

21. Вихман А. А. ...

22. Вихман А. А. ...

23. Вихман А. А. ...

24. Вихман А. А. ...

25. Вихман А. А. ...

26. Вихман А. А. ...

27. Вихман А. А. ...

28. Вихман А. А. ...

29. Вихман А. А. ...

**КОМИТЕТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО РЫБОЛОВСТВУ  
Всероссийский научно-исследовательский институт  
прудового рыбного хозяйства (ВНИИПРХ)**

На правах рукописи

**ВИХМАН АРНОЛЬД АНАТОЛЬЕВИЧ**

УДК 612.017.1:597-12:639.3./6

**ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС  
РЫБ — ОБЪЕКТОВ АКВАКУЛЬТУРЫ**

03.00.10. ИХТИОЛОГИЯ

**АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук**

Москва, 1994

КОМИТЕТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО РЫБОЛОВСТВУ  
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ПРУДОВОГО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА (ВНИИПРХ)

На правах рукописи

ВИХМАН АРНОЛЬД АНАТОЛЬЕВИЧ

УДК 612.017.1:597-12:639.3./6

ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС РЫБ - ОБЪЕКТОВ АКВАКУЛЬТУРЫ

03.00.10. Ихтиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук



*А. Вихман*

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'А. Вихман'.

Москва 1994



Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте прудового рыбного хозяйства

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
В. Г. Галактионов  
доктор ветеринарных наук, профессор  
В. И. Афанасьев  
доктор биологических наук, профессор  
А. А. Яржомбек

Ведущее учреждение - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я. Р. Коваленко

Защита состоится 27 декабря 1994 г. на заседании Специализированного совета Д 117.04.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте прудового рыбного хозяйства (ВНИИПРХ) по адресу: 141821, Московская обл., Дмитровский район, пос. Рыбное

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИИПРХ.

Автореферат разослан " " 1994 г.

Ученый секретарь  
Специализированного совета  
кандидат биологических наук

С. П. Тряпкина

Актуальность проблемы. Культивирование животных и функционирование природных популяций требует поддержания достаточно высокой резистентности к неблагоприятным промышленным и природно-климатическим факторам воздействия (Шिशков и др., 1986; Кунаков и др., 1990). При промышленном разведении животных контроль и регулирование резистентности приобрели значение одного из ведущих факторов получения товарной продукции (Коваленко, 1978; Болотников и др., 1987; Коромыслов, 1988; Филиппов, 1989). Устойчивость животных к действию биологических, химических и механических факторов обусловлена иммунной системой и связанных с ней других систем и была определена как "иммунофизиологическая реактивность" (Корнева, 1979).

Повышению эффективности иммунофизиологических исследований при промышленном разведении животных способствовала разработка системного анализа иммунного (специфического) ответа у высших позвоночных (Купер, 1980; Галактионов, 1982, 1986; Петров, 1987; Фанталин, 1988; Пестова, Четвертных, 1990; Даугалиева, Филиппов, 1991). Установлена неоднородность морфологических и функциональных элементов, реагирующих на антигены, различная роль этих элементов и последовательность их участия в образовании активных молекул и клеток. В значительно меньшей мере изучены с системных позиций другие виды иммунофизиологической реактивности, связанные с неспецифической инактивацией патогенов и защитными транспортными процессами.

Наряду с высшими позвоночными, получили развитие представления о системном принципе функционирования иммунной системы рыб (Good et al., 1968; Jørgensen, 1989). Однако, эти исследования были мало связаны с актуальными вопросами промышленного выращивания рыб. Развитие аквакультуры, интенсификация рыбоводства, освоение новых объектов разведения требовали совершенствования оценки физиологического статуса рыб (Яржомбек, 1981, 1988; Канидьева, 1984; Виноградов, 1985, 1991; Козлов, Абрамович, 1986; Гершанович и др., 1987; Душкина, 1988, 1991; Карпевич, 1988; Остроумова, 1988; Щербина и др., 1989; Чихачев, 1991). Это относилось и к иммунофизиологической реактивности, включая общую методологию исследования и отдельные методы выявления реагирования на технологические факторы в условиях современного производства (Мусселиус, 1976; Канаев, 1984; Микряков, 1986; Афанасьев и др., 1989; Лукьяненко, 1989). Во всестороннем изучении нуждался ос-



новой объект рыбоводства страны - карп. Развитие системного анализа иммунофизиологического статуса культивируемых рыб может способствовать, как и при разведении эндотермных животных, совершенствованию управления производства рыбы.

Цель и задачи работы. Целью исследования явилась разработка системного анализа иммунофизиологического статуса рыб - объектов аквакультуры и принципов его применения для контроля состояния рыб при оптимизации процессов выращивания.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

- обобщение современных сведений об организации иммунофизиологической реактивности рыб, свойствах отдельных функциональных элементов и их взаимосвязей;

- совершенствование количественного исследования гуморальных иммунофизиологических факторов и методов определения антибактериальных и антитоксических свойств органов и тканей;

- разработка комплекса показателей для оценки отдельных систем и иммунофизиологической реактивности организма в целом;

- изучение распределения естественных гуморальных факторов в органах карпа, толстолобика и веслоноса; сравнительная характеристика иммунофизиологической активности покровов, лимфоидных органов и крови;

- оценка влияния на иммунофизиологический статус рыб технологических стресс - факторов и нетрадиционных кормовых компонентов;

- выявление изменений специфической и неспецифической реактивности карпа при некоторых заболеваниях и селекции на повышение рыбоводных качеств;

- обоснование системных принципов оценки иммунофизиологического статуса рыб - объектов аквакультуры и их применения в условиях промышленного производства.

Научная новизна и теоретическая значимость. Впервые сформулировано и обосновано представление о системной природе иммунофизиологической реактивности организма рыб как части резистентности, ответственной за защиту от биологических, химических и механических патогенов. Иммунофизиологическая реактивность обусловлена комплексом функций, включая иммунный ответ, неспецифическую инактивацию патогенов, транспорт патогенов и защитных образований. Каждая функция имеет собственную системную организацию, связанную с разнородностью и взаимозависимостью ее элементов. Системы объединены способностью непосредственного взаимодействия с патогенами, но отличаются механизмами защиты, образованием иммунофизиологических факторов и внутрисистемной регуляцией.

Выдвинуто и развито положение о мембранной природе иммунофизиологической активности органов и тканей рыб, которые определены как "макромембраны". Макромембраны рыб являются образованиями, обладающими не только барьерной, но и продуцирующей способностью. Проницаемость макромебран отражает суммарное взаимодействие иммунофизиологических факторов и патогенов. Установлена зависимость проницаемости кожного покрова карпа от дозы, времени воздействия, вида воздействующего вещества и состояния покрова.

Разработан новый методологический подход для количественной оценки содержания иммунофизиологических факторов в органах и тканях. Установлено широкое распространение и неравномерное распределение естественных антител и лизоцима в покровных образованиях и внутренних органах рыб. Обнаружены видовые различия в уровне иммунофизиологических факторов при сравнении карпа, гибрида толстолобиков и веслоноса.

На единой методологической основе выявлен высокий уровень вариабельности иммунофизиологической реактивности при воздействии технологических и природных факторов. Выделено три уровня изменчивости иммунофизиологического статуса, включая непосредственное реагирование на возбудители заболеваний и стресс-агенты, сезонные и годовые отличия реактивности. Специфический и неспецифический ответы характеризовались достаточно высокой автономностью изменения отдельных систем и их иммунофизиологических факторов. Для оценки изменения связей системных показателей разработана модификация многомерного статистического анализа, позволяющего выявлять новые стороны реагирования.

Практическая ценность и реализация результатов работ. Разработаны основные принципы применения системной оценки иммунофизиологического статуса рыб - объектов аквакультуры. Сформулированы задачи иммунофизиологического исследования, определен комплекс одно- и многосистемных показателей и охарактеризовано их значение, даны рекомендации по выбору показателей.

Предложен метод количественного анализа иммунофизиологической активности органов и тканей рыб и подготовлены "Методические указания по количественному анализу гуморальных факторов резистентности в органах и тканях рыб" (утверждены Министерством рыбного хозяйства СССР 8.05.91.). В производственных и экспериментальных условиях показана пригодность тест-системы, включающей гетерогемагглютинины и лизоцим, для установления оценки иммунофизиологического статуса при воздействии природных факторов, рыбоводных стресс-агентов и воспалительных процессов.

Разработаны методы проведения реакций непрямой гемагглюти-



нации и диффузной преципитации для определения антител к эндотоксину патогенных аэромонад (учебно-методический материал "Методы иммунологического исследования рыб", ВДНХ, 1987). Показана применимость этих реакций для определения показателей реактивности рыб в условиях селекции на повышение устойчивости к заболеваниям и при контроле эпизоотической ситуации.

Подготовлена методика определения фактора, подавляющего активность фосфорорганических соединений, усовершенствован способ оценки общей проницаемости кожи рыб (авт. св. 263698 от 2. 11. 87.).

Разработана компьютерная программа многомерного статистического анализа, применяемого при оценке иммунофизиологического статуса карпа (лицензия N1368 от 25. 06. 89. на "ноу-хау" "Новый метод оценки иммунобиологического статуса рыб").

Учебные и методические материалы работы вошли в "Лабораторный справочник по болезням рыб" (1983), сборник методов ихтиотоксикологических исследований (1987) и "Справочник по физиологии рыб (1986), а также использованы на семинарах ихтиопатологов и других специалистов.

Апробация работы. Результаты исследований, содержащихся в диссертации обсуждались на семинарах и конференциях ВНИИПРХ, а также на научных собраниях в нашей стране и за рубежом: 6 (Ленинград, 1974) и 8 (Ленинград, 1979) Всесоюзных совещаниях по болезням и паразитам рыб, 3 (Рига, 1976) и 4 (Киев, 1981) съездах Всесоюзного гидробиологического общества, семинарах "О новых и передовых методах борьбы с болезнями рыб в рыбоводных хозяйствах Минрыбхоза СССР (Москва, 1977) и "Пути улучшения ветеринарно-санитарных мероприятий по профилактике и ликвидации болезней рыб" (Москва, 1978), Всесоюзном совещании "Совершенствование биотехнологии прудового рыбоводства" (Рыбное, 1981), 1 Всесоюзной школе-семинаре по экологической и эволюционной иммунологии (Борок, 1980), Международном семинаре "Fish, Pathogens and Environment in European Polyculture" (Сарваш, Венгрия, 1981), Всесоюзных конференциях по экологической физиологии и биохимии рыб: 5 (Киев, 1982), 6 (Паланга, 1985), 7 (Ярославль, 1989), 8 (Петрозаводск, 1992), 1 Всесоюзном совещании по зоокультуре (Москва, 1988), VII Всесоюзном симпозиуме по инфекционным болезням рыб (Москва, 1986), конференциях "Экологические механизмы преобразования популяций животных" (Свердловск, 1986), 1 Всесоюзном съезде иммунологов (Сочи, 1989), Международном симпозиуме по генетике карпа (Сарваш, Венгрия, 1990), совещании "Экологические аспекты и природоохранные мероприятия при использовании теплых вод (Светлодарское, 1991), 2 Всесоюзной конференции по рыбохозяйственной

токсикологии (С.-Петербург, 1991), 1 съезде иммунологов России (Новосибирск, 1992)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано свыше 60 работ, включая научные статьи, раздел в лабораторном практикуме по болезням рыб, учебные и методические материалы. Общий объем публикаций составил более 17 печатных листов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 269 стр. машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы (гл. 1), раздела "Материал и методы исследования" (гл. 2), основного содержания работы (гл. 3-7), заключения, выводов, практических рекомендаций и приложений 1-4. Список литературы включает 292 отечественных и 158 иностранных источников. В тексте имеются 46 таблиц и 30 рисунков.

#### ГЛАВА 1. ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКТИВНОСТЬ РЫБ, ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Приводятся данные литературы об организации иммунофизиологической реактивности рыб. Установлено, что не только иммунный ответ, но и неспецифическая инактивация патогенов имеют признаки системного проявления. Накапливаются сведения о системной организации защитных транспортных процессов, которые осуществляют доставку патогенов к активным органам и циркуляцию иммунофизиологических факторов. Проведенные исследования показали следующие системные признаки различных компонентов иммунофизиологической реактивности:

- инактивация патогенов связана с комплексным воздействием ассоциаций иммунофизиологических факторов в зависимости от вида патогена и уровня активности организма;

- защитные реакции осуществляются факторами различной природы и механизмов действия, включая молекулярные и клеточные факторы;

- в образовании иммунофизиологических факторов участвуют различные клеточные элементы, взаимосвязанные происхождением и функциональной активностью;

- формирование иммунофизиологических факторов и их взаимодействие с патогенами осуществляется в различных органах и тканях, обладающих как собственной активностью, так и зависимостью от других образований.

Имунофизиологические системы объединены в функциональный комплекс, деятельность которого направлена на предупреждение и



снижение поражений, вызываемых патогенами (рис. 1). Часть деятельности систем непосредственно не связана с воздействием на патогены и отражает общее состояние реактивности. Регуляция иммунофизиологической реактивности осуществляется как внутренними, так и внешними факторами, которые оказывают прямое и косвенное (через общие регуляторные системы) влияние (рис. 1).

