшие клетки эктодермы. В соседних с ними участках сохраняются единичные альтерированные клетки в вакуолизированной цитоплазме. Уменьшается количество тканевой жидкости между эктодермой и подлежащими мышцами. В травмированных внезародышевых участках уменьшено количество ядер перибласта, иногда наблюдается незначительное смещение перибласта в желток. Около желтка встречаются небольшие скопления округлых клеток, фагоцитирующих гранулы желтка. Местами отмечается увеличение клеточных слоев во внезародышевой эктодерме и желточной мезенхиме.

Через **10 суток** после введения стеклянной иголочки около раневого канала нет скоплений фагоцитов. Погибшие клетки резорбируются, вместо них видны пустоты. Местами слой перибласта под эмбрионом отсутствует, и эмбриональные ткани прямо соприкасаются с желтком. Разрушенные участки перибласта не замещаются новыми. Митозов, амитозов или фрагментации ядер перибласта наблюдать не удалось. В то же время во внезародышевой эктодерме, так же, как и в тканях зародыша, постоянно наблюдаются митозы.

Таким образом, в тканях развивающихся эмбрионов семги постоянно наблюдаются фагоцитарные явления, связанные с перемещением запасного питательного вещества – желтка из желточного мешка в закладки органов зародыша. При повреждении эти физиологически обусловленные фагоцитарные явления усиливаются. В некоторых случаях при значительных повреждениях перибласта часть клеток внезародышевой эктодермы и желточной мезенхимы становятся фагоцитами, поглощающими желток и передающие его тканям зародыша, в известной степени компенсаторно замещая перибласт.

Заживление повреждения у эмбрионов семги осуществляется без существенного участия клеток фагоцитов. Поврежденные клетки и неклеточные структуры весьма быстро лизируются. Какой-либо пограничной клеточной зоны на границе между живыми и погибшими тканями не наблюдается.

Выявлена одна из особенностей эктодермальных тканей: под влиянием механического раздражения отделяться от соседних клеточных элементов и базальной мембраны и отторгаться в перивителлиновую жидкость. При значительных повреждениях внезародышевой эктодермы отторжение ее слоев позволяет первичной яйцевой оболочке спаиваться с внезародышевыми оболочками и, тем самым, закрывать дефект. При отсутствии таких спаек к поврежденным участкам быстро проникают грибы и поселяются на желтке. Таким образом, функция внезародышевой эктодермы весьма напоминает хорошо изученную функцию мезотелия позвоночных животных. Способность внезародышевой эктодермы быстро отторгаться дает возможность клеткам желточной мезенхимы на более поздних стадиях развития воспаления фагоцитировать микроорганизмы в случае их проникновения в перивителлиновую жидкость.

Перибласт при механическом воздействии легко повреждается, смещается в более глубокие участки желтка, однако способностью к регенерации почти не обладает. В опытах с введением простерилизованной нитки с кармином более четко выявляется особая ранимость перибласта и его неспособность регенерировать после механических повреждений.

Заживление связано с регенеративными явлениями и, прежде всего с перемещением мало поврежденных клеток по направлению к участкам, где клеточные элементы разрушены. Судя по наблюдающимся митозам, эктодермальные и мезенхимные элементы обладают большой способностью к регенерации. После повреждения усиливается развитие желточной мезенхимы, образующей небольшие клеточные островки.

После повреждения эмбриональных и внезародышевых клеточных элементов постоянно наблюдается накопление тканевой жидкости в поврежденных участках, увеличение гидрофильности альтерированных клеточных элементов, появление вакуолей в поврежденных клетках, изменение формы поверхностных клеток эктодермы – превращение из плоских в грушевидные.

В описанных опытах простерилизованная нитка (стеклянная иголочка) вводилась с кармином. Гранулы кармина были видны не только в зародышевых тканях, но и в тканях внезародышевых структур, в том числе на первичной яйцевой оболочке и в перивителлиновой жидкости (вне клеток). Ни в одном случае не наблюдался фагоцитоз зерен кармина.

