

## ПРЕДОПЕРАЦИОННАЯ ИММУНОКОРРЕКЦИЯ ГИБРИДА (БЕЛУГА Х СТЕРЛЯДЬ) В УСЛОВИЯХ ИНДУСТРИАЛЬНОГО РЫБОВОДСТВА

С.Ю. Касаева, Н.В. Судакова, О. А. Письменная, Е.Н. Савенкова,  
А.Н. Дегтярев

ФГУП НПЦ по осетроводству «БИОС», г. Астрахань, 414000,  
ул. Володарского, 14а, Россия, E-mail: [bios94@mail.ru](mailto:bios94@mail.ru), [bios94@bk.ru](mailto:bios94@bk.ru)

В последние годы в медицинской и ветеринарной практике получили широкое применение лекарственные препараты из группы фторхинолонов: ципролет, энрофлон, байтрил, флуксациллин, энроксил, нортил и др., которые обладают широким спектром антибактериального действия, а также иммуномодулирующей активностью за счет стимуляции фагоцитоза и синтеза иммуноглобулинов. Однако, регулярное использование антибиотиков может повлечь за собой определенные негативные последствия, а именно: изменение микробиоценоза рыбы и воды, появление резистентных форм бактерий. Кроме того, товарная рыбная продукция может стать причиной пищевых токсикозов человека в случае использования в пищу рыбы, которой скармливали в процессе выращивания сверх установленные нормы антипаразитарных и антибактериальных препаратов [Васильков, 1999]. Поэтому, после курса антибиотикотерапии, необходимо проводить курс иммунореабилитации. В рыбной практике в качестве иммунореабилитаторов используются пробиотические препараты (ветосубалин, Az-28, Био2 + Б, лактобактерин) [Мирзоева, 2001]. Кроме того, применяются витамины (аскорбиновая кислота, ретинол) и различные БАД, оказывающие некоторое иммуностимулирующее действие, усиливая образование антител, и активирующие неспецифическую резистентность организма (фагоцитоз, лизосомальные ферменты и пр.) [Киташова с соавт., 1997]. Таким образом, современные условия диктуют необходимость поиска новых ме-

тодов борьбы с заболеваниями и лечебно-профилактических препаратов, безвредных для рыб и человека.

С целью снижения риска возникновения послеоперационных осложнений у рыб осетровых пород после биопсии и для их альтернативного медикаментозного лечения, на производственной базе НПЦ «БИОС» была проведена экспериментальная работа с применением иммуномодулирующего препарата (ИМ). Для эксперимента были сформированы 4 группы рыб (2-х годовики гибрида белуга х стерлядь). В группе «опыт 1» рыбам иммуномодулятор вводили внутривенно в дозе 1 у.е./кг массы тела; группе «опыт 2» - 2 у.е./кг однократно, непосредственно после взятия крови из хвостовой вены перед операцией. В этих вариантах иммуномодулятор применяли в качестве средства монотерапии. Бестерам группы «контроль» после операции, также однократно, но внутримышечно вводили окситетрациклин пролонгированного действия, используемый в ветеринарии, в дозе 0,1 мл/кг биомассы (Справочник..., 2000). Все рыбы имели индивидуальные метки. В процессе эксперимента физиолого-иммунологическом анализе было подвергнуто 124 пробы крови. Взятие крови от рыб четырех групп осуществляли до введения препаратов и, соответственно, до и через 15, 30 и 45 суток после операции. В течение всего периода эксперимента рыбы четырех групп находились под регулярным ихтиопатологическим контролем. Пищевой рацион рыб, а так же условия их содержания не имели существенных различий между контролем и опытом.

Подсчет форменных элементов крови проводили унифицированным методом в счетной камере Горяева, СОЭ – по методу Панченкова [Лиманский и др., 1986]. Мазки крови фиксировали раствором Майн-Грюнвальда и докрашивали азур-эозином по Романовскому. Подсчет лейкоцитарной формулы проводили по методике Ивановой (1983). Уровень гемоглобина в крови определяли гемоглобинцианидным методом. Лизосомально-катионный тест (ЛКТ) проводили по методу Пигаревского В.Е., Мазинга Ю.А. (1981). Уровень иммуноглобулинов определяли по унифицированной методике Воловенко М.А. (1975).