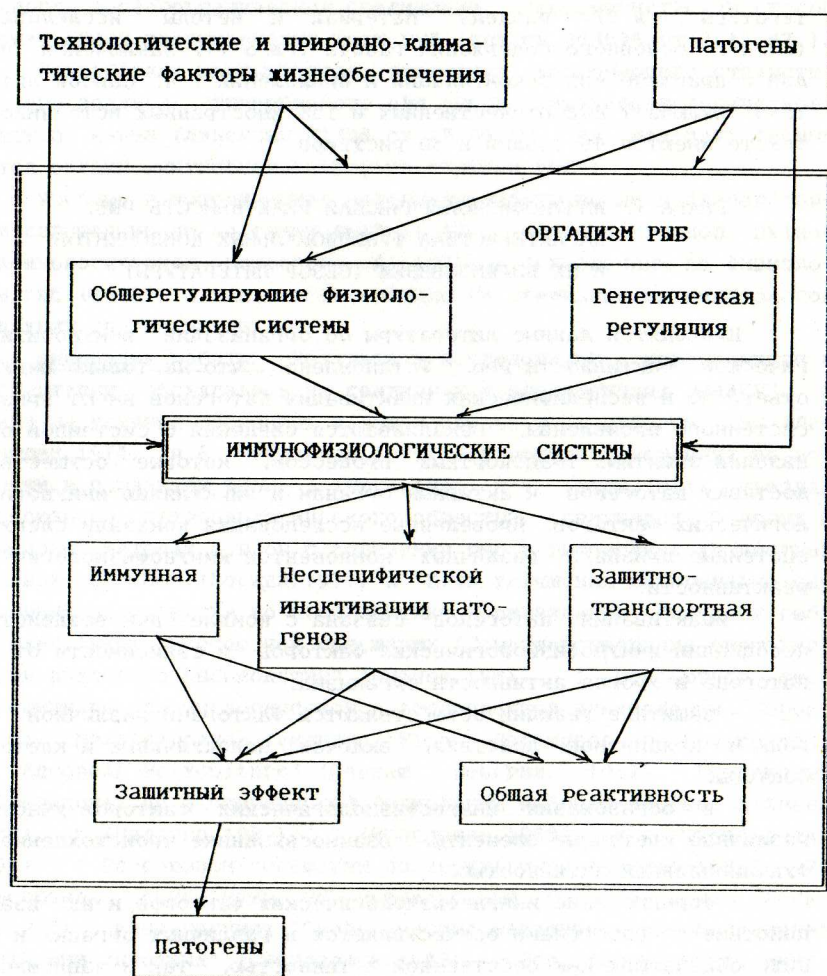


Рис. 1. Пути регуляции иммунофизиологической реактивности рыб.

Изучение регулирующей роли внешних воздействий на системном уровне касалось, в основном, климатических факторов и загрязнений и не включило оценку влияния технологических факторов на основные объекты промышленного выращивания.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основными объектами исследования явились внутривидовые группы карпа *Cyprinus carpio* L., различающиеся по типу чешуйного покрова и методам селекционирования. Общее количество исследованных рыб составило свыше 2000 экз. (табл. 1). Рыбу выращивали по технологии, описанной в "Сборнике нормативно-технологической документации по товарному рыбоводству" (1986).

Таблица 1.

Характеристика карпов, исследованных в экспериментальных и промышленных условиях.

Место и время исследования	Генетические группы	Возраст рыб	Количество, экз.	Средняя масса, г
Центральная экспериментальная база ВНИИПРХ, 1973-1980 гг.	Беспородный	0+	240	14
	"-"	1+	526	190
Загорская база, 1977 г.	Беспородный	0+	111	15
Литва ("Арвидай"), 1979 г.	Беспородный	1+	60	180
Шатурская база, 1987-1988 гг.	Беспородный	1+	130	286
Ангелинский СПУ*: 1979 г.	Краснухоус-	1+	20	225
1987-1989 гг.	тойчивый	1+	270	600
1988-1989 гг.	"-"	1+	180	80
Белоруссия ("Лахва") 1989-1991 гг.	Лаввинский	0+	120	94
	"-"	1+	116	620
Белоруссия ("Тремля") 1989-1991 гг.	Тремлянский	0+	90	28
	"-"	1+	87	332
Ангелинский СПУ 1993 г.	Краснухоус-			
	тойчивый	2+	59	320
1993 г.	"-"	3+	59	900
Садковое хозяйство 1993 г.	Беспородный	2+	18	2500
	"-"	1+	13	1700

Примечание: \* - селекционно-племенной участок Ангелинского рыбхоза Краснодарского края.



Кроме карпа, опыты были проведены с гибридом белого (*Hyporhamphichthys molitrix* Val.) и пестрого (*Aristichthys mobilis* Rich.) толстолобиков и веслоносом (*Polyodon spathula* (Walbaum)). Выращивание веслоноса осуществляли в соответствии с "Технологией разведения веслоноса" (1991).

Экспериментальные исследования выполнены на центральной экспериментальной и загорской базах ВНИИПРХ, Ангелинском опытном участке и рыбноводном заводе "Горячий ключ". Производственные наблюдения проводили в рыбноводных хозяйствах Краснодарского края (Ангелинский), Белоруссии ("Лаква", "Тремля") и Литвы ("Шальчинкай"). Условия выращивания рыб в различных климатических зонах и отдельных хозяйствах приведены в рыбноводных работах (Федорченко и др., 1981; Мельченков, 1991; Таразевич, 1993).

Основные направления и содержание проведенных экспериментальных работ представлены на рис. 2

Клиническое и патологоанатомическое исследование рыб, извлечение органов и тканей и подготовку материала для исследования выполняли по принятым в ихтиопатологии методам (Amlacher, 1972; Гончаров, 1973).

Фракционирование лимфоидных органов на клеточную и внеклеточную фракции осуществляли методом гомогенизации. Выделение свободных клеток и оценку их жизнеспособности проводили по N. Jerne и A. Nordin (1963).

В качестве иммунофизиологических показателей использовали следующие тесты:

- содержание специфических антител к эндотоксину и агглютиногену патогенных аэромонад;
- содержание естественных гетерогемагглютининов и лизоцима, а также образование лизоцима клетками почки;
- способность тканевых веществ воздействовать на фосфорорганические соединения;
- определение проницаемости кожи *in vitro* при воздействии фосфорорганических соединений.

Для определения противозеромонадных антител использовали клеточный антиген в виде формолвакцины и полисахаридный компонент эндотоксина, полученный по методу E. Neter (1956). Реакцию непрямого гемагглютинации проводили методом микротитрования. Реакцию диффузной преципитации в геле выполняли по O. Ouchterlony (1965) и G. Mancini (1964). Культуры аэромонад предоставлены нам к. в. н. К. А. Лобунцовым и к. б. н. Л. Н. Юхименко. Кроме того, от К. А. Лобунцова получены культуры псевдомонад и гипериммунные антиаэромонадные сыворотки.

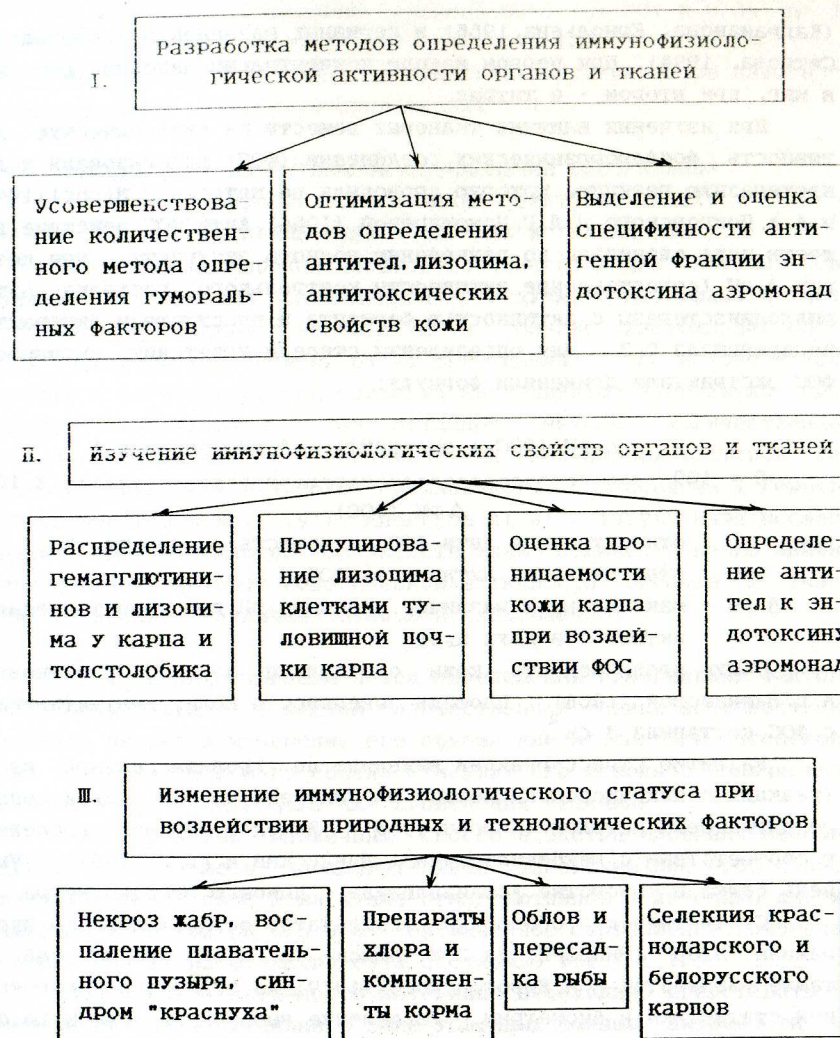


Рис. 2. Общая схема экспериментальных исследований

Гетерогемагглютинины определяли методом микротитрования, принимая за титр реакцию на ++. Антигенами служили эритроциты человека группы В(III) или беспородных кроликов, фиксированные формалином (Никитин, 1977). Инкубацию ингредиентов проводили при 18-20° С. Лизоцим определяли двумя методами: диффузно-гелевым



(Каграманова, Ермольева, 1966) и серийных разведений (Генералова, Ситнова, 1994). При первом методе концентрацию лизоцима выражали в мкг, при втором - в титрах.

При изучении влияния тканевых веществ на биологическую активность фосфорорганических соединений (ФОС) использовали холинэстеразную реакцию, которую проводили по методам Н. Michel (1949) и А. А. Покровского и Л. Г. Пономаревой (1964). Анти-ФОС действие веществ кожи оценивали по разведению водного экстракта, при котором  $\Delta$  рН (сопоставление активности контрольного раствора бутирилхолинэстеразы с активностью фермента в присутствии экстракта) не превышала 0,3. Для определения степени угнетения активности ФОС экстрактами применяли формулу:

$$D = 100 - \frac{\Delta \text{ рН (ФОС + экстракт)} - \Delta \text{ рН (экстракт)}}{\Delta \text{ рН (ФОС)}} \times 100$$

где: D - относительная анти-ФОС активность экстракта, %

100 - относительная активность ФОС, %

$\Delta$  рН - максимальное различие величины рН при сопоставлении активности двух проб.

Общую проницаемость кожи определяли по Н. С. Строганову и А. П. Лашмановой (1968). Площадь поверхности кожи, контактирующей с ФОС составила  $3 \text{ см}^2$ .

Развитие стресс-реакции выявляли по уровням сахара крови (реакция с пикриновой кислотой) и гликогена печени, определенно-го антроновым методом (Моргун, 1963). Индексы органов определяли в соответствии с рекомендациями (Лиманский и др., 1984). Уровень белка в сыворотке устанавливали с помощью рефрактометра.

Статистическая обработка результатов осуществлена по программам "STUD" (ВНИИПРХ) на ЭВМ "Минск-32" и IBM PC/AT 286, а также разработок Л. А. Животовского (1979) по применению многомерной статистики в биометрии. Разделение выборок на классы по отдельным признакам проводили методом хи-квадрат (Глотов и др., 1982). Достоверность различия выборок оценивали при 95% уровне значимости. В качестве критических значений статистических показателей приняты следующие величины:

1. Параметрические показатели

- t - критерий Стьюдента 2,10 (n = 21-28) и 2,00 (n = 30),

- коэффициент корреляции r 0,42 (n = 20) и 0,35 (n = 30),

2. Непараметрические показатели.

- критерий Крускала-Уоллиса 3,84 (n = 20-30),

- критерий Манна-Уитни 127-273 (n = 20),

- коэффициент корреляции Спирмена 0,45 (n = 20) и 0,36 (n = 30)  
- X- критерий - 4,89 (n=15) и 4,30 (n=12).

Методические особенности отдельных экспериментов даны в соответствующих разделах и приложениях 1-4.

