

Изучение Rodlet клеток в жабрах рыб, обитающих в реке Жайык

А. Мауталиева, И.М. Жаркова, С.С. Кобегенова, А.А. Бакиева, Д.Ю. Гусейнова

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан,
fazyl.anel2@gmail.com, irina.zharkova@kaznu.kz

Введение

Rodlet (палочковидные) клетки относятся к лейкоцитам, которые отвечают за такие функции, как защита организма от чужеродных тел, обеспечение адаптации рыб к биотическим и абиотическим факторам и иммунитет к паразитам.

Долгое время сами Rodlet клетки считали паразитами, но современные исследования опровергли данное утверждение и доказали их принадлежность к лейкоцитам – эозинофильным гранулоцитам. Были обнаружены их клетки-предшественники, дифференцированы стадии развития.

Rodlet клетки встречаются в большинстве органах костистых рыб как у морских, так и у пресноводных видов. Они мигрируют и обнаруживаются в различных системах организма, включая дыхательную, пищеварительную, продуктивную, кожную, иммунную, сердечно-сосудистую, скелетную системы (Ostrander, 2000; Mendonca et al., 2005; Балабанова и др., 2006; Mazon et al., 2007; Назарова, 2011; Mokhtar, 2015).

Различные стадии развития Rodlet клеток были идентифицированы в обонятельном органе тайландского лабео, *Epalzeorhynchus frenatum* (Abd-Elhafeez et al., 2016). Стерженьки происходят из обонятельной стромы. Их предшественники имеют обширные пузырьки, которые постепенно исчезают и заменяются, приобретают форму гранул – отсюда и название гранулярной стадии. В гранулах образуется центральная стержневая сердцевина на переходной стадии стержнеобразования. На зрелой стадии секреторные гранулы приобретают типичную форму палочковидных гранул. Зрелые Rodlet клетки имеют отличительные признаки, включая толстую капсулу, стержневидные секреторные гранулы с центральным плотным ядром (рис. 1).



Рис. 1 – Различные стадии Rodlet клеток

Для Rodlet клеток было предложено несколько функций. Они были вовлечены в транспортировку ионов, чтобы участвовать в осморегуляции (Giari et al., 2006) и выполнять сенсорную функцию (Dezfuli et al., 2007). Широко распространенная теория о том, что они



функционируют как иммунные клетки (Reite et al., 2006; Matisz et al., 2006; Abd-Elhafeez et al., 2018). Она основывается на высвобождении их специфических секреторных гранул – палочек, благодаря сократительной способности волокнистого (фиброзного) слоя (DePasquale, 2020).

Показано, что гранулы этих клеток содержат пероксидазу, щелочную фосфатазу, углеводы и сиаловую кислоту, в центральной палочке обнаружены тирозин, триптофан и гистидин (Iger, Abraham, 1997; Reite, Evensen, 2006; Abd-Elhafeez et al., 2018).

Между Rodlet клетками и окружающими их клетками обнаружены десмосомы и герметичные контакты. Это подтверждает, что палочковые клетки относятся к секреторирующим клеткам рыб, а не к простейшим паразитам (Балабанова, 2006; Назарова, 2011; Wala et al., 2018; Abd-Elhafeez et al., 2018).

Имеются данные экспериментов, которые служат доказательством того, что возможно потенциальное использование Rodlet клеток в качестве биомаркеров, независимо от их функции.

Качество воды в основном влияет на дыхательный и желудочно-кишечный тракты рыб. Гистопатология костистых рыб является чувствительным индикатором стресса, вызванного загрязнением, поскольку их органы играют центральную роль в трансформации различных активных химических соединений в водной среде. В частности, жабры находятся в центре токсикологических исследований, так как они являются первоначальной мишенью переносимых через воду ксенобиотиков и чрезвычайно чувствительны к ним из-за постоянного контакта с внешней средой. Сильно разветвленная морфология жаберных тканей, а также циркуляция воды через них способствуют накоплению их.

Сведения о зависимости пролиферации Rodlet клеток от развития компенсаторно-приспособительных и патологических процессов в доступной литературе отсутствуют. Между тем это представляется важным для того, чтобы понимать процесс адаптации рыб.

Кроме того, исследование Rodlet клеток может быть важным для лучшего понимания сложной иммунной системы костистых рыб.

