

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Институт биологии внутренних вод
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
Отделение ветеринарной медицины
Межведомственная икhtiологическая комиссия
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГИЙ И УПРАВЛЕНИЯ

**Проблемы
иммунологии, патологии
и охраны здоровья рыб**

Расширенные материалы
Всероссийской научно-практической конференции



Москва
2004

Российская академия наук
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД
Российская академия
сельскохозяйственных наук
Отделение ветеринарной медицины
Межведомственная ихтиологическая
комиссия
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И
НАУКИ
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГИЙ И УПРАВЛЕНИЯ

**ПРОБЛЕМЫ ИММУНОЛОГИИ,
ПАТОЛОГИИ И ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ
РЫБ**

**Расширенные материалы
Всероссийской научно-практической конференции**

**МОСКВА
2004**

УДК [597.08:612.017] (063)

Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширенные материалы Всероссийской научно-практической конференции, Борок, 16-18 июля 2003 года. Москва, 2004. 272 с. Под редакцией д.б.н., проф. В.Р.Микрякова, д.б.н. А.М. Наумовой, к.б.н., доцента А.Л. Никифорова-Никишина, к.б.н. Е.А. Заботкиной.

В основу сборника положены доклады, сделанные на Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов», посвященной светлой памяти доктора биологических наук Глеба Дмитриевича Гончарова - основоположника инфекционной патологии и иммунологии рыб. В нем представлены материалы по проблемам общей, частной иммунологии, патологии, связанные с охраной здоровья рыб. Рассматриваются эволюционные, экологические аспекты иммунологии, иммунотоксикологии, иммунопрофилактики, патофизиологии, патоморфологии, паразитологии, оценки влияния стресс-факторов, условий содержания на состояние здоровья молоди осетровых и лососевых рыб и новые подходы борьбы с болезнями объектов аквакультуры.

Материалы сборника представляют интерес для иммунологов, паразитологов, ихтиологов, физиологов, биохимиков, токсикологов, а также практических работников рыбного хозяйства, специалистов в области охраны природы, преподавателей ВУЗов.

Ответственные за выпуск: академик А.М. Смирнов (РАСХН);

д.б.н., проф. В.Р. Микряков (ИБВВ РАН);

д.б.н., проф. С.И. Никоноров (МИК);

д.б.н. А.М. Наумова (МИК, ВНИИР РАСХН);

к.б.н. А.Л. Никифоров-Никишин (МГУТУ);

к.б.н. Е.А. Заботкина (ИБВВ РАН);

За достоверность представленных в сборнике сведений несут ответственность авторы соответствующих материалов.

ISBN

©Институт биологии внутренних вод РАН, 2004

©Межведомственная ихтиологическая комиссия, 2004

©Московский государственный университет технологии и управления, 2004

Problems of immunology, pathology and fish health protection. Enlarged materials of All-Russian scientific and applied research conference, Borok, 16-18 July 2003. Under the editorship of Doctor of Biological Sciences, Prof. V. R. Mikriakov, Doctor of Biological Sciences A. M. Naumova, Candidate of Biological Sciences, Senior Lecturer A. L. Nikiforov-Nikishin, Candidate of Biological Sciences E. A. Zabolkina.

These collected articles are based on presentations made at the All-Russian scientific and applied research conference "Issues of pathology, immunology, health protection of fish and other hydrobionts" dedicated to the memory of Doctor of Biological Sciences Gleb Dmitrievich Goncharov - the founder of fish infectious pathology and immunology. This work considers evolutionary and ecological aspects of immunology, immunotoxicology, immunoprophylaxis, pathophysiology, pathomorphology, parasitology, the effect of stress factors and environmental conditions on state of health of juvenile Acipenseridae and Salmonidae as well as new approaches to fighting against diseases of aquaculture objects.

We hope this collection proves to be useful for immunologists, parasitologists, ichthyologists, physiologists, biochemists, toxicologists as well as fish industry specialists, environmentalists and lecturers.

Editorial Board: Academician A. M. Smirnov (RAAS);

Doctor of Biological Sciences, Prof. V. R. Mikriakov (IBIW RAS);

Doctor of Biological Sciences, Prof. S. I. Nikonorov (DIC);

Doctor of Biological Sciences A.M.Naumova (DIC, VNIIR, RAAS);

Candidate of Biological Sciences, Senior Lecturer A. L. Nikiforov-Nikishin (MSUTM);

Candidate of Biological Sciences E.A.Zabolkina (IBIW RAS)

Authors of the corresponding materials are responsible for reliability of the data presented in these collected articles.