### ГЛАВА 3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГУМОРАЛЬНЫХ ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ И ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ РЫБ

В серологии широкое распространение получили методы, связанные с серийным разведением исследуемого материала и учетом результатов реакции с помощью титра. Однако, расхождение способов обработки материалов, отсутствие данных о его исходном количестве и вариирование соотношения ингредиентов затрудняло сравнение результатов. Разработанные методы количественного определения антител и неспецифических гуморальных факторов достаточно трудоемки и требуют специального оборудования (Герберт, 1974; Арефьев и др., 1977; Anderson et al., 1979). Наши исследования были посвящены совершенствованию количественного анализа гуморальной иммунофизиологической активности органов и тканей рыб и касались различных этапов исследования.

#### 3.1. Количественный метод определения гуморальных факторов

Обязательным элементом количественной оценки активности материала является измерение его объема или массы. При исследовании материала большого объема измеряли его исходное количество и отбирали часть материала для проведения реакции.

При испытании различных способов экстрагирования наиболее пригодным оказалось предварительное замораживание проб и после размораживания проб извлечение гемагглютининов и лизоцима дистиллированной водой рН 5,5-6,0. Оптимальное соотношение гомогената органа или ткани и экстрагента составило 1:1 - 1:1,5.

Для расчета активности материала необходимо представить конечный результат реакции в виде условных единиц активности или определенного количества активного вещества. При использовании серийных разведений об активности материала судят по величине титра, который соответствует степени разведения материала, или обратного титра, т.е. целого числа. В качестве единицы активности испытуемого материала принята его способность вызывать отчетливую реакцию взаимодействия с соответствующим субстратом, которую считали равной 1 условной единице (усл.ед.). После установления титра материала для выражения его активности в условных единицах обратный титр умножали на 1 усл.ед. Следующим этапом



расчета явилось определение удельной активности, показывающей количество иммунофизиологического фактора в единице объема исследуемого материала, принятой за 1 мл. Удельная активность материала прямо пропорциональна обратному титру, выраженному в условных единицах, числу объемов реакционной смеси в 1 мл и обратно пропорциональна объему испытуемого материала в реакционной смеси:

$$C_{\text{уд.}} = \frac{1}{a \times K} ; \frac{\text{усл. ед.} \times \text{мл}}{\text{мл}} = \text{усл. ед. /мл}$$

где:  $C_{\text{уд.}}$  - удельная активность материала, усл. ед. /мл,  
 $t$  - величина обратного титра фактора, усл. ед.  
 $a$  - количество исследуемого материала в реакционной смеси, мл,  
 $V$  - общее количество реакционной смеси, мл,  
 $1$  - единица объема, мл,  
 $K$  - коэффициент уменьшения удельной активности.

Для упрощения расчетов ввели коэффициент уменьшения  $K$ .

В наших исследованиях для применения единой методики расчета коэффициент уменьшения был принят равным 400 при определении гемагглютининов и равным 25 при определении лизоцима.

Пример. При определении гемагглютининов в экстракте органа были получены следующие результаты: обратный титр - 16 (соответствует 16 усл. ед.), количество испытуемого материала - 0,025 мл, количество тест-субстрата (эритроцитов) - 0,025 мл, общий объем реакционной смеси - 0,05 мл, коэффициент уменьшения - 400.

Удельная активность экстракта равна:

$$C_{\text{уд.}} = \frac{1}{0,025 \times 400} = 32 \text{ усл. ед. /мл}$$

Если при титровании материал сравнивают с эталонным препаратом (калибровочный раствор определенной концентрации), то его удельную активность выражают не в условных единицах, а в соответствующих мерах активности: мкг/мл, мг/мл, ед./мл и т. д.

По величинам удельной активности и объема экстракта из исследуемого материала (орган или проба ткани, эмбрионы или личинки целиком), рассчитывали абсолютное содержание фактора в исходной пробе:

$$C_{\text{абс.}} = C_{\text{уд.}} \times V_{\text{экс.}}$$

где:  $C_{\text{абс.}}$  - абсолютное содержание фактора, усл. ед., мкг,  
 $C_{\text{уд.}}$  - удельная активность материала, усл. ед./мл, мкг/мл,  
 $V_{\text{экс.}}$  - объем полученного экстракта, мл.

Если исследовали часть органа (ткани), то полученную величину абсолютной активности умножали на число таких частей в органе.

По величинам абсолютной активности и общего объема исследуемого материала (пробы) до экстрагирования, находили относительное содержание фактора:

$$C_{\text{отн.}} = C_{\text{абс.}} : V_{\text{пробы}}$$

где:  $C_{\text{отн.}}$  - относительное содержание фактора, усл. ед./мл, мкг/мл,

$C_{\text{абс.}}$  - абсолютное содержание фактора, усл. ед., мкг,  
 $V_{\text{пробы}}$  - объем исследуемой пробы, мл.

Материалы, общий объем которых не известен (сгусток и сыворотка крови, слизь кожи и пищеварительного тракта), характеризуют только по относительному показателю. В лимфоидных органах и жабрах может быть определено как абсолютное, так и относительное содержание факторов.

Общая схема индивидуальной оценки гуморального звена иммунофизиологической реактивности и соответствующие показатели представлены на рис. 3.

### 3.2. Изучение распределения гемагглютининов и лизоцима.

Неравномерность распределения иммунофизиологических факторов в органах и тканях рыб установлена в отношении гидролитических ферментов и антител (Микряков, 1970; Лукьяненко, 1971, 1989; Fletcher, Write, 1973). Количественный метод открыл новые возможности для более точного изучения сравнительной активности органов и тканей. В наших исследованиях определяли два фактора, характеризующие состояние иммунной системы - гетерогемагглютинины и системы неспецифической инактивации патогенов - лизоцим.

Сопоставление активности лимфоидных органов и сыворотки у карпа показало, что наиболее высокое абсолютное содержание агглютининов и лизоцима имеется в туловишной почке, меньшее количество - в головной почке и самое низкое - в селезенке (табл. 2).



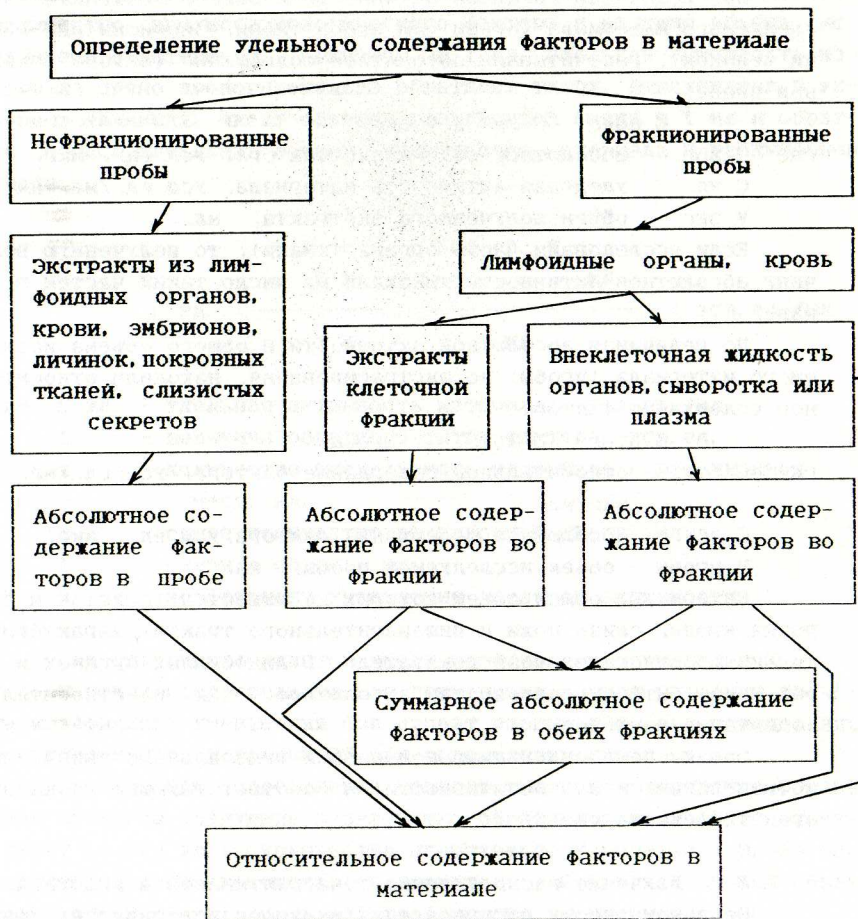


Рис. 3. Схема количественного определения гуморальных факторов в органах и тканях.

Уровни относительного содержания разных видов гемагглютининов значительно отличались: агглютинины к эритроцитам человека (АЭЧ) в максимальном количестве выявили в туловишной и головной почках, а агглютинины к эритроцитам кролика (АЭК) - в сыворотке крови. Самые низкие уровни АЭЧ и лизоцима найдены в сыворотке и АЭК - в селезенке. Изучение достоверности различия между содержанием разных видов гемагглютининов показало, что лишь в сыворотке крови достоверно преобладают АЭК ( $t$ -критерий = 4,50).

Таблица 2  
Содержание гемагглютининов и лизоцима в лимфоидных органах и сыворотке крови двухлетков чешуйчатого карпа ( $n = 20$ )

Вид гуморального фактора	Содержание гуморальных факторов ( $M \pm m$ , С. V. )			
	туловишная почка	селезенка	головная почка	сыворотка крови
Абсолютное содержание				
АЭЧ, *	24,60±3,78	2,28±0,48	6,90±1,50	-
усл. ед.	68,7	82,5	77,9	-
АЭК, **	33,90±3,18	3,90±0,84	9,66±1,92	-
усл. ед.	70,0	90,5	83,0	-
Лизоцим,	50,84±2,33	14,90±2,14	23,29±1,89	-
мкг	20,5	64,4	35,5	-
-----				
Относительное содержание				
АЭЧ,	29,16±4,62	5,88±0,96	26,76±3,96	0,78±0,36
усл. ед. /мл	71,2	68,6	63,2	206,0
АЭК,	23,82±3,42	10,26±2,28	30,36±9,04	93,60±20,40
усл. ед. /мл	65,9	91,2	70,7	94,7
АЭК/АЭЧ	0,97±0,13	2,46±0,83	1,19±0,15	27,20±10,0
	58,8	143,9	52,0	82,14
Лизоцим,	60,74±2,92	41,27±5,88	80,53±9,59	4,06±0,73
мкг/мл	21,5	63,7	53,2	81,0

Примечание: \*АЭЧ - агглютинины к эритроцитам человека,  
\*\*АЭК - агглютинины к эритроцитам кролика.

Коррелятивные связи содержания отдельных факторов в органах и сыворотке оказались слабыми ( $r = 0,02-0,41$ ). Исключение составила прямая зависимость уровня АЭК в туловишной почке и селезенке ( $r = 0,51$ ), а также уровня лизоцима в туловишной и головной почках ( $r = 0,58$ ).

При сравнении разных компонентов лимфоидных органов у двухлетков карпа более высокие уровни гемагглютининов отмечали в клеточной фракции почек и крови. Данные по суммарной активности фракций подтвердили, что по обоим видам гемагглютининов туловишная почка более активна, чем другие лимфоидные органы. Определенные лизоцима в различных фракциях органов у сеголетков (41 экз.)



выявило более высокие показатели в неклеточной фракции туловишной и головной почек ( $t$ -критерий = 2,69 -2,87). Фракции селезенки по абсолютному показателю не различались, а по относительному показателю уровень лизоцима в клеточном экстракте был значительно выше ( $t$ -критерий = 4,87).

Изучение фракций крови у двухлетков карпа показало, что содержание агглютининов к эритроцитам человека и лизоцима в сгустке превосходило уровни факторов в сыворотке (критерий Крускала-Воллиса = 16,2-24,6), но обе фракции содержали равное количество АЭК. Корреляция между активностью сыворотки и сгустка отсутствовала (коэффициент Спирмена = 0,12-0,26).

В жабрах двухлетков чешуйчатого карпа (17 экз.) относительное количество АЭЧ превышало их количество в сыворотке, но не отличалось от туловишной почки. Уровень АЭК превышал относительное содержание фактора в туловишной почке. Отмечено более низкое содержание лизоцима по сравнению с сывороткой. Корреляция между содержанием различных факторов в жабрах и между отдельными факторами в жабрах и туловишной почке отсутствовала.

Естественные гетероагглютинины и лизоцим найдены в экстрактах и слизи кожи и в слизи кишечника. У сеголетков карпа относительный уровень АЭЧ в коже составил  $2,9 \pm 0,4$  усл. ед./мл, а АЭК -  $4,6 \pm 0,4$  усл. ед./мл. В слизи кожи двухлетков уровень АЭК был ниже и содержание обоих видов агглютининов, в основном, было меньше по сравнению с другими образованиями. Корреляция между активностью слизи кожи и сыворотки оказалась слабой (коэффициент Спирмена = 0,30). Значительное количество фермента обнаружено в слизи кишечника, составившее  $74,0 \pm 11,0$  мкг/мл. Зависимость между содержанием лизоцима в кишечнике и других органах отсутствовала. Испытание лизоцимпродуцирующей способности 10 вирулентных и 10 слабовирулентных штаммов *Aeromonas hydrophila* и 7 штаммов псевдомонад дало отрицательный результат.