Целью нашей работы было исследовать наличие Rodlet клеток у рыб реки Жайык, провести гистопатологический анализ жабр рыб реки Жайык и сравнить пролиферацию и соотношение Rodlet клеток на разных стадиях развития в зависимости от имеющихся компенсаторно-приспособительных и патологических реакций с учётом летнего и осеннего сезонов.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили жабры 19-ти видов (*Ballerus sapa*, *Squalius cephalus*, *Blicca bjoerkna*, *Aspius aspius*, *Scardinius erythrophthalmus*, *Abramis brama*, *Rutilus rutilus*, *Chondrostoma nasus*, *Carassius gibelio*, *Ballerus ballerus*, *Pelecus cultratus*, *Leuciscus idus*, *Vimba vimba*, *Cyprinus carpio*, *Silurus glanis*, *Esox lucius*, *Perca fluviatilis*, *Sander volgensis*) рыб из 4-х семейств (Cyprinidae, Siluridae, Esocidae и Percidae) отловленных в реке Жайык летом и осенью 2020 года.

Сбор материала производился при поддержке руководства и сотрудников Атырауского и Западно-Казахстанского филиалов НПЦРХ с двух станций в районе г. Уральск («Кабылтобе» и «Кушум») и с трёх станций г. Атырау («Татарск», «Дамбинск» и «12 квадрат предустье»).

Летний сбор материала проводился с 8 августа по 16 августа, осенний – с 16 сентября по 23 сентября 2020 года.

В настоящей работе все биологические материалы были этикетированы, зафиксированы 10% формалином и доставлены в лабораторию НИИ биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби для дальнейшей обработки. Ихтиологический материал обрабатывали традиционными методами морфо-биологического анализа (Правдин, 1939; Васильев, Непорожняя, 2008).

Статистическая обработка проводилась в программе Microsoft Excel (Лакин, 1990).

Обработка материала для гистопатологического исследования проводилась следующим образом: на месте сбора рыб фиксировали в 10%-м формалине.

В лаборатории морфологии животных НИИ проблем биологии и биотехнологии для гистологического анализа отбираются кусочки органов и обрабатываются классическими методами микроскопической техники (Ромейс, 1953). Каждый кусочек ткани представляет собой один образец.

Гистологические препараты изучаются с помощью светового тринокулярного микроскопа, оснащенного цифровой камерой. Микрофотографирование полученных срезов проводится при увеличениях x100, x200, x400, x1000. Гистологическому анализу было подвергнуто 19 видов рыб. Изготовлено 19 блоков, включающих жабры. Приготовлено 38 гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином. Все гистологические препараты проанализированы и сфотографированы на микроскопе Microoptix MX300T, с системой визуализации Scoreimage 9.0.

Результаты

В данной работе гистопатологическому анализу подверглись 15 видов рыб из семейства Cyprinidae, 1 вид рыб из семейства Siluridae, 2 вида рыб из семейства Percidae и 1 вид рыб из семейства Esocidae.

В результате гистопатологического исследования у всех рыб выявлены разные по характеру и степени проявления морфологические нарушения жабр, свидетельствующие о нарушении дыхательной функции, вследствие воздействия на организм неблагоприятных экологических факторов, таких как биотические, абиотические, включая антропогенные.

Выявленные нарушения аналогичны изменениям, отмеченным при воздействии загрязняющих веществ на организм рыб в (Roberts, 2012): значительная пролиферация многослойного неороговевающего эпителия, приобретающего вид эпителиальных пластинок с атрофированными ламеллами, гиперплазия респираторного эпителия, гипертрофия бокаловидных клеток, отек и слущивание респираторного эпителия на верхушках ламелл, резкое расширение капилляров, стаз форменных элементов в них, появление аневризм, значительная деформация гиалинового хряща, повлекшая за собой дугообразное изменение филамента (рис. 2).