Мониторинг физико-химических условий водной среды (температура, кислород, рН, перманганатная окисляемость, содержание нитрит-ионов, нитрат-ионов, ионов аммония, свободной углекислоты) осуществляли по унифицированным методикам, принятым в рыбоводстве. Проведение экспериментальных работ совпало с весенним паводком, что обусловило некоторую нестабильность физико-химических показателей. Однако, содержание  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{CO}_2$ , уровни рН и перманганатной окисляемости находились в пределах рыбоводных норм.

В начале эксперимента, при проведении прижизненного ихтиопатологического осмотра, каких-либо отклонений в состоянии рыбы не выявлено. На пятнадцатые сутки после лапаротомии у всех бестеров отмечено воспаление в области шва. Однако, у рыб из 1-й и 2-й групп зафиксирована клиническая картина, характерная для острой фазы воспалительного процесса в области разреза и наложения швов (значительная гиперемия, покраснение, очаговый некроз покровных и подлежащих тканей, выделение кровянистого экссудата), снижение мышечного тонуса, вялость; в области брюшных жучек, хвостового стебля и меток потертости и у некоторых особей – петехии. У большинства рыб из третьей группы, инъецированных окситетрациклином пролонгированного действия, тоже отмечена воспалительная реакция, но менее выраженная, края разрезов были ровными, с незначительной гиперемией тканей и выделением сукровицы. Также у этих особей зарегистрировано снижение мышечного тонуса и ответной реакции на раздражители.

На тридцатые сутки у гибридов из 1 и 2 групп зарегистрировано улучшение состояния швов; при этом выявлена повышенная регенерация покровных и подлежащих тканей, прекращение некротических процессов. У контрольных оперированных особей,

наоборот, было зафиксировано некоторое ухудшение физиологического состояния. При этом наблюдалась активизация воспалительных процессов в раневой области, а так же покраснение хвостового стебля в месте предыдущего забора крови. На промежуточном ихтипатологическом осмотре у некоторых экспериментальных особей, в связи с удовлетворительным состоянием, были сняты швы. В большей мере это касалось рыб, которым вводили иммуномодулятор в дозе 2 у.е./кг.

На сорок пятые сутки, при очередном взятии крови, у всех оперированных рыб были сняты швы, однако у контрольных особей (окситетрациклин) все же оставались признаки воспалительных процессов.

Уровень гемоглобина в крови (Hb г/л) в начале эксперимента был достоверно различен ( $p < 0,05$ ) между всеми группами, кроме бестеров, инъецированных иммуномодулятором (2 у.е./кг) и контрольными неоперированными (табл.1).

Таблица 1. Показатели крови бестеров в условиях эксперимента

вариант	показатель	сутки			
		0	15	30	45
ИМ 1 у.е./кг	Hb(г/л)	58,21±5,18	62,50±5,22	49,27±4,50	68,40±5,77
ИМ 2 у.е /кг		93,85±5,19	68,69±5,74	52,00±2,30	83,09±8,49
окситетрациклин 0,1 мл/кг		85,77±3,79	74,26±4,45	59,29±3,87	88,43±9,74
ИМ 1 у.е /кг	Eг, 10 <sup>12</sup> /л	0,97±0,05	0,81±0,07	0,79±0,09	0,86±0,06
ИМ 2 у.е/кг		1,07±0,05	1,16±0,10	0,75±0,08	0,90±0,06
окситетрациклин 0,1 мл/кг		1,22±0,07	0,94±0,13	0,90±0,11	1,00±0,08
ИМ 1 у.е /кг	Hb/Eг, 10 <sup>12</sup> /л	60,50±4,38	80,99±6,68	65,05±4,15	82,55±8,78
ИМ 2 у.е/кг		88,39±4,85	55,26±6,06	73,71±6,18	95,03±9,42
окситетрациклин 0,1 мл/кг		71,77±4,18	87,99±10,32	70,74±4,83	92,30±7,62
ИМ 1 у.е /кг	СОЭ (мм/ч)	2,65±0,21	7,05±0,32	6,10±0,30	4,20±0,23
ИМ 2 у.е /кг		3,70±0,26	6,60±0,22	5,60±0,16	4,10±0,27
окситетрациклин 0,1 мл/кг		3,90±0,26	5,45±0,24	7,14±0,28	4,64±0,39
ИМ 1 у.е /кг	Ig (г/л)	6,68±0,41	7,47±0,50	8,05±0,53	5,16±0,26
ИМ 2 у.е /кг		5,87±0,33	6,86±0,30	7,16±0,33	4,85±0,16
окситетрациклин 0,1 мл/кг		5,71±0,31	6,46± 0,63	7,15±0,74	5,04±0,36