Определение естественных гетероагглютининов в лимфоидных органах и крови гибридов белого и пестрого толстолобиков (40 экз.) показало более высокое абсолютное содержание АЭЧ в туловишной почке по сравнению с селезенкой, и равномерное распределение АЭК. Относительное содержание АЭК было наименьшим в сыворотке. В селезенке выявлено превышение АЭК над АЭЧ, а в сыворотке и туловишной почке наблюдали обратное соотношение факторов. В головной почке уровни гемагглютининов совпадали. Корреляция уровня гемагглютининов в различных лимфоидных органах обнаружена только в отношении АЭЧ туловишной почки и селезенки.

В тотальных экстрактах кожи со слизистым слоем у толстоло-

биков агглютинины к эритроцитам человека и кролика составили соответственно  $0,5 \pm 0,2$  и  $3,4 \pm 0,6$  усл. ед./мл. По сравнению с жабрами у толстолобиков в коже содержалось меньше АЭЧ и больше АЭК ( $t$ -критерий = 3,53-5,14).

Оценка иммунофизиологического статуса сеголетков веслоноса (40 экз.) показала, что гемагглютинины наиболее часто и в большем количестве содержат жабры ( $0,7$ - $6,0$  усл. ед./мл) и сыворотка крови ( $0$ - $2,44$  усл. ед./мл) по сравнению с почкой и селезенкой. Наибольшее количество лизоцима, составившее  $20,8$ - $26,8$  усл. ед./мл, установлено в лимфоидных органах, менее активны были жабры и сыворотка крови.

Распределение гемагглютининов и лизоцима у карпа характеризовалось широким охватом органно-тканевых образований, включая лимфоидные органы, кровь, жабры и покровы, и различным содержанием факторов в органах и их фракциях. Установлена высокая активность туловишной почки по абсолютным показателям, различие образований по соотношению иммунофизиологических факторов и отсутствие стабильных корреляций между содержанием факторов в некоторых органах. Гибрид толстолобиков отличался от карпа более низким уровнем гемагглютининов и более равномерным их распределением в лимфоидных органах, а также преобладанием в сыворотке крови агглютининов к эритроцитам человека по сравнению с агглютининами к эритроцитам кролика. Низкая гемагглютинирующая активность отмечена в лимфоидных органах и жабрах веслоноса, но содержание лизоцима было значительным, соответствуя высокому уровню фактора у других представителей осетровых (Лукьяненко, 1989). Полученные результаты изучения сравнительной активности органов и крови у рыб - объектов рыбоводства позволяет отбирать материал с различным содержанием факторов для изучения как депрессивных, так и стимулирующих воздействий. Применение количественного анализа для оценки активности органов и тканей позволило расширить число показателей и способствовало повышению точности и чувствительности исследований.

#### ГЛАВА 4. ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ РЫБ

Имунофизиологическая активность органов и тканей позвоночных определяется как собственной продуцирующей способностью, так и гуморальными и клеточными факторами, поступившими по системам циркуляции (Фонталин, 1967; Купер, 1980; Сиротинин, 1981; Петров, 1987). Показана ведущая роль лимфоидной и лимфатической систем эндотермных позвоночных в иммуногенезе и инактивации возбу-



дителей заболеваний и токсинов. Лимфоидные и лимфатические образования, покровы, а также кровь обладали барьерными свойствами, способствуя очищению внутренней среды организма. Закономерности функционирования иммунофизиологических систем высших позвоночных создали предпосылки для изучения защитного реагирования рыб.

#### 4.1. Экспериментальное изучение иммунофизиологических свойств покровных образований и туловишной почки карпа.

В слизистых покровах рыб найдены естественные и приобретенные антитела, неспецифические гуморальные и клеточные защитные факторы (Лукьяненко, 1971; Nagrell et al., 1976; Лебедева, 1978; Вихман, 1978, 1979; Ourth, 1980; Лебедева, Головкина, 1987). Мало изучены защитные свойства покровов в отношении токсических веществ. В наших исследованиях оценивали антитоксическую функцию кожи по способности ее тканевых элементов подавлять активность фосфорорганических соединений (ФОС). Поскольку экстрагируемые компоненты кожи оказывали стабилизирующее влияние на pH реакционной смеси и препятствовали выявлению активности ФОС, то экстракты разводили в 4-8 раз для достижения  $\Delta$  pH 0,13-0,37. При испытании влияния 11 экстрактов из кожи двухлетков чешуйчатого карпа на этиловый, паранитрофениловый эфир этилфосфоновой кислоты (ЭПЭК) установлен широкий диапазон способности экстрактов подавлять активность ЭПЭК ( $D = 4-86\%$ ). Половина проб имела активность 50% и выше. Изменение температуры от 37° до 6°С не приводило к существенному изменению подавляющей способности экстрактов.

Защитные функции покровов связаны с комплексным действием иммунофизиологических факторов. Одним из методов оценки общей способности тканей взаимодействовать с ксенобиотиками является определение проницаемости покровов, в частности, изолированных препаратов кожи *in vitro* (Строганов, Лашманова, 1968). При воздействии 2,59-5,18 мг хлорофоса на кожу чешуйчатых двухлетков и трехлетков карпа за 6 часов экспозиции проходило лишь 0,4-0,9% вещества от воздействующей концентрации. Полученные данные представлены на рис. 4, А.

С уменьшением концентрации хлорофоса до 1,30-1,89 мг доля прошедшего через кожу вещества составила 0,1-0,5%, а при концентрации 0,18 мг и ниже препарат в фильтрате не обнаружили. Появление хлорофоса в фильтрате наблюдали через 1 час экспозиции и, как правило, через 3 часа отмечали нарастание проницаемости. Механическая обработка кожи (удаление слоя слизи и чешуи) приводила при концентрации хлорофоса 1,8 мг к увеличению проницаемости в 2,9-16 раз. Снижение количества воздействующего вещества

еще более усиливало степень его проникновения и превосходило контроль в 18,5-28,5 раз.

Установлена зависимость количества ФОС, прошедшего через кожу, от его воздействующей концентрации. При испытании различных концентраций ЭПЭК появление вещества в фильтрате наблюдали при нанесении на кожу 1,7 мкг. Это количество ЭПЭК было в 40 раз меньше пороговой концентрации хлорофоса. Относительное количество прошедшего через кожу ЭПЭК при максимальной концентрации 2,9 мкг составило 3,5% (Рис. 4, Б). При увеличении количества воздействующих веществ, которые были выше пороговых величин, наблюдали прямую зависимость проницаемости от концентрации ФОС (Рис. 4).

Как любые модели *in vitro*, опыты с изолированной кожей в большей мере выявляют закономерности взаимодействия ФОС с собственными структурами покровов и дополняют сведения о роли вида, концентрации и времени воздействия токсических веществ.

В организме рыб ведущее значение в иммунофизиологическом ответе имеют почки (Лукьяненко, 1971; Вихман, 1976; Микряков, Балабанова, 1979). Получены данные о содержании в почках лизоцима, но не выявлены активные продуцирующие структуры (Mudgey, Fletcher, 1976). Проведенные нами эксперименты с переживающей культурой свободных клеток туловишной почки карпа показали, что лизоцим постепенно накапливается в культуральной жидкости как при сохранении числа живых клеток, так и при значительной гибели клеток. Эти результаты свидетельствуют о связи накопления фактора с выделением лизоцима из жизнеспособных и разрушенных клеток.

#### 4.2. Основные иммунофизиологические свойства органов и тканей рыб.

Участие иммунофизиологических систем в очищении внутренней среды связано у костистых рыб с барьерной функцией лимфоидных органов и печени. Поступление из кровеносного русла чужеродных агентов сопровождается различными процессами, включающими распознавание чужеродности, трансформацию и депонирование агентов, а также продуцированием защитных факторов и их выделением в системы циркуляции (Jørgensen, 1989; Пестова, Четвертных, 1990; Микряков, 1991). Показано участие в поддержании химического гомеостаза различных выделительных органов (Лукьяненко, 1971; Наточин, 1984, 1987; Микряков, 1991).

О барьерных свойствах кровеносных сосудов рыб сведения незначительны. Установлена фагоцитарная способность эндотелия стенок сосудов и проницаемость эндотелиального слоя при развитии



воспаления (Заварзин, 1937, 1945; Chilmonczyk, Monge, 1980).

Различная динамика содержания активных молекул и клеток в крови и околососудистых тканях также свидетельствует об избирательной проницаемости сосудистых стенок.

Имунофизиологические свойства органов и тканей наиболее полно объяснимы закономерностями функционирования биомембран, с деятельностью которых связаны клеточные механизмы иммунологической функции позвоночных (Петров, Атауллаханов, 1991). Мембранную природу иммунофизиологической активности органов и тканей рыб подтверждают следующие данные:

- лимфоидные органы, покровы и кровеносная система содержат различные морфологические и функциональные элементы: клетки, участвующие во взаимодействии с поступающими агентами, вспомогательно-опорные образования и межклеточное вещество (Лукьяненко, 1971; Anderson, 1974; Вихман, 1976; Матей, Мальгина, 1979; Уголев, Кузьмина, 1992);

- органы и ткани осуществляют рецепцию поступающих агентов, их транспорт и выделение в системы циркуляции или из организма (Строганов, 1962; Лукьяненко, 1971; Antipa, Amend, 1977; Наточин, 1979; Микряков, 1991);

- проникшие в органы и ткани агенты подвергаются воздействию комплекса факторов, которые вызывают фиксацию агентов, их трансформацию и выделение дериватов (Hines, Spira, 1974; Harrell et al., 1976; Лукьяненко, 1989; Микряков, 1991);

- проницаемость слизистых, жабр и выводящих путей зависит от вида воздействующего агента, его концентрации и характера взаимодействия с гуморальными и клеточными иммунофизиологическими факторами (Строганов, Лашманова, 1968; Шеханова, 1983; Вихман, Анкудинова, 1986; Наточин, 1987; Kawahara, Kusuda, 1988);

- органы и ткани, продуцирующие иммунофизиологические факторы, изменяют свойства поступающей по системам циркуляции внутренней среды и обогащают кровь и лимфу новыми факторами (Van Muiswinkel, 1978; Вихман, 1978, 1979; Jørgensen, 1989).

В отличие от клеточных мембран тканевые образования, участвующие в иммунофизиологической реактивности, нами названы "макромембранами", учитывая их более сложную структуру и активные клеточные и внеклеточные процессы взаимодействия с патогенами и собственными элементами организма (рис. 5.)

В соответствии с различными морфологическими и функциональными свойствами тканей защитные макромембраны могут быть разделены на несколько типов в зависимости от характера взаимодействия с внешней и внутренней средами (рис. 6).

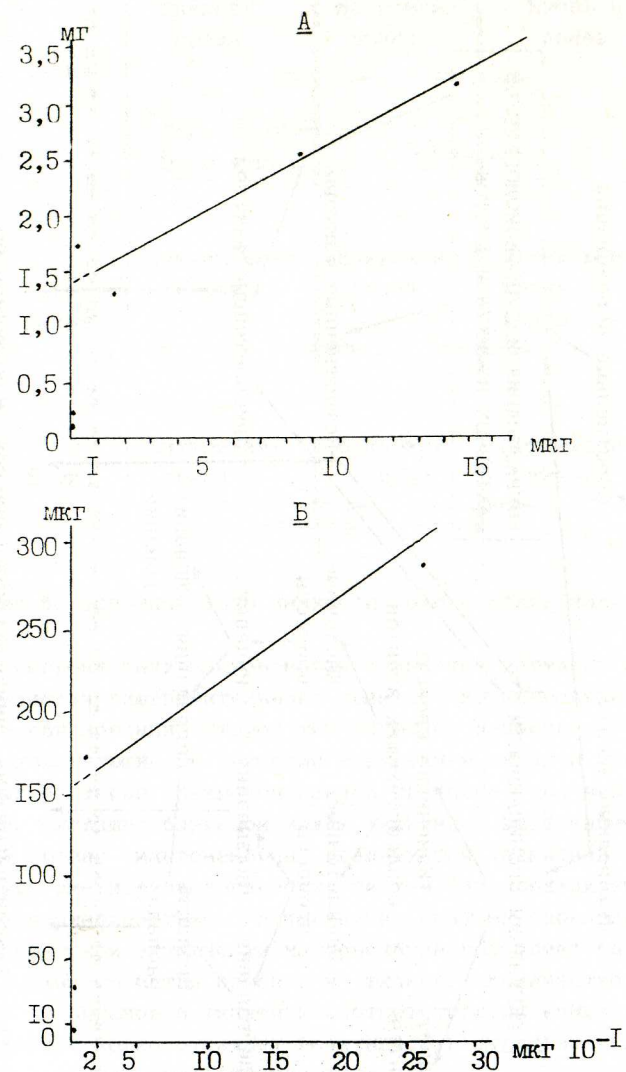


Рис. 4 . Зависимость проникновения хлорофоса ( А ) и ЭПЭК ( Б ) через кожу карпа от воздействующей концентрации.