Грибы, находящиеся на первичной яйцевой оболочке, могут не только проникать в раневой канал, но и хорошо развиваться на поврежденном желтке. Около врастающих гифов грибов клеточных скоплений не образуется.

Одной из главных особенностей реактивности эмбриональных тканей на механическое повреждение является то, что отмирают лишь клеточные элементы, непосредственно соприкасающиеся с поврежденным агентом. При повреждении хвостовой части эмбриона отмечалось отмирание только непосредственно травмированных структур, а в случаях повреждения головной части эмбриона или его средней части – отмирание всех эмбриональных закладок, а также желтка вместе с внезародышевыми частями.

### 3.3. Исследование фагоцитарных и воспалительных явлений у предличинок и личинок семги и горбуши

Сосудистая хирургическая игла и продетая через нее хлопчатобумажная нить, проходя через спинную часть хвостового стебля, повреждает кожные покровы с обеих сторон и находящиеся между ними ткани.

Через **5 минут** после введения стерильного инородного тела прилежащий к раневому каналу многослойный эпителий разрушается. В раневом канале видны разрушенные мышечные волокна, небольшое количество излившейся крови, главным образом, эритроциты. Поврежденные эпителиальные клетки несколько набухают и красятся слабее, чем обычно. Соединительнотканые мышечные прослойки в области раневого канала интенсивно закрашиваются азуром и пиронином. Концы разорванных мышц незначительно набухают, прилежащие к раневому каналу поперечнополосатые мышечные волокна резко сокращаются, соседние с ними мышечные пучки слегка раздвигаются отечной жидкостью. Следует отметить, что зона отека тканей при повреждении у предличинок и личинок семги значительно шире, чем у горбуши. На границе с сократившимися мышцами встречаются расширенные кровеносные капилляры. Аргирофильные структуры в области травмированных тканей разрушаются.

В поврежденных эпителиальных клетках, расположенных по краю раневого канала, резко уменьшается количество цитоплазматической РНК, ядра слабо окрашиваются реактивом Шиффа. К поврежденным эпителиальным клеткам прилежит эпителий, мало отличающийся от контрольных препаратов, за тем исключением, что в нем наблюдаются чаще эпителиальные клетки с двумя ядрышками, а также бобовидные ядра. Базальная мембрана около раневого канала утолщена, пигментные клетки, прилежащие к ней, разрушены. Необходимо отметить, что единичные отмирающие эпителиальные клетки накапливают в ядре гранулы кармина.

По **прошествии часа** после начала опыта увеличивается отечность соединительнотканых межмышечных прослоек. Эпителий, прилежащий к раневому каналу, покрыт широким слоем слизи. Кровеносные капилляры в септах расширены и заполнены кровью. Около разрушенных и поврежденных мышц усиливается пиронинофилия соединительнотканых волокон. На обрывках мышечных волокон видны соединительнотканые клетки эндомизия. Эти клетки являются активными фагоцитами. У предличинок семги и горбуши в цитоплазме этих клеток хорошо видны гранулы РНК. На этих сроках опыта у предличинок и личинок горбуши вокруг инородного тела отчетливо выявляются следующие зоны: раневой канал, в котором находятся волокна нитки, детрит, единичные эритроциты; слой поврежденных мышц; слой резко сократившихся поперечнополосатых мышечных пучков; слой мышц, между волокнами которых накапливается отечная жидкость; зона относительно мало измененной ткани (рис. 5). У семги менее четко выражены зоны сократившихся мышц. В эпителиальном слое, расположенном по краю раны, содержание РНК и ДНК в клетках, по сравнению с контролем, уменьшено. В опытах с семгой обнаружено увеличение количества поверхностных эпителиальных клеток, накапливающих в ядрах гранулы кармина; благодаря этому процессу маркируются отмирающие эпителиальные элементы. В опытах с горбушей фагоцитоз зерен кармина отмечается лишь в случаях, если инородное тело располагается рядом с альтерированной надкостницей позвоночного столба.