В дальнейшем, при исследовании этого показателя достоверных различий не выявлено. Содержание Hb(г/л) у групп 2, 3 было не стабильным, достоверно ( $p < 0,05$ ) снижалось в течение тридцати суток и имело тенденцию к повышению только к сорок пятым. У группы особей, инъецированных иммунным препаратом в дозе 1 у.е./кг, на 15-е сутки зарегистрировано незначительное увеличение гемоглобина, но при статистическом анализе изменения в этот период являлись не достоверными ( $p > 0,05$ ). По всей видимости, на уровне гемоглобина в крови сказалось не только проведение операции, но и общая перестройка организма рыб после зимовки, а так же факторы окружающей среды.

При анализе процессов гемопоэза и содержания гемоглобина в одном эритроците (ЦП) (см. табл. 1) обнаружено, что в данном случае компенсация гемоглобина в крови

на уровне, не выходящем за границы критического для функционирования организма, осуществлялась различными путями. В первые пятнадцать суток у групп 1 и 3 этот процесс происходил на фоне снижения общего числа эритроцитов за счет увеличения Hb в одном эритроците, а у группы рыб, инъецированной иммуномодулятором в дозе 2 у.е./кг - за счет усиления эритропоэза.

На тридцатые сутки наблюдали противоположную картину - у группы 2 отмечено увеличение ЦП на фоне эритропении. При этом минимальный уровень гемоглобина в крови зафиксирован у всех экспериментальных групп бестеров. Вероятно, это связано с воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды. Эксперимент совпал с весенним паводком и, как правило, в этот период регистрируется ухудшение токсикологической обстановки (тяжелые металлы, фенолы, нефтепродукты и т.д.) в источниках водозабора (Катунин Д.Н. с соавт., 2004). Скорость оседания эритроцитов находилась в пределах физиологической нормы (см. табл. 1). Характер ее изменения у всех групп рыб был вполне закономерным, обусловлен операционной травмой, температурным колебаниям. Однако, при анализе СОЭ у оперированных рыб, инъецированных различными препаратами, обнаружено, что максимальные значения этого показателя зарегистрированы на пятнадцатые сутки у особей, которым внутривенно вводился иммуномодулятор, что соответствует наблюдаемой клинической картине воспалительных процессов в области шва. Максимум СОЭ у рыб с инъекцией антибиотика приходился на тридцатые сутки, что так же согласуется с результатами ихтиопатологического осмотра бестеров. При этом полученные данные по СОЭ достоверно различаются ( $p < 0,05$ ) во времени у всех трех групп рыб, подвергнутых лапаротомии. Между бестерами с инъекцией иммуномодулятора в дозах 1, - 2 у.е./кг и контрольным вариантом также имеются достоверные различия ( $p < 0,05$ ).

Уровень иммуноглобулинов (Ig) увеличивался в течение всего периода эксперимента, но у групп, инъецированных иммуномодулятором, в обеих дозах он был достоверно выше ( $p < 0,05$ ) относительно неоперированных рыб (см. табл. 1). Кроме того, у группы бестеров с дозой 2 у.е./кг зарегистрированы достоверные изменения в течение всего экспериментального периода.

В результате микроскопии мазков крови подопытных бестеров обнаружено, что в начале эксперимента лейкограммы рыб были в пределах физиологических норм и относительно идентичны (рис. 1).

Об относительной физиологической норме можно говорить на основании всех приведенных гематологических, физиолого-иммунологических данных и ихтиопатологического осмотра. На пятнадцатые сутки наблюдалось достоверное ( $p < 0,05$ ) перераспределение профиля в сторону нейтрофилии у всех групп оперированных особей, при этом основную долю нейтрофильных гранулоцитов составляли палочкоядерные формы. Также у групп 1 и 2 увеличилось содержание моноцитов в 2,1 и 1,7 раза. Доля эозинофилов, напротив, уменьшилась в 2 и 1,1 раза, относительно первоначальных показателей. Это вполне объяснимо функциональным предназначением иммунокомпетентных клеток в постоперационный период.