по оси абсцисс - количество прошедшего через кожу вещества, по оси ординат - величина концентрации воздействующего вещества



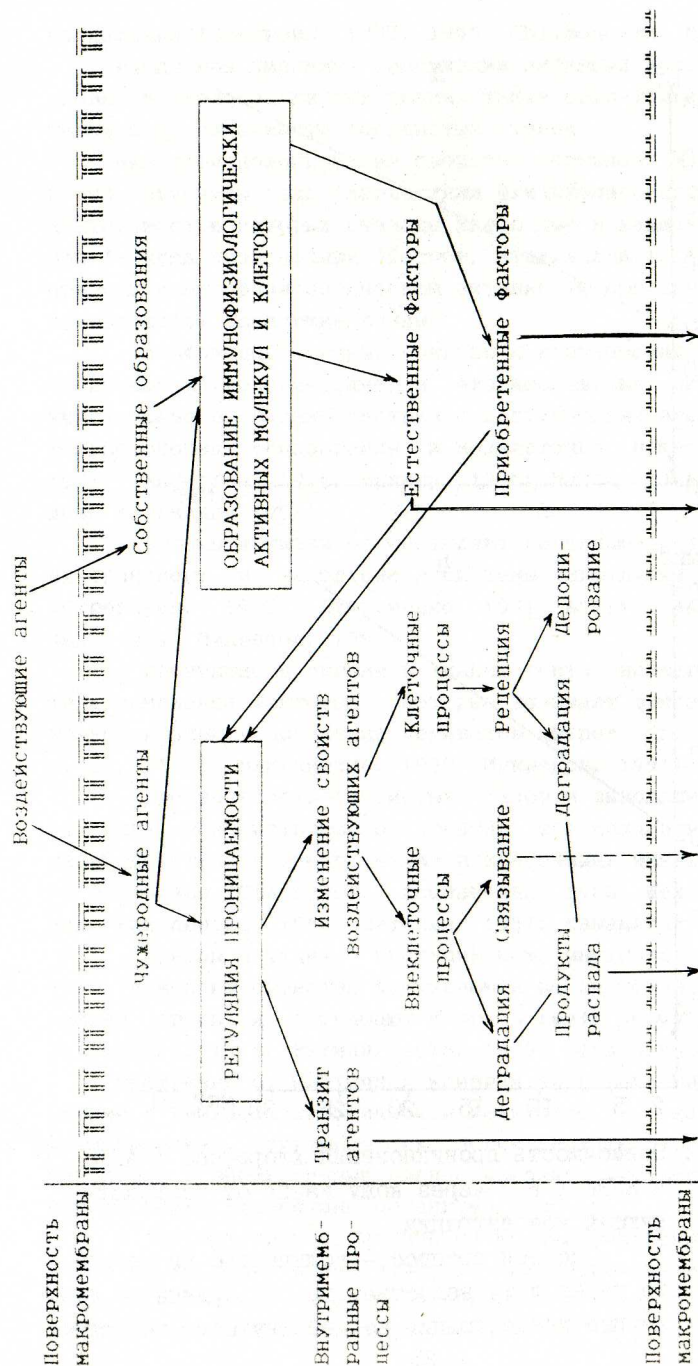


Рис. 5. Общая схема функционирования иммунофизиологической макроембраны.



Рис. 6. Основные типы иммунофизиологических макроембран.

К первому типу макроембран относятся наружные покровы, жабры, слизистая пищеварительного тракта, мочевыводящие и желчевыводящие образования. Второй тип включает лимфоидные органы и печень, участвующие в очищении внутренней среды и продуцировании защитных факторов. Макроембранами третьего типа являются стенки сосудов, служащие барьером между тканями и внутренней средой.

На уровне макроембран реализуется защитная способность различных иммунофизиологических систем, их продуцирующая способность и взаимодействие с патогенами. Поэтому определение иммунофизиологической активности макроембран позволяет оценить основные защитные свойства органов и тканей. Количественный анализ активности органов и тканей и соответствующий комплекс показателей наиболее полно отражает реактивность отдельных групп рыб и позволяет выявить их различия (Рис. 7).

Разработанный количественный подход для оценки иммунофизиологического статуса рыб и предложенный комплекс показателей дал возможность оценить на единой методической основе изменение иммунофизиологического статуса рыб в условиях промышленного выращивания.



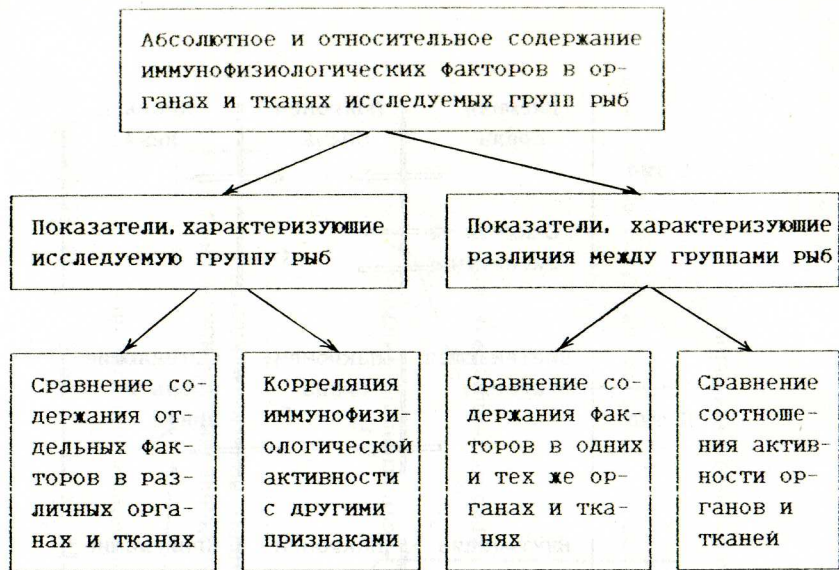


Рис. 7. Сравнительный иммунофизиологический анализ органов и тканей исследуемых групп рыб.

#### ГЛАВА 5. ОПЕРАТИВНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА РЫБ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ВЫРАЩИВАНИЯ

Исследование рыб непосредственно после воздействия факторов, способных нарушить физиологический статус, носит оперативный характер и направлено на выявление раннего реагирования рыб. Установлено изменение специфической и неспецифической реактивности рыб при воздействии возбудителей, токсикантов и стресс-факторов (Лебедева, 1978; Ellsaeser, Clem, 1986; Siwicki, Buczek, 1987; Исаева, Козиненко, 1992).

В наших исследованиях оценивали статус карпа и веслоноса в прудовых хозяйствах при воздействии некоторых факторов выращивания. Выявляли характер изменения иммунного ответа и неспецифической реактивности по уровню естественных гуморальных факторов. В связи с многообразием определяемых показателей и их взаимосвязей сравнивали различные методы статистического анализа результатов.

#### 5.1. Влияние химических факторов на уровень естественных гемагглютининов и лизоцима

Для оценки влияния лечебно-профилактической обработки хлорной известью рыбоводных водоемов у двухлетков карпа (по 20 экз. на каждом сроке исследования) определяли содержание гемагглютининов и развитие стресс-реакции. После хлорирования через 5-12 сут отмечали снижение гликогена в печени на 47% и уменьшение индексов селезенки и головной почки соответственно на 30 и 20%. Статистический анализ иммунофизиологических данных показал следующее:

- с помощью трехфакторного дисперсионного анализа установлено значимое влияние срока исследования и вида исследуемого органа, отсутствие влияния вида гемагглютинина при определении их абсолютного содержания; отмечено изменение уровня реактивности на 5 сутки после начала хлорирования, которое сохранялось до 20 суток; наиболее выраженные изменения наблюдали в туловишной почке и сыворотке по сравнению с головной почкой и селезенкой;

- при изучении реагирования рыб по комплексу показателей с помощью предложенного нами варианта многомерного анализа (Вихман, Боршев, 1989) выявлено изменение содержания факторов в туловишной и головной почках и сыворотке на 5-12 сут после хлорирования (рис. 8); в ходе ответа наблюдали различное соотношение активности селезенки и головной почки, селезенки и сыворотки: наиболее глубокие различия отмечали в контрольной группе между содержанием факторов в почках и сыворотке; после хлорирования различие между туловишной и головной почками увеличилось, а между головной почкой и сывороткой уменьшилось;

- при анализе изменения активности с помощью t-критерия отметили снижение с 5 сут после хлорирования абсолютного и относительного содержания факторов в туловишной и головной почках, уменьшение агглютининов к эритроцитам кролика в сыворотке и отсутствие значимых изменений в селезенке; на 12 сут повысились агглютинины к эритроцитам кролика в туловишной почке и агглютинины к эритроцитам человека в сыворотке, а на 20 сут увеличились агглютинины к эритроцитам человека в туловишной почке (рис. 9);

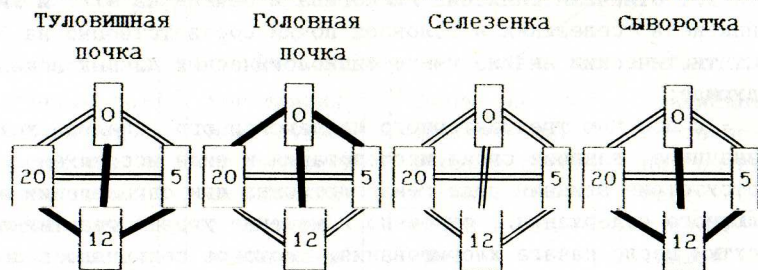
- статистические данные, полученные с помощью t-критерия совпадали в целом с результатами непараметрического анализа по критерию Манна-Уитни;

- изучение соотношения активности разных образований на каждом сроке исследования по методам одномерной статистики выявило существенное отличие активности в зависимости от вида фактора: в начале опыта агглютинины к эритроцитам человека преобладали в



туловишной почке при их наименьшем содержании в сыворотке крови, на 12 сутки опыта активность лимфоидных органов и сыворотки стала одинаковой; наивысший относительный уровень агглютининов к эритроцитам кролика на всех сроках обнаружен в сыворотке, с 5 сут опыта отмечено преобладание активности туловишной почки по сравнению с головной.

А. Изменение активности лимфоидных органов и сыворотки крови



Б. Соотношение активности на разных сроках исследования

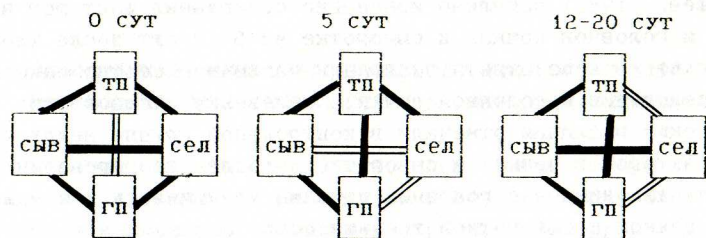


Рис. 8. Многомерный анализ изменения относительного количества гемагглютининов у карпа после хлорирования пруда.

0, 5 ... - даты исследования, сут; достоверность различия признаков: имеется —, отсутствует —; тп - туловишная почка, гп - головная почка, свв - сыворотка крови, сел - селезенка.

Хлорирование пруда оказывало выраженное иммунодепрессивное действие преимущественно на 5-12 сутки после первого внесения хлорной извести. В последующем наблюдали частичное восстановление реактивности.

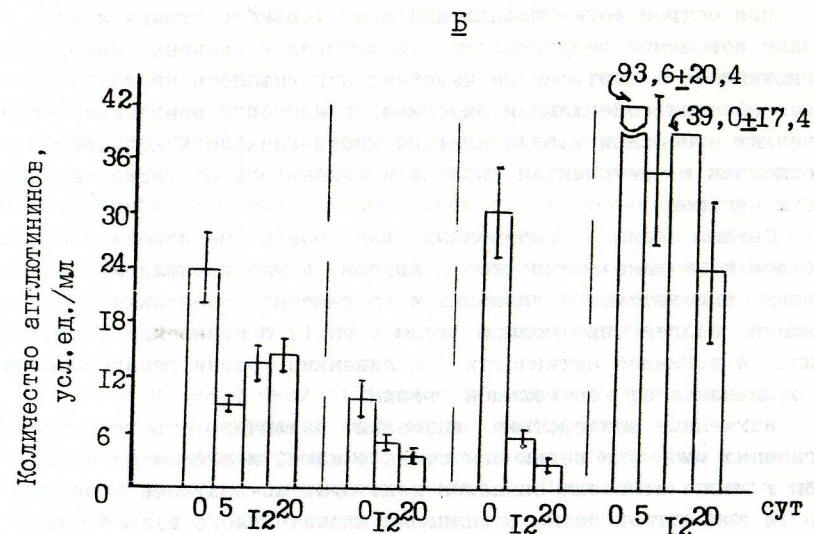


Рис. 9. Относительное содержание агглютининов к эритроцитам человека (А) или кролика (Б) у карпа после хлорирования пруда



## 5.2. Изменение реактивности при воздействии облова и пересадки рыбы

Развитие стресс-реакции происходило при облове и выдерживании в бассейне двухлетков карпа, у которых установлено временное снижение гликогена в печени на 60% и содержания гетероагглютининов по сравнению с исходным уровнем. На 9 сут повысились агглютинины к эритроцитам кролика. Воздействие на рыб нового стресс-фактора вызвало повышение в крови уровня сахара и содержания агглютининов к эритроцитам человека. Заражение икhtiофтириусами рыб с повторным стрессом приводило к повышению в 3 раза интенсивности инвазии икhtiофтириусами по сравнению с группой рыб с однократным стрессом.