Спустя **3 часа** после введения инородного тела эпителий сохраняет отечность. Среди эпителия увеличивается количество секреторных клеток. Вокруг раневого канала мышцы расслабляются, и в нём появляются клеточные элементы крови – разрушающиеся эритроциты и единичные лимфоциты. У горбуши между эпителием и волокнами нитки в экссудате видны единичные микроорганизмы. Появляются дедифференцированные округлые соединительно-тканые клетки с крупными пикнотическими ядрами и светлой узкой слабобазофильной каймой цитоплазмы. Эти клетки имеют отростки, к некоторым из них прилипают зерна кармина. Способность тканей предличинок депонировать инородные частицы оказывается несовершенной, так как по мере расслабления мышц около инородного тела зерна кармина проникают по тканевым щелям на некоторое расстояние от места введения. Концы поврежденных мышц

утолщены, ядра мышечных волокон пикнотизируются, в миоплазме видны вакуоли. На отмирающих участках мышц отчетливо выявляются клетки эндомизия с крупными ядрами и пенистой цитоплазмой.

Через **6 часов** после операции нитка у входа в эпителий покрыта широким слоем слизи, по краю раневого канала видна "пробка" из детрита и экссудата, содержащего тонкие фибриллы. Наблюдается смещение эпителия в раневой канал. Часть смещающихся базальных клеток эпителия содержит в цитоплазме больше гранул РНК, чем соседние клетки. Эпителиальные клетки, сместившиеся в раневой канал, активно фагоцитируют гранулы кармина, детрит. Необходимо отметить, что значительной чувствительностью к повреждению обладают пигментные клетки. Разрушенные пигментные клетки встречаются под эпителием с сохранившейся базальной мембраной. Макрофаги – клетки эндомизия, находящиеся на обрывках мышц в раневом канале, содержат большое количество РНК в цитоплазме. Ядро этих клеток уплотняется, ядрышко увеличивается и интенсивно окрашивается толуидиновым синим и пиронином. В раневом канале видны единичные эритроциты, лимфоциты, фибробластические элементы, единичные полибласты. Встречаются также лейкоциты с дольчатыми ядрами.

Эпителиальный слой через **12 часов** продвигается на значительное расстояние. В ходе воспаления эпителий разрыхляется, и участки регенерата, находящиеся между волокнами нитки, обычно принимают форму широкопетлистого синцития. Эпителиальный регенерат не имеет базальной мембраны. Зерна кармина фагоцитируются чаще всего базальными клетками эпителиального регенерата, а также отдельными клетками эндомизия. В очаге воспаления появляются единичные полиморфноядерные лейкоциты с подковообразным ядром. Около отмирающих мышц отмечаются единичные моноциты.

Через **сутки** после травмы интенсифицируется врастание эпителия в раневой канал, а также фагоцитоз гранул кармина и погибших тканей. На гистологических срезах можно заметить в крупных сосудах увеличение количества лимфоцитов и полиморфноядерных лейкоцитов. В раневом канале в этот срок наблюдения возрастает количество полиморфноядерных лейкоцитов, однако, они не принимают участия в фагоцитозе. В эти сроки опыта и позже в раневом канале у предличинок и личинок семги обнаруживаются единичные микроорганизмы, которые фагоцитируются отдельными эпителиальными клетками, клетками эндомизия и эндотелиальными элементами.

Через **трое суток** после операции в области раны эпителий резко утолщен, в два-три раза увеличено количество базальных слоев. Эпителиальные клетки обрастают некротизированные ткани. Эпителиальный регенерат растет не только вглубь тканей по краю раневого канала, но и образует узкие фестончатые выросты около нитки, на поверхности тела эмбриона. Ядра эпителия отличаются значительным полиморфизмом. Размножение эпителиальных клеток осуществляется за счет митотического деления базальных клеток. Группы эпителиальных клеток активно участвуют в фагоцитозе и рассасывании некротизированных тканей. На препаратах хорошо видны ядра разрушенных эпителиальных клеток (рис. 6). Цитоплазма таких клеточных групп становится пенистой, в вакуолях нередко видны остатки погибших тканевых элементов. Фагоциты в раневом канале ведут постоянную борьбу с микроорганизмами, проникающими из воды. В эти сроки опыта удастся обнаружить в некоторых лейкоцитах гранулы кармина, свидетельствующие об их способности к фагоцитозу. Кармин наблюдается в соединительно-тканых клетках веретеновидной формы.