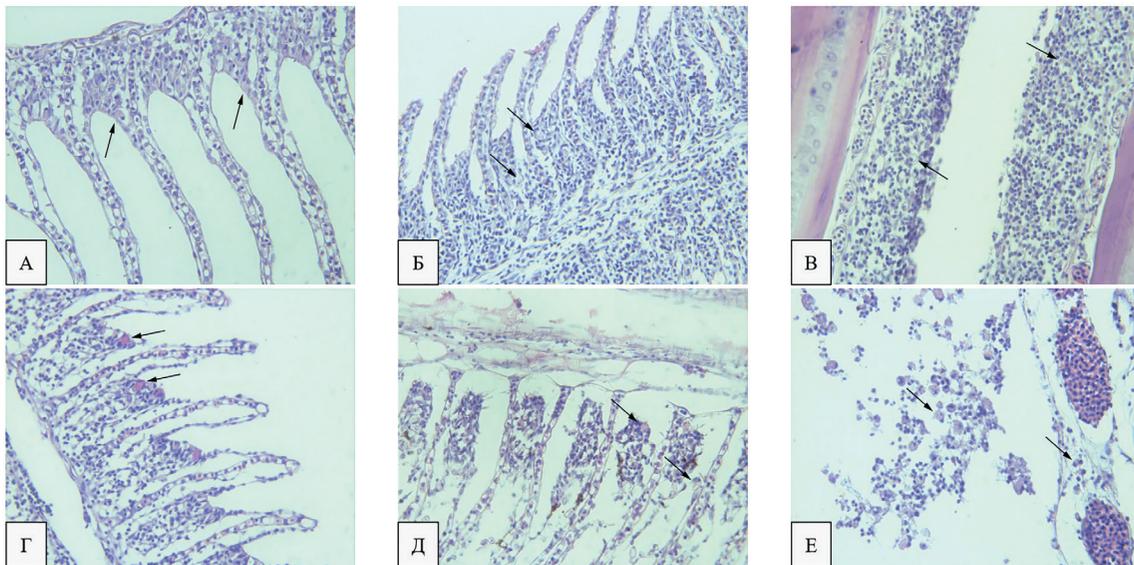


Рис. 2 – А, Б, В) Проплиферация жаберного эпителия в жабрах окуня, *Perca fluviatilis* (лето), жереха, *Aspius aspius* (осень), густера, *Blicca bjoerkna* (осень); Г, Д, Е) Деструкция жаберного эпителия в жабрах сома, *Silurus glanis* (лето), рыбца, *Vimba vimba* (осень), сазана, *Cyprinus carpio* (осень). Rodlet клетки выделены стрелками. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x400

Загрязнение воды вызывало гистопатологические изменения в жабрах рыб главным образом потому, что они являются основными органами-мишенями водных загрязнителей. Повышенное количество Rodlet клеток на третьей зрелой и четвертой разрыва стадиях в жабрах всех проанализированных видов может быть связана с наблюдаемыми компенсаторно-приспособительными и гистопатологическими изменениями

В результате гистопатологических исследований жабр 4-х семейств рыб нами было показано, что патологические процессы сопровождались пролиферацией Rodlet клеток, при этом Rodlet клетки находились на разных стадиях развития в зависимости от степени выраженности патологических реакций у рыб.

Результаты наших исследований показали наличие трёх из четырех стадий развития Rodlet клеток в жабрах исследуемых рыб.