Воздействие на сеголетков карпа облова и пересадки в бассейны вызвало снижение гликогена в печени и индексов лимфоидных органов. Содержание гуморальных факторов изменялось незначительно. Отмечено снижение лизоцима в сыворотке через 1-2 сут и увеличение уровня агглютининов к эритроцитам кролика в туловишной почке.

## 5.3. Изменение естественных гуморальных факторов при некоторых заболеваниях прудовых рыб

При острой форме воспаления плавательного пузыря и жабр отмечали повышение реактивности: увеличивался уровень сывороточных агглютининов к эритроцитам человека и повышалось число особей с более высоким содержанием лизоцима. У карпов с признаками некротических изменений жабр в клетках крови снижалось количество агглютининов к эритроцитам кролика и изменялось соотношение активности органов.

Оценка влияния рыбоводных факторов на веслоноса показало, что при пересадке двухлетков в другой пруд наблюдали снижение уровня сывороточного лизоцима и увеличение содержания гемагглютининов. Воздействие водной среды с pH 12,0 приводило к стабилизации лизоцимной активности, а динамика уровня гемагглютининов не отличалась от контрольной группы.

Изученные воздействия вызвали различную ответную реакцию организма рыб. При первичном стрессе карпа и веслоноса и некрозе жабр у карпа отмечали снижение некоторых показателей реактивности, а при острой форме воспаления плавательного пузыря карпа - повышение содержания факторов. Вторичный стресс не сопровождался выраженными изменениями статуса, но вызывал снижение противопаразитарной резистентности. Следует отметить различное реагирование на стресс сеголетков и двухлетков карпа, которое проявлялось

в более стабильном статусе младшей возрастной группы. Различная направленность изменения статуса связана, возможно, с преобладанием различных механизмов регуляции иммунофизиологической реактивности. Ведущую роль при стрессе играют гормональные регуляторы, а при заболеваниях происходит более широкая перестройка деятельности разных систем при воздействии патогена и патологически измененных тканей. Многообразие изменений иммунофизиологической реактивности требует применения комплекса показателей, отражающих деятельность различных иммунофизиологических систем и разностороннего статистического анализа. Для рыбоводной практики важное значение имеет обнаружение подавления иммунофизиологической реактивности в течение 2-3 недель после хлорирования пруда. Снижение уровня лизоцима после облова также указывает на изменение содержания факторов резистентности. Выявленные признаки иммунодепрессии требуют усиления наблюдения за клиническим состоянием рыбы и устранения неблагоприятных факторов выращивания.

## ГЛАВА 6. ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ НОВЫХ КОРМОВЫХ СРЕДСТВ И ПРИ ПРОМЫШЛЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ КАРПА

При использовании новых приемов и методов в рыбоводстве требуется оценка физиологического состояния рыб, которая включает выявление уровня резистентности и общей активности иммунофизиологических систем. Большое значение в современном рыбоводстве имеют разработка новых кормовых средств и селекционная работа (Остроумова и др., 1973; Минц, Христенко, 1980; Кирпичников, 1987). В наших исследованиях проведена оценка иммунофизиологического статуса карпа при использовании нетрадиционных кормовых компонентов и селекции на повышение устойчивости к заболеваниям.

### 6.1. Изменение иммунофизиологической реактивности карпа при введении в корм новых компонентов

Состояние двухлетков было оценено при добавлении в корм 7% белково-витаминного концентрата (БВК). Проведение двух серий опытов показало, что опытные и контрольные группы рыб (n=15 в каждой группе) не различались по уровню в сыворотке крови гемагглютининов, лизоцима и белка (t-критерий = 0,7-1,5).

Влияние на рыб кормового компонента, приготовленного из торфа (ТКК), оценивали в производственных условиях. Определяли уровень естественных гемагглютининов в сыворотке и клетках кро-



ви. В первой серии опытов (n= 30 в каждой группе) установлено, что у опытных рыб, получавших корм с добавлением 25% и 50% ТКК, отмечали снижение уровня гемагглютининов как в сыворотке, так и в гемоцитах. Различие между опытными группами было несущественным. Во второй серии опытов при введении в корм 25% ТКК не отмечено отличие по уровню гуморальных факторов опытной группы от контрольной. Отсутствие существенных изменений иммунофизиологического статуса и физиолого-биохимических показателей свидетельствовало о возможности применения в производстве изученных кормовых средств (Минц, Христенко, 1981; Сиверцев, Марченко, 1982).

#### 6. 2. Изучение иммунного ответа карпа при селекции на устойчивость к инфекционным заболеваниям

Промышленная селекция рыб на повышение резистентности включает создание генетических групп, устойчивых к заболеваниям инфекционной природы. Среди них важное значение имеет группа заболеваний, объединенных клиническим синдромом "краснуха", которая состоит из аэромоноза, псевдомоноза и весенней вирусной виремии.

Целью наших исследований явилась оценка иммунного ответа на различные антигены патогенных аэромонад у карпа, селекционированного на устойчивость к краснухе (Кирпичников, 1986; Илясов, 1989). Сравнительное изучение специфичности эндотоксинов различных серологических групп аэромонад показало, что сыворотка к аэромонадам первого типа не реагирует в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с антигеном второго типа, а сыворотка второго типа содержит небольшое количество антител к антигену первого серологического типа. Максимально определяемая концентрация антигена в реакции торможения непрямой гемагглютинации составила для аэромонад первого типа 50 мкг/мл и для второго - 1 мкг/мл.

Получение растворимых антигенов позволило определить антитела в реакции диффузной преципитации в геле (РДП). С помощью РДП по О. Оухтерлони при взаимодействии неразведенной иммунсыворотки к аэромонадам первого типа и соответствующего антигена выявлена одна полоса преципитации. При взаимодействии антигенов аэромонад второго типа и соответствующих антител наблюдали образование четырех полос преципитации. Перекрестный анализ первой и второй систем показал наличие в иммунсыворотке второго типа небольшого количества антител к антигену штамма первого типа и отсутствие реагирования сыворотки первого типа с антигеном штамма второго типа. При межвидовом анализе *A. sobria* и *A. salmonicida* установлено различие эндотоксических антигенов и возможность дифференцировки антигенов гипериммунными видовыми сыворотками.

Использование антигена эндотоксина аэромонад позволило расширить иммунологические исследования при селекции краснодарского краснухостойчивого карпа. Объектом исследования явились отводки украинско-ропшинская (УР), ропшинская (Р) и местная (М). Исследование селекционированных рыб показало, что сыворотки трехлетков и четырехлетков всех отводок содержат антитела как к клеточному антигену (5,05-9,20 усл. ед./мл), так и к эндотоксину *Aeromonas sobria* (0,28-8,80 усл. ед./мл). Отмечено совпадение уровня антител у здоровых рыб и у особей с симптомами краснухи. Достоверное превышение уровня бактериоагглютининов выявлено у трехлетков отводки Р по сравнению с четырехлетками. У здоровых и больных четырехлетков отводки М содержание бактериоагглютининов было выше, чем у соответствующих групп отводки Р.

У переболевших гибридов, полученных при скрещивании различных отводок, содержание антител к эндотоксину *Aeromonas sobria* в сыворотках составило 5,4-43,2 усл. ед./мл. У рыб в первой зоне рыбоводства аналогичные антитела обнаружены в количестве 0-2,7 усл. ед./мл. Статистические расчеты подтвердили достоверность различия показателей между селекционированными и неселекционированными карпами. Отмечено несовпадение обнаружения антител при применении различных серологических реакций.

Оценка взаимосвязи уровня антител к различным антигенам аэромонад, клинического состояния рыб и их генетической принадлежности свидетельствовала о сложной ответной реакции селекционированных рыб, которая была связана, вероятно, как с уровнем резистентности рыб, так и с возрастными изменениями реактивности. Отсутствие корреляции между содержанием антител к различным антигенам патогенных аэромонад было подтверждено при исследовании карпа в тепловодном садковом хозяйстве, неблагополучном по аэромонозу. Обнаружение отдельных особей с высоким уровнем антител может быть использовано для формирования группы рыб с повышенной реактивностью в качестве селекционного материала.

#### 6. 3. Иммунофизиологическая активность различных генетических групп карпа

Помимо ответа на антигены аэромонад, оценка иммунофизиологического статуса селекционируемых рыб может быть расширена за счет использования показателей общей активности иммунной системы и состояния неспецифической инактивации патогенов. С этой целью проведено определение естественных гуморальных факторов в сыворотке различных породных групп карпа.

Результаты определения динамики гемагглютининов у отводок



краснодарского краснухостойчивого карпа на Ангелинском опытном участке в течение сезонов 1987-1989 гг. были следующими:

- по данным многофакторного дисперсионного анализа установлено значимое влияние срока исследования и вида определяемого гемагглютинаина при меньшем влиянии вида отводки;

- многомерный анализ по предложенной нами методике (Вихман, Боршев, 1989) выявил отсутствие различия между отводками в осенний период у генераций 1986 г. и существенные отличия у генераций 1987 г. (рис. 10); установлено достоверное отличие уровня факторов при сопоставлении разных генераций отводок; наиболее глубокие различия отмечали при сравнении генераций отводок Р и М;

- изменение соотношения активности отводок оценивали также по средним величинам с помощью t-критерия; по уровню агглютининов к эритроцитам кролика осенью 1988 г. наблюдали равную активность отводок УР и П и более высокое содержание фактора у отводки Р; весной следующего года наибольший уровень гемагглютининов выявили у отводки УР, а в летний период - у отводок УР и М.

Совпадаемость результатов определения достоверности различия групп по t-критерию и непараметрическому критерию Манна-Уитни составила 73-83% при объеме выборок 29-39 особей.



Рис. 10. Многомерный анализ различия уровня гемагглютининов у двухлетков в осенний период 1987-1988 гг. (достоверность различия: имеется —, отсутствует —)

На одном из сроков исследования определили уровень лизоцима в сыворотке крови, который оказался одинаковым у отводок УР и М

и был более высоким у отводки М (критерий Манна-Уитни = 3,45). Соотношение активности отводок по лизоциму совпадало с содержанием у них гемагглютининов.

Исследования показали большую изменчивость уровня иммунофизиологических факторов при сравнении разных отводок одной генерации и разных генераций одной отводки. Не выявлено преимущественной активности какой-либо генетической группы при выращивании рыб в одинаковых условиях.

Оценку иммунофизиологического статуса провели также у двух селекционированных групп белорусского карпа: лахвинского и тремлянского. Содержание гетерогемагглютининов и лизоцима у сеголетков обеих генетических групп превышало их количество по сравнению с двухлетками. Совпадала активность чешуйчатых двухлетков генерации 1989 и 1990 гг. Двухлетки тремлянского и лахвинского карпов оказались идентичными по содержанию лизоцима. Наиболее высокий уровень агглютининов к эритроцитам кролика отмечен среди всех исследованных групп в 1991 г. у сеголетков тремлянского карпа. Статистический анализ изменчивости иммунофизиологического статуса у различных генетических групп карпа показал отсутствие достоверности влияния фактора группы. Изменчивость естественной реактивности у различных групп рыб определяется комплексом факторов выращивания, которые требуют дальнейшего изучения.

Совокупность всех изменений реактивности при выращивании рыб в прудах свидетельствует о наличии разных уровней изменчивости иммунофизиологического статуса. Первый уровень связан с экстренным ответом организма на резкие изменения условий выращивания, включая заболевания и технологические воздействия (табл. 3.). Второй уровень изменчивости определяется сезонными различиями статуса в течение одного вегетационного периода и зависит в большей мере от природных факторов. Третий уровень отражает изменение реактивности в разные годы, которое определяется путем сопоставления статуса одной генетической группы рыб в соответствующие сезоны года. Периодическое изучение изменчивости иммунофизиологического статуса в течение вегетационного периода (иммунофизиологический мониторинг) позволяет выявить фон реактивности, при котором развивается непосредственный ответ на воздействие технологических факторов.



Таблица 3.