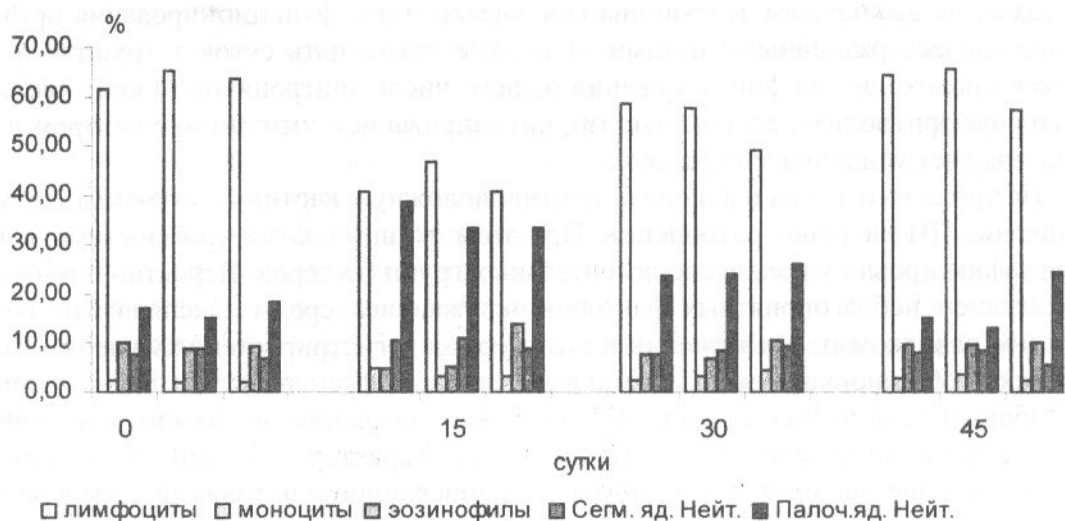


Рисунок 1. – Лейкограмма крови бестеров в условия эксперимента(%)

Примечание: 1- группа рыб (ИМ -1 у.е./кг), 2 – группа рыб (ИМ-2 у.е./кг), 3- группа рыб(окситетрациклин 0,1мл/кг).

У рыб, инъецированных окситетрациклином, наблюдали аналогичные изменения в крови. Однако, количество эозинофилов достоверно ( $p < 0,05$ ) превысило типичные показатели в 1,5 раза, что, по всей видимости, обусловлено некоторой интоксикацией организма, вызванной окситетрациклином. При сопоставлении данных лейкограмм с клинической картиной в операционной области, выявлено, что при не особо значимых различиях, они характеризуют неодинаковую клиническую картину - острое воспаление у рыб, инъецированных иммуномодулятором, и вялотекущую воспалительную реакцию у бестеров с инъекцией окситетрациклина.

На тридцатый день исследований в лейкоцитарной формуле обнаружены процессы восстановления лимфоцитарного профиля. Более активная пролиферация лимфоцитов у рыб из опытных вариантов, видимо, обусловлена активным влиянием ключевого компонента иммуномодулятора – провоспалительного цитокина (ИЛ-2), тогда как у оперированных контрольных особей этот процесс был менее выражен. К сорок пятым сутками наблюдался относительный баланс в белой крови у групп особей, инъецированных иммуномодулятором и окситетрациклином, но у последней все же зарегистрировано достоверное ( $p < 0,05$ ) более низкое содержание лимфоцитов и повышенное - палочкоядерных нейтрофильных гранулоцитов

Данные среднего цветного коэффициента (лизосомально-катионных белков) свидетельствуют (табл. 2), что в дооперационный период СЦК нейтрофилов у всех групп бестеров был в пределах нормы.