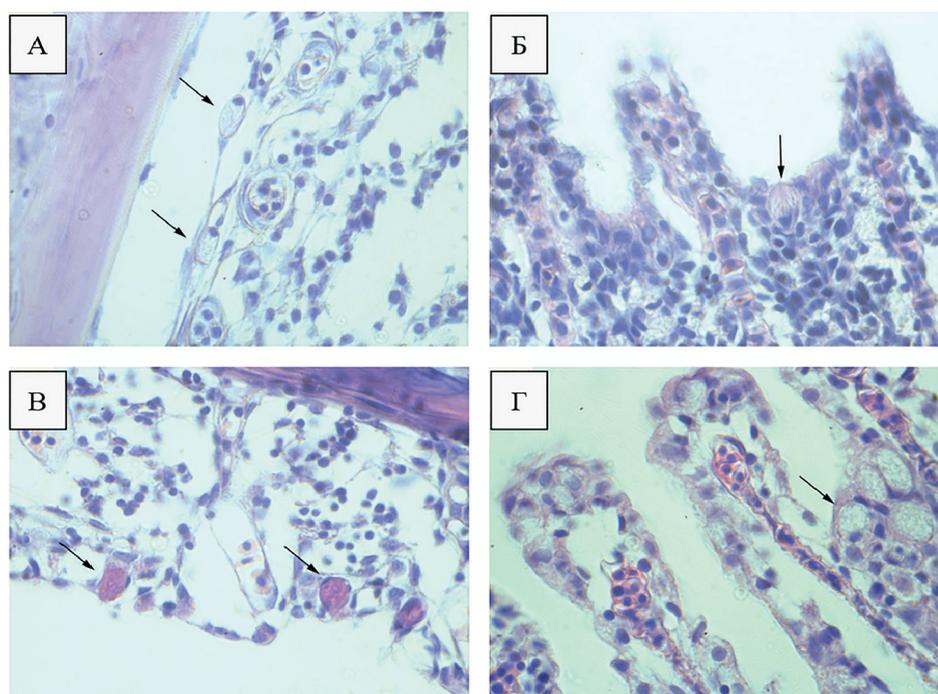


Рис. 3 – А) Rodlet клетка на 2-й переходной стадии у жереха, *Aspius aspius* (осень). Б) Rodlet клетка на 3-й зрелой стадии у карася, *Carassius gibelio* (лето). В, Г) Rodlet клетка на 4-й стадии разрыва у сома, *Silurus glanis*. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x1000

Rodlet клетки на первой стадии при гистопатологическом исследовании нами обнаружены не были.

На второй созревающей стадии (рис. 3, А) Rodlet клетки располагались в первичном жаберном эпителии ближе к хрящевой основе жаберной ламеллы и были ориентированы вдоль хряща. Rodlet клетки на данной стадии имели вытянутую овальную форму, зернистую цитоплазму, заполненную характерными для них секреторными гранулами и ядро с яркой базофильной окраской, расположенной с краю.

На третьей переходной стадии (рис. 3, Б) Rodlet клетки перемещались от базальной части эпителиального пласта в поверхностные слои эпителия и располагались перпендикулярно к хрящевой основе первичной жаберной ламеллы, где ядро было обращено к базальной части.



Rodlet клетки имели вытянутую овальную форму. Клетка была окружена четко выраженной капсулой. Цитоплазма содержала палочковидные секреторные гранулы, ориентированные вдоль клетки и занимающие большую её часть.

На четвертой стадии разрыва Rodlet клетки имели округлую форму и располагались как в первичном, так и во вторичном эпителии. Во вторичном жаберном эпителии их можно было увидеть как на апикальной части ламелл, так и в межламеллярном пространстве. Цитоплазма данных Rodlet клеток содержала базофильное ядро, расположенное по краю клетки, и была либо ярко эозинофильной, либо светло пенистой (рис. 3, В, Г), что вероятно связано с процессом выброса секрета.

Для сопоставления связи патологических процессов с Rodlet клетками, а также их сезонной динамики было проведено статистическое исследование.

В ходе исследования мы разделили рыб на две группы, в зависимости от сезона вылова. В каждой группе выделили две подгруппы – в первой подгруппе в жабрах рыб наблюдались компенсаторно-приспособительные реакции, а во второй – патологические. В наших полях зрения были обнаружены Rodlet клетки на второй, третьей и четвертой стадиях развития.

При компенсаторно-приспособительных процессах наблюдаются пролиферация второй и третьей стадии развития Rodlet клеток. При развитии патологических процессов, таких как некроз и деструкция жаберного эпителия значительно увеличивается количество клеток на четвертой стадии развития вне зависимости от сезона отлова рыбы. Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что имеется зависимость пролиферации Rodlet клеток от развития компенсаторно-приспособительных и патологических процессов.

Выводы

Показано, что у большинства отловленных рыб из 4-х семейств (Cyprinidae, Siluridae, Percidae, Esocidae) наблюдались компенсаторно-приспособительные (пролиферация и гиперплазия клеток первичного и вторичного жаберного эпителия) и патологические (отек, нарушение микроциркуляторного русла, деформация хряща, некроз и деструкция жаберного эпителия) процессы. Существенной разницы между сезонами отмечено не было.

Показано присутствие Rodlet клеток в жабрах у всех изученных видов рыб на второй, третьей и четвертой стадии развития.