Уровни изменчивости иммунофизиологической реактивности  
культивируемых рыб и подбор групп сравнения

Наименование уровня	Характер сопоставляемых групп рыб
Первый уровень (непосредственный ответ на воздейст- вие)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- сравнение активности одинаковых по происхождению и возрасту групп, выращиваемых в различных условиях;</li> <li>- сравнение активности одинаковых по условиям выращивания и возрасту групп, имеющих различное происхождение;</li> <li>- сравнение активности разных возрастных групп одного поколения, имеющих одинаковое происхождение и условия выращивания;</li> <li>- сопоставление направленности изменении реактивности различных групп.</li> </ul>
Второй уровень (сезонная измен- чивость)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- сопоставление активности отдельных групп в различные сезоны года;</li> <li>- сравнение направленности изменения статуса различных групп в течение одного года</li> </ul>
Третий уровень (изменчивость по годам)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- сравнение активности разных возрастов одной группы в разные годы;</li> <li>- сопоставление активности одинаковых по возрасту групп разных генераций в соответствующие сезоны разных лет;</li> <li>- сопоставление направленности изменений реактивности групп в разные годы</li> </ul>

#### ГЛАВА 7. СИСТЕМНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА РЫБ - ОБЪЕКТОВ АКВАКУЛЬТУРЫ

В современной иммунологии позвоночных системный принцип реагирования на антигены является методологической основой оценки иммунного статуса животных и человека ( Воробьев и др., 1985; Галактионов, 1986; Даугалиева, 1989; Петров и др., 1992). Поскольку иммунофизиологическая реактивность обусловлена деятельностью комплекса систем, то системный анализ следует принять в качестве главного методического принципа оценки иммунофизиологи-

ческого статуса рыб. Системный анализ влияет на проведение всех этапов исследования, включая направление и задачи исследования, выбор показателей и методов их определения, анализ результатов.

##### 7.1. Методологические принципы оценки иммунофизиологического статуса культивируемых рыб

При оценке иммунофизиологического статуса необходимо учитывать особенности морфологических и физиологических свойств культивируемых видов, а также характер воздействующих на реактивность факторов в условиях производства, связанных с типом хозяйства, зоной рыбоводства и технологией выращивания (Грищенко, 1985; Рудиков, 1985; Головин, 1987; Марченко, 1987; Мусселиус, Стрелков, 1987; Шелкунов, 1987; Юхименко, 1987; Ванятинский и др., 1989). Традиционные и акклиматизируемые объекты выращивания (осетровые, карповые и др.) принадлежат к различным таксономическим и экологическим группам, которые отличаются по гемопоэзу, иммуногенезу и структуре лимфоидной системы и покровов (Фон-Талин, 1988; Лукьяненко, 1989; Головина, Тромбицкий, 1989).

Оценка иммунофизиологического статуса для контроля и управления производством рыбы связана с решением различных рыбоводных задач (табл. 4.)

Проведенные нами исследования и данные литературы показали, что изменения иммунофизиологических систем и их элементов могут носить как общий, так и различный характер. Возможность неоднозначного реагирования рыб на технологические воздействия требует соблюдения ряда методологических принципов оценки иммунофизиологического статуса:

1. Ответная реакция организма определяется характером воздействующего агента. Технологические и природные факторы могут вызывать как одинаковые, так и отличающиеся изменения статуса. Первоначальная оценка действия рыбоводных факторов должна проводиться с помощью широкого круга показателей, способных выявить различные изменения реактивности.

2. Реагирование разных иммунофизиологических систем может иметь автономный характер и не совпадать по степени и направленности. Поэтому необходимо использовать комплекс показателей, отражающий состояние различных систем.

3. Различные свойства отдельных иммунофизиологических систем изменяются неоднозначно в зависимости от характера воздействия и общего состояния системы. Помимо конечных продуктов, взаимодействующих с патогенами, могут быть определены показатели, отражающие все стадии деятельности систем.



4. Изменение иммунофизиологической активности различных органов и тканей отличаются по выраженности, динамике и направленности, а также по характеру взаимосвязи показателей. Определение активности органов и тканей повышает чувствительность и информативность исследования.

Таблица 4

Применение иммунофизиологических исследований в рыбоводстве

Виды контроля состояния рыб	Задачи иммунофизиологических исследований
Оперативный икhtiопатологический контроль	- этиологическая диагностика заболеваний; - физиологическая диагностика при воздействии потенциально опасных факторов и патогенов; - контроль иммунопрофилактики.
Технологический мониторинг	- выявление адаптационной способности рыб при акклиматизации и изменении технологии, прогноз устойчивости к действию патогенов; - анализ межэпизоотических периодов; - биотестирование водной среды и кормов.
Контроль селекционно-генетических работ	- оценка селекции на повышение иммунофизиологической защиты; - сравнительная характеристика реагирования генетических групп при иммуностимуляции; - определение генетического родства селекционируемых групп по антигенному сходству.

7.2. Применение системного анализа для оценки статуса рыб в условиях промышленного производства.

Оценка иммунофизиологического статуса осуществляется с помощью комплекса показателей, отражающих активность как различных систем, так и иммунофизиологической реактивности в целом.

Изучение специфического ответа на антигены возбудителей позволяет проводить все виды иммунологических исследований, в которых действующий агент обладает антигенными свойствами (возбудители заболеваний и их компоненты, химические загрязнители среды обитания, лечебно-профилактические средства). Моделирова-

ние иммунного ответа и естественные иммунные процессы показывают активность данной системы и косвенно свидетельствуют о состоянии других физиологических систем организма.

Основные направления использования показателей неспецифической инактивации патогенов связаны с диагностикой общего физиологического состояния и уровня защитной способности организма, обусловленной участием неспецифических механизмов.

Исследование защитных циркуляционных процессов включает определение иммунофизиологических факторов в крови и лимфе, а также свободных и связанных с компонентами тканей патогенов.

При оценке состояния рыб целесообразно определять комплекс гуморальных и клеточных факторов, относящихся к различным иммунофизиологическим системам (Зимин, 1981; Вихман, 1987; Лукьяненко, 1989). Активность систем при воздействии стресс-факторов и возбудителей заболеваний может быть оценена с помощью высокоинформативного комплекса показателей, включающего естественные гетероагглютинины и лизоцим (Вихман, 1979, 1983).

Общая оценка статуса включает определение проницаемости органов и тканей и очищение организма от патогенов. Проницаемость жабр *in vivo* оценивали путем сопоставления веществ в крови из приносящих и выводящих сосудов (Ogata, Murai, 1988). Разработаны методы определения проницаемости покровов *in vitro* (Строганов, Лашманова, 1968; Вихман, Анкудинова, 1985, 1986). Динамику очищения организма рыб от патогенов устанавливают путем экстрагирования агентов из тканей или непосредственным определением агентов изотопным методом (Яржомбек и др., 1986; Микряков, 1991).

Различное проявление активности систем в онтогенезе определяет качественный состав показателей и их уровень на каждой стадии развития. На эмбриональной стадии развития применяли определение сорбционной и проникающей способности красителей (Ахмедов, Каримов, 1986; Жукинский, 1986). В развивающейся икре можно обнаружить материнские антитела (Mor, Avtalion, 1988), антителоподобные вещества типа лектинов (Балахнин, 1989), агглютинины и лизоцим (Вихман и др., 1992). В оболочке оплодотворенных ооцитов обнаружены вещества, обладающие бактерицидным действием в отношении *Vibrio anguillarum* (Kudo, Inoue, 1989).

Системные показатели, которые могут быть использованы для определения реактивности рыб в производственных условиях приведены в табл. 5.



Таблица 5

Системные показатели для оценки иммунофизиологического статуса рыб при промышленном выращивании

Уровень исследования	Определяемые показатели	Стадии развития
Иммунная система	Антитела	Ооциты и эмбрионы на ранних стадиях развития
	Естественные антитела	Все возрасты
	Приобретенные антитела	Сеголетки и более старшие возрасты
	T- и B-подобные клетки	- "
	Гиперчувствительность замедленного типа	- "
Система неспецифической инактивации патогенов	Лектины	Эмбрионы
	Гуморальные факторы: лизоцим, комплемент и др.	Все возрасты
	Фагоцитоз (без специфического усиления)	- "
Системы: иммунная и неспецифической инактивации патогенов	Фагоцитоз с участием специфических антител	Сеголетки и более старшие возрасты
	Лизис патогенов с участием антител и неспецифических факторов	- "
Комплекс иммунофизиологических систем	Поступление, взаимодействие с тканями и выведение чужеродных агентов антигенной и неантигенной природы	Все возрасты
	Сорбционная способность и проницаемость оболочек яиц	Эмбрионы

Многообразие систем и их элементов требуют применения при анализе результатов различных статистических методов, учитывающих многосторонние связи изучаемых признаков. Для анализа комплекса признаков иммуногенеза и фагоцитоза у рыб применен дискретно-динамический метод (Микряков и др., 1992). Разработана

модификация многомерного метода для оценки статуса карпа по комплексу гуморальных факторов (Вихман, Боршев, 1990).

Таким образом, при выборе показателей, необходимо, исходя из задачи исследования, решить вопрос о выявлении состояния отдельных систем или их комплекса. При определении состояния систем следует учитывать различную значимость показателей. Качественная и количественная характеристика факторов, взаимодействующих с патогенами, в большей мере отражает уровень защитной способности в момент исследования. Показатели, связанные с характеристикой всех промежуточных этапов образованием защитных факторов, позволяют судить об общей функциональной активности соответствующей системы.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ данных литературы и собственные исследования показали, что иммунофизиологическая реактивность рыб имеет два уровня системной организации. Первый уровень связан с отдельными компонентами реактивности, каждый из которых обладает собственной системной организацией: иммунный ответ, неспецифическая инактивация патогенов и транспортные процессы. Второй уровень связан с системным функционированием всего комплекса, так как его компоненты отличаются морфологическими и функциональными особенностями. Части иммунофизиологического комплекса объединены функциональной направленностью на снижение действия патогенов, но различаются степенью участия при разных адаптационных процессах.

Оценка иммунофизиологического статуса рыб в значительной мере связана с методическим уровнем исследования. Предложенный способ количественного определения гуморальных факторов в органах и тканях рыб позволил повысить точность и объективность исследования, расширил его возможности за счет новых показателей и более полного статистического анализа результатов.

Наряду с показателями, характеризующими отдельные факторы систем, необходимо использовать методы оценки общей активности органов и покровов. Совокупность всех иммунофизиологических процессов, включая распознавание воздействующих агентов, их инактивацию и депонирование, а также транспорт в другие образования аналогична защитным свойствам клеточных мембран. В отличие от клеток иммунофизиологически активные органы и ткани названы макромебранами (Вихман, 1989). Общую активность макромебран устанавливают по их проницаемости *in vivo* и *in vitro*.

Экспериментальные исследования выявили важные в практическом отношении результаты. Установлены неравномерность распре-



ления и различное соотношение иммунофизиологических факторов в органах и тканях карпа, веслоноса и толстолобиков. У всех исследованных видов, как правило, отсутствовала корреляция между активностью различных органов и тканей, а также между уровнями иммунофизиологических факторов в одном и том же органе. Поэтому необходимо проведение достаточно широкого исследования с использованием комплекса показателей, отражающих различные свойства органов и тканей.

Изучение реагирования культивируемых рыб на различные факторы вариабельности показало зависимость изменения иммунофизиологического статуса от вида воздействующего агента. Отмечены как одинаковые, так и отличающиеся изменения статуса на различных уровнях системной организации иммунофизиологической реактивности. Выраженную иммунодепрессию с последующим частичным восстановлением реактивности вызвало воздействие на карпа технологических стресс-факторов. Стабильный статус отмечен при воздействии новых кормовых компонентов и некоторых патологических процессах.

Значение результатов исследований для оптимизации выращивания рыб связано с возможностью определения защитных факторов и общей адаптационной способности рыб. Уровень резистентности может быть установлен с помощью показателей, которые отражают защитную функцию в отношении конкретного воздействия. Наиболее полно доказано участие в резистентности рыб факторов, вызывающих прямую инактивацию патогенов: противотоксических и вируснейтрализующих антител, антибактериальной активности гуморальных факторов, фагоцитоза. Для оценки резистентности могут быть использованы также показатели, характеризующие промежуточные этапы образования факторов, реагирующих с патогенами. Значительно более широкий круг иммунофизиологических признаков, включая все системы и их элементы, может быть использован для физиологической оценки технологических воздействий и их способности нарушать гомеостаз.

Системные представления при оценке иммунофизиологического статуса рыб и использование количественного анализа признаков является существенным прогрессом в методологии исследования рыб. Они позволяют значительно расширить число применяемых методов, более полно и целенаправленно характеризовать изменение реактивности при воздействии технологических факторов.

Принципы системного анализа иммунофизиологической реактивности рыб - представителей низших позвоночных соответствуют современной концепции иммунофизиологических исследований, применяемых для управления промышленным разведением эндотермных животных.

Поэтому системные иммунофизиологические исследования являются общей методологией оптимизации технологии разведения высших и низших позвоночных.

#### ВЫВОДЫ

1. Иммунофизиологический статус рыб обусловлен деятельностью комплекса физиологических систем, включая иммунный ответ, неспецифическую инактивацию патогенов и защитные транспортные процессы. Они объединены общей функциональной направленностью, связанной с непосредственным воздействием на патогенные агенты, но отличаются механизмами защиты и регуляции.

2. Оценка иммунофизиологического статуса проводится с помощью комплекса показателей, отражающих различные уровни организации иммунофизиологических систем и этапы образования факторов резистентности. Комплекс используемых показателей включает односистемные, двухсистемные и общие тесты определения состояния иммунофизиологической реактивности. Интегральную оценку иммунофизиологической активности органов и тканей определяют по их проницаемости в отношении ксенобиотиков и по очищению организма от чужеродных агентов.