Таблица 2. Показатели лизосомально–катионного теста (ЛКТ) у бестеров в условиях эксперимента

вариант	показатель	сутки			
		0	15	30	45
ИМ 1 у.е./кг	ЛКТ (y.e)	1,19±0,09	0,60±0,07	0,64±0,14	0,54±0,05
ИМ 2 у.е./кг		1,31±0,07	0,58±0,06	0,50±0,05	0,70±0,06
окситетрациклин 0,1 мл/кг		1,24±0,12	0,44±0,05	0,49±0,08	0,51±0,06

В дальнейшем, у всех бестеров из групп, подвергнутых лапаротомии, наблюдалась супрессия функциональной активности палочкоядерных нейтрофилов, при этом СЦК ЛКБ достоверно снижался ( $p < 0,05$ ) и был оценен как неудовлетворительный.

На 15-30 сутки (табл.2) в крови бестеров наблюдалось увеличение числа незрелых форм гранулоцитов со сниженной способностью к фагоцитозу, т.е. было отмечено снижение числа клеток, содержащих большое количество катионных белков. Так, у групп рыб с дозой иммуномодулятора 1 и 2 у.е./кг при увеличении численности палочкоядерных нейтрофилов в 2,3 и 2,2 раза СЦК снизился в 1,9 и 2,3 раза. У бестеров, инъецированных антибиотиком, уровень ПЯН возрос в 1,8 раза, а средний цветной коэффициент ЛКБ уменьшился в 2,9 раза, это, вероятно, обусловлено не только оперативным вмешательством, как в первых двух случаях, но и дополнительным ингибированием окситетрациклином нейтропоза и его негативным воздействием на формирование зрелых гранулоцитов.

На сорок пятые сутки зарегистрировано некоторое увеличение среднего цветного коэффициента ЛКБ у группы особей, инъецированных иммуномодулятором в дозе 2 у.е./кг, до уровня  $0,7 \pm 0,05$ . Тогда как, у рыб из групп 1 и 3 этого не зафиксировано (табл. 2). Значения СЦК у бестеров второй группы свидетельствуют о более раннем восстановлении организма после оперативного вмешательства, в том числе фагоцитарной функции гранулоцитов, по сравнению с рыбами первой и третьей групп.

Таким образом, проведенные исследования показали целесообразность проведения предоперационной иммунокоррекции даже в монотерапии. Доказано преимущество иммуномодулятора перед антибиотиком (окситетрациклин) Кроме того, определена оптимальная доза иммуномодулятора - 2 у.е./кг массы тела, способствующая более ранним срокам репарационных процессов на раневых поверхностях и восстановлению фагоцитарной функции нейтрофильных гранулоцитов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Быховская-Павловская И.Е. Паразиты рыб. Руководство по изучению. Л.: Наука. 1985.
2. Васильков Г.В. Паразитарные болезни рыб и санитарная оценка рыбной продукции. //М.: - ВНИРО.- 1999.- С. 190.
3. Воловенко М.А. Определение уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови новорожденных телят // Ветеринария.- 1975.-№4. С.39-40.
4. Житинева А.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Основы ихтиогематологии (в сравнительном аспекте) // Ростов - на- Дону: Эверест, 2004.- 312 с.
5. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность.1983.
6. Катунин Д.Н., Егоров С.Н., Рылина О.Н., Попова О.В., Карыгина Н.В., Теркулова А.А., Чуйко Е.В., Кобзева Л.П., Попова Э.С. Эколого-токсикологическая характеристика Волго-Каспийского бассейна. // Рыбохозяйственные исследования на Каспии: Результаты НИР за 2003 г. –Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2004. – С.44 -56.
7. Киташова А.А., Кондратьева И.А., Наумова А.Ю. // Межведомственная ихтиологическая комиссия, РАСХН, Итоги научно-практических работ в ихтиопатологии (информационный бюллетень). — М., 1997. — С. 61-63.
8. Кленова И.Ф., Яременко Н.А. Ветеринарные препараты в России: Справочник –М.: Сельхозиздат, 2000. – 544 с.
9. Лиманский В.В., Яржомбек А.А., Бекина Е.Н., Андронников С. Б.// Инструкция по физиолого-биологическим анализам рыбы. – М.: 1984.- с.60.
10. Мирзоева Л.М. Применение пробиотиков в аквакультуре //Рыбное хозяйство, сер.: Болезни гидробионтов в аквакультуре.- М., 2001. - вып. 2. – С.23-30.
11. Пигаревский В.Е., Мазинг Ю.А. Лизосомально-катионные белки// Лаб. дело, 1981, №10, С.579-582.