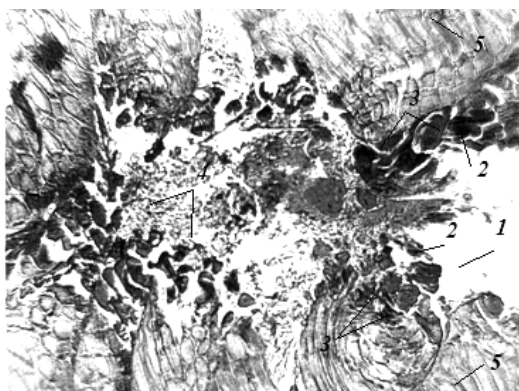


Рис. 5. Ткани личинки горбуши через 1 час после введения стерильного инородного тела с кармином. 1 – раневой канал, 2 – поврежденные мышечные волокна, 3 – слой уплотненных мышечных волокон, 4 – гранулы кармина, 5 – слой малоизмененных тканей. Окрашено азур-П-эозином. Увел.: об. 45×, ок. 10×

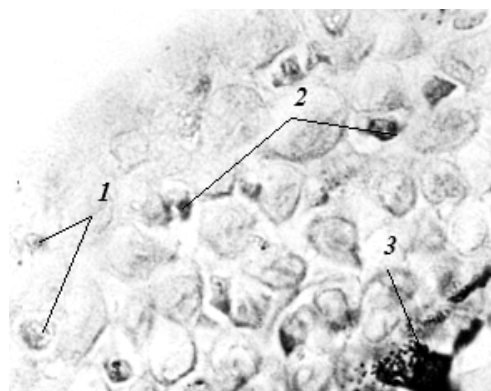


Рис. 6. Ткани личинки горбуши через 3 суток после введения стерильной нитки с кармином. 1 – ДНК в разрушенных ядрах эпителиальных клеток, 2 – ядра отмирающих клеток эпителия, 3 – пигментная клетка. Пиронин – метиловый зеленый. Увел.: об. 45×, ок. 10×

Через **7-10 суток** продолжаются описанные выше процессы обрастания эпителием инородного тела и некротизированных тканей. Элиминация инородных частиц на поздних сроках развития воспаления сопровождается гипертрофией соединительно-тканых структур, энергичным разрастанием кровеносных капилляров, а также образованием экстравазатов. В соединительной ткани встречаются митозы фибробластов. Прослойки соединительной ткани между эпителием и мышцами утолщаются, в них заметны многочисленные капилляры, иногда внесосудистые эритроциты. Около волокон нитки и погибших мышц наблюдаются скопления полибластов с бобовидными ядрами и полиморфноядерных лейкоцитов с вакуолизированной цитоплазмой. В единичных полибластах видны захваченные гранулы либо обрывки тканевых элементов. В эти сроки наблюдения эпителий чрезвычайно интенсивно фагоцитирует, почти все эпителиальные клетки в области раневого канала содержат гранулы кармина. Группы эпителиальных клеток окружают и отделяют от жизнеспособных тканей довольно большие участки поврежденных тканей. В поперечно-полосатых мышечных волокнах вблизи раневого канала увеличивается количество ядер.

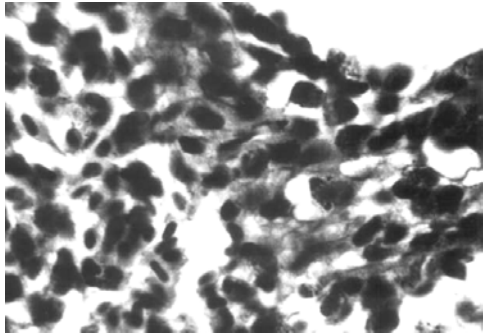


Рис. 7. Ткани личинки семги спустя 30 суток после повреждения. Эпителиальные разрастания около нитки в раневом канале. Триоксигематеин Ганзена. Увел.: об. 100×, ок. 10×

На более поздних сроках операции (**15-20 суток**) нарастает инфильтрация раневого канала блуждающими клеточными элементами. Обнаруживается много лимфоидных элементов с круглыми ядрами и узкими ободками слабо базофильной цитоплазмы. В раневом канале и между мышцами встречаются внесосудистые эритроциты, как правило, без дегенеративных изменений.