3. Основными методологическими принципами проведения иммунофизиологического анализа влияния технологических факторов на объекты рыбоводства являются зависимость реагирования от вида воздействующего фактора, необходимость определения активности разных систем и показателей, характеризующих этапы их функционирования, установление активности различных органов и тканей, включая паренхиматозные органы, жабры, кровь и покровы.

4. Органы и ткани рыб, проявляющие иммунофизиологическую активность, функционируют как биомембраны и обладают барьерной и продуцирующей способностью. Барьерная функция кожи карпа в отношении фосфорорганических соединений по данным опытов *in vitro* зависела от вида вещества, его концентрации, времени воздействия и состояния кожного покрова. Одним из факторов, регулирующих проницаемость, является растворимый компонент кожи карпа, подавляющий активность токсических фосфорорганических соединений.

5. Применение количественного метода оценки гуморальной активности органов и тканей позволило определить абсолютное и относительное количество иммунофизиологических факторов, выявить их распределение в организме рыб и взаимосвязь активности различных образований. Более высокие уровни гетерогемагглютининов найдены во внутренних органах, покровах и крови у карпа по срав-



нению с гибридом белого и пестрого толстолобиков и веслоносом. Содержание лизоцима в органах и тканях веслоноса превышало уровень фермента у карпа и толстолобика. Корреляция между различными видами гемагглютининов и лизоцима в отдельных органах и между органами оказалась незначительной.

6. При оценке влияния на иммунофизиологический статус карпа стресс-агентов, заболеваний и кормовых компонентов установлена высокая изменчивость реагирования, которая проявлялась в неоднзначном отклонении значения показателей и различной их направленности. Развитие первичного стресса у карпа вызывало снижение уровня естественных антител с последующим их увеличением. При повторном стрессе уровень гетерогемагглютининов не изменялся, но отмечали увеличение инвазированности рыб паразитами. Развитие иммунодепрессии в течение двух-трех недель после первичного воздействия стресс-агентов сопровождалось снижением противопаразитарной устойчивости.

7. При введении в традиционные корма для карпа новых компонентов - белково-витаминного концентрата и торфяной кормовой добавки отмечена стабильность иммунофизиологического статуса. Отсутствие изменения уровня естественных антител и лизоцима, а также биохимических и рыбоводных показателей свидетельствовали о физиологической безопасности этих компонентов.

8. У карпа в хозяйствах различных зон рыбоводства выявлены антитела к антигенной фракции эндотоксина и к поверхностному антигену *Aeromonas sobria*. Уровень антител к клеточному бактериальному антигену был значительно выше, чем к эндотоксину, а корреляция между содержанием антител к разным антигенам отсутствовала. Определение антител к различным антигенам аэромонад увеличило возможности иммунологического исследования при оценке эпизоотической ситуации, позволило более полно характеризовать реагирование рыб на аэромонады и может быть применено для оценки общей адаптационной способности организма.

9. Анализ динамики активности генетических групп карпа выявил различные уровни изменчивости иммунофизиологического статуса. Изменения реактивности после воздействия технологических факторов (1-ый уровень) развивались на определенном фоне активности иммунофизиологических систем, обусловленном сезоном (2-ой уровень) и годом (3-ий уровень) исследований. Показана более высокая зависимость изменения статуса от сезона и года исследования по сравнению с генетической характеристикой группы.

10. Разработанная модификация многомерного статистического метода позволила определить изменение иммунофизиологического

статуса по комплексу гуморальных показателей, расширила возможности статистического анализа результатов для выявления интегральной изменчивости признаков. Разработаны математические критерии разделения особей на классы активности, принципы анализа изменчивости признаков и сравнительной оценки различных групп рыб.

11. Применение системного анализа для оценки иммунофизиологического статуса рыб - объектов аквакультуры позволяет более эффективно использовать иммунофизиологические исследования для оптимизации выращивания рыб и свидетельствует о единстве методологических принципах оценки иммунофизиологического статуса культивируемых видов как эктотермных, так и эндотермных позвоночных.

#### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Использование системного анализа для оценки иммунофизиологического статуса культивируемых рыб позволяет наиболее полно выявить у них признаки резистентности и общей адаптационной способности в условиях производственного выращивания. С помощью односистемных иммунологических показателей осуществляется этиологическая диагностика при воздействии агентов, обладающих антигенной способностью, контроль иммуномодуляции и выявление специфической резистентности. Общая оценка адаптации к новым факторам выращивания проводится с помощью показателей активности систем специфической и неспецифической инактивации патогенов.

2. Количественный метод определения гуморальных иммунофизиологических факторов в органах и тканях рыб позволяет повысить объективность исследований и эффективность их использования для оптимизации выращивания рыб.

3. Для выявления изменений активности иммунофизиологических систем в условиях воздействия стресс - факторов и при развитии заболеваний может быть применен комплекс показателей, включающий естественные гетерогемагглютинины и лизоцим.

4. При появлении признаков иммунодепрессии после стрессового воздействия необходимо в течение 2-3 недель проводить паразитологический контроль рыб и их профилактическую обработку.

5. Использование в качестве кормовых добавок 7% белково-витаминного концентрата и 25-50% торфяного компонента является по данным иммунофизиологических исследований физиологически безопасным.

6. Для выявления у рыб антител к эндотоксину аэромонад применимы реакции непрямого гемагглютинации и диффузной преципитации



ции, в которых используют термостабильную антигенную фракцию эндотоксина.

7. Определение в тканевых экстрактах веществ, подавляющих активность токсических фосфорорганических соединений, проводят по изменению уровня антихолинэстеразной активности фосфорорганических соединений в присутствии экстракта.

8. Для сравнительной оценки биологической активности фосфорорганических соединений может быть использован метод определения проницаемости кожи рыб *in vitro*. Минимальная концентрация хлорофоса, при которой он проникал через кожу, составила 0,4-0,6 мг на 1 см<sup>2</sup> поверхности кожи, а этилового, паранитрофенилового эфира этилфосфоновой кислоты - в 40 раз ниже.

9. Статистическая обработка результатов иммунофизиологического исследования рыб должна быть дополнена многомерным анализом. Применительно к оценке иммунофизиологического статуса карпа по уровню гетерогемагглютининов разработана методика выявления различия групп рыб с помощью компьютерной программы.

#### СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Вихман А. А. Система иммунитета рыб и ее противоионизирующая и противопаразитарная функции // Известия ГосНИОРХ / Проблемы изучения паразитов и болезней рыб. -Л.: ГосНИОРХ, 1976, -т. 105, -с. 84-91.

2. Вихман А. А. О количественном определении лизоцима в слизи кожных покровов рыб с помощью турбидиметрического метода // Сб. научн. трудов ВНИИПРХ / Интенсификация прудового рыбоводства. -М. -1974, -вып. 11, -с. 306-313.

3. Вихман А. А. Изучение лизоцима наружных покровов рыб // Сб. научн. трудов ВНИИПРХ / Физиология прудовых рыб. -М. -1975, -вып. 12, -с. 97-104.

4. Вихман А. А. К изучению лизоцима карпа *Cyprinus carpio* L. // Сб. трудов ВНИИПРХ / Паразиты, болезни рыб и их профилактика. -1978, -т. 27, -с. 48-58.

5. Вихман А. А. Иммунологические исследования в диагностике болезней рыб // Тез. семинара "О новых и передовых методах борьбы с болезнями рыб", -М. -1977, -с. 24-28.

6. Вихман А. А. О количественном определении нормальных геммагглютининов в органах и тканях карпа // Сб. научн. трудов ВНИИПРХ / Болезни рыб и борьба с ними. -М. -1979, -вып. 23, -с. 69-82.

7. Вихман А. А., Поддубная А. В., Авдеева Е. В. Об изменении гуморальных факторов естественного иммунитета у карпа под влия-

нием некоторых заболеваний и условий выращивания // Тез. докл. VII Всесоюзн. совещ. по болезням рыб. -Л. -1979, -с. 18-20.

8. Вихман А. А., Поддубная А. В. О влиянии стресса на иммунологическую реактивность карпа. // Сб. научн. трудов / Вопросы интенсификации прудового рыбоводства. -М. -1981, -вып. 31, -с. 233-248.

9. Вихман А. А. Экологическая иммунология рыб на современном этапе // Успехи совр. биологии. -1983, -вып. 1, -с. 130-137.

10. Vichman A. A. Quantitative determination of some humoral factors of immunity in organs and tissues of carp // Fish, diseases and environment in european aquaculture. - Szarvas, Hungary, -1981, -p. -425-438.

11. Мусселиус В. А., Ванятинский В. Ф., Вихман А. А. и др. Лабораторный практикум по болезням рыб. -М. -Легкая и пищевая промышленность, -1983, -295 с.

12. Вихман А. А. Иммунопрофилактика болезней рыб // Биол. ресурсы гидросферы и их использование. Биол. основы рыбоводства: паразиты и болезни рыб. -М. -1984, -с. 125-134.

13. Вихман А. А., Анкудинова В. А. О барьерных свойствах кожи рыб // Тез. докл. Всесоюзн. совещ. "Профилактика, лечение и диагностика инфекционных болезней рыб". -М. -1986, -с. 16-18.

14. Вихман А. А. Иммунологический контроль состояния рыб // Рыбоводство. -1987, -N 5, -с. 26-28.

15. Вихман А. А., Анкудинова В. А. Метод определения в тканях рыб веществ, воздействующих на фосфорорганические соединения // Методы ихтиотоксикологических исследований. -Л. -1987, -с. 19-21.

16. Вихман А. А., Лобунцов К. А. Методы иммунологического изучения рыб // Госагропром СССР, ВДНХ СССР. -М. -1987, -7 с.

17. Вихман А. А., Анкудинова В. А. Разработка модификации холинэстеразного метода для определения ФОС в тканях рыб // Сб. научн. трудов ВНИИПРХ / Болезни рыб и водная токсикология. -М. -1988, -вып. 50, -с. 160-166.

18. Вихман А. А. Макромембранная гипотеза происхождения и эволюции иммунной системы низших позвоночных // Тез. докл. 1 Всесоюзн. иммунологического съезда. -М. -1989, -с. 26.

19. Вихман А. А., Боршев В. Н. Новый метод оценки иммунологического статуса рыб (ноу-хау, лицензия N 1368 от 25 июня 1989 г.) // Вестник с.-х. науки, -1990, -N 2, -с. 159.

20. Вихман А. А., Шарт Л. А., Генералова Л. П. О количественном анализе иммунологической реактивности отводок краснухоустойчивого карпа // Сб. научн. трудов ВНИИПРХ / Вопросы селекции, генетики и племенного дела в рыбоводстве. -М. -1989, -вып. 58, -с. 98-104.



21. Вихман А. А. Макромембранная концепция иммунобиологического контроля состояния рыб // Тез. докл. VII Всесоюзн. конф. "Экологическая физиология и биохимия рыб. -Ярославль, -1989, -т. 1, -с. 73-75.

22. Вихман А. А., Генералова Л. П. Методические указания по количественному анализу гуморальных факторов резистентности в органах и тканях рыб. -М.: ВНИИПРХ, -1991, -20 с.

23. Вихман А. А., Ситнова О. В., Генералова Л. П. Изменение иммунологических показателей у веслоноса *Polyodon spathula* при некоторых химических воздействиях // Тез. докл. 2 Всесоюзн. конф. по рыбохозяйственной токсикологии, посвященной 100-летию проблемы качества воды в России (Санкт-Петербург, ноябрь 1991), -С. -Петербург, -1991, -т. 1, -с. 93-94.

24. Вихман А. А. Об основных направлениях развития иммунологического исследования рыб // Сб. научн. трудов ВНИИПРХ / Болезни рыб. -М. -1991, -вып. 63, -с. 16-22.

25. Вихман А. А. О системной природе иммунофизиологической реактивности рыб // VIII научная конф. по эколог. физиологии и биохимии рыб. / Тез. докл., Петрозаводск, -1992, -т. 1, -с. 55-56.

26. Вихман А. А. Температурная регуляция иммуно-физиологической реактивности рыб // Сб. докл. совещания "Экологические аспекты и природоохранные мероприятия при использовании теплых вод энергетических объектов". - М. - 1992, - с. 17-33.

27. Kirpichnikov V. S., Ilyasov You. I., Shart L. A., Vickman A. A. et al. Selection of Krasnodar common carp (*Cyprinus carpio* L) for resistance to dropsy: principal results and prospects // Aquaculture. -1993, -vol. 111, -p. 7-20.

28. Вихман А. А., Таразевич Е. В., Генералова Л. П., Шарт Л. А. О сравнительной иммунофизиологической характеристике лахвинского и тремлянского карпов // Сб. научн. трудов ВНИИПРХ / Вопросы генетического и экологического мониторинга объектов рыбоводства. -М. -1992, -вып. 68, -с. 39-48.

29. Вихман А. А., Лобунцов К. А., Генералова Л. П. Изучение антигенной фракции эндотоксина аэромонад, выделенных от карпа и лососевых рыб // Сб. научн. трудов ВНИИПРХ / Вопросы генетического и экологического мониторинга объектов рыбоводства. -М. -1993, -вып. 69, -с. 63-69.