Результаты нашего исследования не опровергают данные (Назарова, 2011; Abd-Elhafeez, 2016; Wala et al., 2018; Abd-Elhafeez, 2018 и других), что Rodlet клетки жабр выделяют свое содержимое в окружающую среду и в сочетании со стратегическим расположением вокруг кровеносных сосудов, могут играть важную роль в защите хозяина.

Скопление Rodlet клеток в местах некроза тканей в результате воздействия на организм ксенобиотиков, по нашему мнению, указывает на то, что данные клетки участвуют в неспецифических защитных реакциях организма на действие факторов окружающей среды.

Поскольку костистые рыбы являются самой многочисленной группой позвоночных на планете, они широко используются в качестве биоиндикаторов в большинстве водных экосистем. Таким образом Rodlet клетки могут использоваться в качестве маркеров патологических процессов органов костистых рыб, в нашем случае, жабр, и как предполагается, являются частью неспецифического иммунного ответа.



Литература

- Балабанова Л.В. Палочковые клетки рыб разных видов // Биология внутренних вод. 2006. С. 83–88.
- Васильев А.С., Непорожня И.А. Морфопатологический анализ рыб как индикатор экологического состояния водоемов // Актуальные проблемы экологии Ярославской области, мат. 4 науч.-практ. конф. 2008. Т. 1. № 4. С. 246–248.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
- Назарова Е.А. Палочковые клетки некоторых видов пресноводных и морских костистых рыб отрядов карпообразные и окунеобразные // Морфология. 2011. Т. 139. № 1. С. 64–68.
- Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. Л.: ЛГУ, 1939. 256 с.
- Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Издательство иностранной литературы, 1953. 719 с.
- Abd-Elhafeez H.H., Soliman S.A. Origin of rodlet cells and mapping their distribution in ruby-red-fin shark (rainbow shark) *Epalzeorhynchus frenatum* (Teleostei: Cyprinidae): Light, immunohistochemistry and ultrastructure study // J. Cytol Histol. 2016. Т. 7. P. 435.
- DePasquale J.A. Tropomyosin and alpha-actinin in teleost rodlet cells // Acta Zoologica. 2020. Vol. 102. № 3. P. 323–332.
- Dezfuli B.S., Capuano S., Simoni E., Previati M., Giari L. (2007) Rodlet cells and the sensory systems in zebrafish (*Danio rerio*) // Anat. Rec. (Hoboken). 2007. Vol. 290(4). P. 367-374.
- Giari L., Manera M., Simoni E., Dezfuli B.S. Changes to chloride and rodlet cells in gills, kidney and intestine of *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to reduced salinities // J. of Fish Biology. 2006. Vol. 69(2). P. 590- 600.
- Iger Y., Abraham M. Rodlet cells in the epidermis of fish exposed to stressors // Tissue and Cell. 1997. Vol. 29. № 4. P. 431–438.
- Matisz C.E., Goater C.P., Bray D. Density and maturation of rodlet cells in brain tissue of fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to trematode cercariae // Int. J. Parasitol. 2010. Vol. 40(3). P. 307-312.
- Mazon A.F., Huising M.O., Taverne-Thiele A.J. The first appearance of Rodlet cells in carp (*Cyprinus carpio* L.) ontogeny and their possible roles during stress and parasite infection // Fish & Shellfish Immunology. 2007. Т. 22. № 1-2. P. 27-37.
- Mendonca I., Matos E., Rodrigues G. Rodlet cells from the gills and kidneys of two brazilian freshwater fishes: an ultrastructural study // Braz. J. Morph Sci. 2005. Vol. 224. P. 187-192.
- Mokhtar D.M. Comparative structural organization of skin in red-tail shark (*Epalzeorhynchus bicolor*) and guppy (*Poecilia Reticulata*) // J. of Aquaculture Research & Development. 2015. Vol. 6. № 6. P. 1.
- Ostrander G.K. The Laboratory Fish. Elsevier, 2000. 288 p.
- Reite O.B., Evensen O. Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells // Fish & shellfish immunology. 2006. Vol. 20. № 2. P. 192-208.
- Roberts R.J. Fish Pathology. 4th ed. Blackwell Publishing Ltd, 2012. 587 p.
- Walaa F.A., Marwa M.F., Zeinab A. Responses of the rodlet cells to metacercarial infections in *oreochromis niloticus* // Assiut Veterinary Medical J. 2019. Vol. 65. № 160. P. 59-71.