По прошествии **28-30 суток** после начала опыта эпителий в области инородного тела утолщен и разрыхлен (рис. 7). Поверхность эпителия часто покрыта широким слоем слизи. В участки эпителия, лишенные базальной мембраны, проникают кровеносные капилляры. Между волокнами нитки и на поверхности эпителия видны многочисленные микроорганизмы. В центральных участках раневого канала, окруженных мышцами, между волокнами нитки находятся многочисленные фагоциты, дезинтегрированные клетки, эпителиальный синцитий. Вся эта масса клеток прорастает

капиллярами, новообразованными поперечно-полосатыми мышечными волокнами. Нередки митозы, как в стенке капилляров, так и в эпителии, особенно в базальном слое клеток. Эндотелиальные клетки капилляров имеют пенистую цитоплазму. Фагоцитированные микроорганизмы окружены небольшими вакуолями. Необходимо отметить появление в эпителиальном регенерате крупных клеток с несколькими ядрами и интенсивно базофильной цитоплазмой, содержащей большое количество рибонуклеиновой кислоты. В это время опыта в раневой канал из воды проникают микроорганизмы. Следует отметить, что гибель предличинки после введения инородного тела обычно наступает в эти же сроки опыта. При микроскопическом анализе оказывается, что эпителий и отчасти подлежащие ткани в области введенного инородного тела дегенерируют. Эпителий резко отечен, утолщен, имеет форму синцития; большая часть клеток отмирает. Фагоцитарные явления со стороны эпителия выражены слабо.

#### 4. Выводы

**Антимикробная активность** перивителлиновой жидкости у эмбрионов семги и горбуши испытывает значительные колебания. Жидкая часть желтка содержит субстанции, проявляющие антимикробную активность. Желток более вязкой консистенции является хорошей питательной средой для испытываемых микроорганизмов.

Поверхность хорошо развивающихся икринок содержит незначительное количество посторонней микрофлоры. В то же время на поверхности икринок, обрастающих сапролегнией, встречается большое количество сапрофитных микроорганизмов. Микроорганизмы, поселяющиеся на поверхности икры, выполняют роль барьера, препятствующего проникновению микробов в перивителлиновую жидкость. При проникновении микроорганизмов через оболочки они встречаются с антимикробными субстанциями желтка и крови зародыша. На более ранних этапах эмбрионального развития до появления кровеносной системы антимикробная активность эмбриональных жидкостей отчетливо выражена.

Результаты исследований показали, что защитные свойства у **эмбрионов рыб** зависят от антибиотической активности желтка, перивителлиновой жидкости и зародышевых тканей, а также от своеобразных формообразовательных процессов, наступающих при повреждении. В тканях развивающихся эмбрионов семги и горбуши при повреждении наблюдаются фагоцитарные явления, связанные с перемещением желтка в закладки органов и тканей зародыша. Воспалительные процессы сопровождаются накоплением тканевой жидкости в мезодермальных слоях, увеличением гидрофильности клеточных элементов.



Одной из особенностей реактивности эмбриональных тканей на механическое повреждение является то, что отмирают лишь клеточные элементы, непосредственно соприкасающиеся с повреждающим агентом. Инеродное тело не вызывает волны повреждения тканей, как у взрослых позвоночных. Регенерационные явления становятся этапом, завершающим реакцию на повреждение.

В первые часы после травмы у *предличиннок, личинок семги и горбуши* механическое отграничение повреждающего агента обеспечивается перемещением в раневой канал эпителиального слоя кожи. Депонирование повреждающего агента осуществляется благодаря местному сокращению мышц. Фагоцитоз отмирающих тканей и кармина наступает в первые часы после повреждения. На ранних сроках опыта в этом процессе участвуют клетки эпителия и единичные соединительно-тканые клетки.

Содержание ДНК и РНК в области раневого канала меняется в ходе воспаления. В первые часы в поврежденных тканях, прежде всего, в эпителиальном слое, снижается количество ДНК и РНК. Через 6-12 часов наступает фаза накопления РНК в эпителии раневого канала, а также в цитоплазме и ядрышке некоторых соединительно-тканых клеток. До 7 суток происходит прогрессивное накопление цитоплазматической и ядерной РНК в эпителии и отдельных соединительно-тканых клетках.

Лейкоциты крови, особенно моноциты, лимфоциты и отчасти полиморфноядерные лейкоциты, принимают участие в лизисе некротизированных тканей.

У предличиннок, личинок семги и горбуши идет формирование комплекса воспалительных явлений с одновременным замедлением темпов регенерационных процессов.

Весьма важны и факты изменения реактивности тканей на поздних этапах воспаления. В раневом канале поселяются микроорганизмы и, вызывая дезинтеграцию регенерирующих тканей, начинают постепенно проникать в ткани зародыша. На поздних этапах воспаления организм предличиннок и личинок семги и горбуши вынужден вести "борьбу" с бактериями и грибами, поселившимися на травмированных тканях, и в ряде случаев "победу" одерживают микроорганизмы, а предличинки гибнут.

Морфологические перестройки у предличиннок семги и горбуши в ответ на введение стерильного инородного тела имеют сходный характер. Однако у предличиннок семги в результате травмы происходит более распространенное повреждение мышечных тканей и обнаруживается широкая зона отечных тканей. У семги менее четко выражена зона локально сократившихся мышц около раневого канала.

## Литература

- Asbakk K. Elimination of foreign material by epidermal malpighian cells during wound healing in fish skin. *J. Fish Biol.*, N 4, p.953-966, 2001.
- Glenny Gavik W., Petrie-Hanson Lora. Phagocytic responses of *Ictalurus punctatus* fry to intraperitoneally study injected particulate material: A light microscopy and cytochemical study. *USA, New Orleans*, 2002.
- Ingram G.A. Substances involved in the natural resistance of fish to infection. *J. Fish. Biol.*, N 16, p.23-60, 1980.
- Manning M. J., Tatner M.F. Fish immunology. *London, Acad. Press*, 374 p., 1985.
- Zhuravleva N.G., Minchenok E.E. Immunological reactions in the early ontogenesis of Atlantic salmon and humpback salmon. *Phytochemistry Reviews*, N 3, p.431-439, 2005.
- Вихман А.А. Иммунофизиологический статус рыб – объектов аквакультуры. *Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.*, 48 с., 1994.
- Грищенко Л.И., Рудиков Н.И. Проблемы патологии и иммунитета при инфекционных болезнях рыб. *М., ВИНТИ*, т.1, с.190-211, 1985.
- Кондратьева И.А., Киташова А.А. Современные представления об иммунной системе рыб. 2. Функционирование и регуляция иммунной системы рыб. *М., Иммунология*, № 2, с.97-101, 2002.
- Кондратьева И.А., Киташова А.А., Ланге М.А. Современные представления об иммунной системе рыб. 1. Организация иммунной системы рыб. *М., Вест. Моск. Ун-та, Сер. 16, Биология*, № 4, с.11-20, 2001.
- Лукьяненко В.И. Иммунобиология рыб: врожденный иммунитет. *М., Агропромиздат*, 271 с., 1989.
- Микряков В.Р. Закономерности функционирования иммунной системы пресноводных рыб. *Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.*, 38 с., 1984.
- Минченок Е.Е., Журавлёва Н.Г. Защитные реакции в раннем онтогенезе семги и горбуши. *Мурманск, изд-во МГТУ*, с.57-59, 2003.
- Праздников Е.В., Михайлова И.Г. Особенности воспалительных явлений у предличиннок горбуши. *М.-Л., Наука*, вып. 12(16), с.120-139, 1966.
- Фонгалин Л.Н. Проблема происхождения иммунной системы позвоночных животных. *М., Иммунология*, № 3, с.5-20, 1988.