ISBN

©Institute for Biology of Inland Waters RAS, 2004

©Interdepartmental Ichthyological Commission, 2004

©Moscow State University of Technology and Management, 2004

Предисловие

В связи с усилением влияния хозяйственной деятельности человека на водные экосистемы вследствие поступления в водоемы поллютантов, нарушения газового, температурного режимов, скопления метаболитов, продуктов разложения органики, интенсификации процессов выращивания в рыбоводных предприятиях и т.д., нарушаются экологические условия, обеспечивающие оптимальный рост, развитие и выживаемость рыб, вследствие поступления в водоемы поллютантов, нарушения газового, температурного режимов, скопления метаболитов, продуктов разложения органики, интенсификации процессов выращивания в рыбоводных предприятиях и т.д., что становится причиной массовых заболеваний и гибели рыб (Бауэр и др., 1981; Канаев, 1983; Наумова, Ройтман, 1989; Боговский, 1997; Наумова и др. 1997, 2003; Шестаковская и др. 1997, 2003; Стрелков, 1997; Яременко и др. 1997, 2003; Головина и др., 1997, 2003; Грищенко и др., 1995; Кашулин и др. 1999; Решетников и др., 1999; Сапожников, 2001; Наумова, 2003; Размашкин и др., 2003 и многие другие).

Болезни являются внешним проявлением последствий нарушения функций иммунитета и общей резистентности (адаптивного потенциала), вызванных влиянием неблагоприятных факторов среды на состояние здоровья рыб, и отложением патологических процессов на молекулярном, клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях, возникающих в ответ на воздействие патогенных организмов, токсикантов и т.д.

Охрана здоровья рыб и других гидробионтов на современном этапе развития аквакультуры и воспроизводства их в естественных и антропогенно-трансформированных экосистемах, как это было отмечено участниками 1-й Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов» - актуальная и многоплановая задача. Конференция состоялась с 16 по 18 июля 2003 г. в Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН и была посвящена светлой памяти доктора биологических наук Глеба Дмитриевича Гончарова – основоположника инфекционной патологии и иммунологии рыб – в связи со 100-летием со Дня его рождения.

На конференции рассмотрен широкий круг проблем, ох-

влияющих эволюционные, экологические, генетические, физиолого-биохимические, инфекционные, инвазионные и токсикологические аспекты патологии и иммунологии, а также вопросы профилактики, диагностики, мониторинга, создания экологически безопасных способов борьбы с болезнями и т.д. Итогом проведенной конференции явилась публикация тезисов докладов и принятие решения. Одним из пунктов решения было издание сборника работ по материалам конференции. В связи с этим ИБВВ РАН взял на себя обязательства в 2004 г. сформировать такой сборник. Сборник содержит статьи по фундаментальным и прикладным проблемам патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб. В соответствии с тематикой обсуждаемых на конференции вопросов сборник состоит из 3-х частей: 1 часть «Вопросы общей и частной иммунологии»; 2-я – «Вопросы общей и частной патологии» и 3-я – «Болезни и охрана здоровья рыб».

Статьи в разделе «Вопросы общей и частной иммунологии» посвящены анализу и обсуждению вопросов, связанных с изучением вклада Г.Д. Гончарова в становление и развитие инфекционной патологии и иммунологии рыб; эволюции иммуноглобулинов и их роли в реализации процессов прогрессивной эволюции; иммунного статуса гидробионтов Белого моря, дельты Волги, озера Неро в норме и при воздействии на рыб разнообразных стресс-факторов и техногенного загрязнения; характера влияния инфильтрационных способов вакцинации, солей тяжелых металлов, гормональных препаратов, ионов аммония и кальция на структурно-функциональное состояние иммунной системы, защитную функцию пищеварительного тракта, протективного эффекта биохимической и аттенуированной вакцин против аэромонады; уровня содержания лизоцима у хищных видов рыб; опыта применения индекса Шеннона для оценки дестабилизационных процессов в составе лейкоцитов.

Вторая часть сборника состоит из статей, в которых анализируются эволюционные, экологические, инфекционные и инвазионные проблемы патологии. Представленные работы имеют важное значение для разработки нормы и патологии и установления критериев оценки патогенного влияния неблагоприятных для роста и развития рыб факторов, для понимания механизмов патогенеза и последствий влияния эу- и дистресса на процессы водно-солевого обмена, температурных колебаний, техногенного загрязнения, заражен-

ности рыб эндопаразитами, солей тяжелых металлов, алиментарного токсикоза, ингибиторов клеточной пролиферации и энкефалинов на физиолого-биохимические механизмы адаптации, структурно-функциональное состояние тканей, органов, эндокринных желез, ферментных, пищеварительных, метаболических и воспроизводительных систем организма у различных по экологии видов рыб, относящихся к семействам лососевых, камбаловых, сиговых и карповых.

Представленные в разделе «Болезни и охрана здоровья рыб» статьи посвящены изложению современных представлений о вирусных, бактериальных, паразитарных болезнях лососевых и карповых рыб, о характере влияния экологических факторов на заболеваемость рыб.

Большой интерес в плане разработки экологически безопасных и эффективных способов борьбы и профилактики болезней рыб представляют статьи, в которых приведены новые методологические подходы, основанные на использовании температурного фактора, пробиотиков, изменении сроков периодичности осушения прудов и мониторинговых наблюдениях за состоянием здоровья и динамики изменения численности рыб и их паразитов как в естественных, так и в искусственных условиях выращивания.

В заключение следует отметить, что представленные в сборнике статьи будут интересны для широкого круга специалистов, занимающихся разработкой фундаментальных проблем патологии, иммунологии, охраны здоровья и борьбы с болезнями рыб и других гидробионтов, вопросами воспроизводства в искусственных и естественных условиях выращивания.

академик А.М. Смирнов,
д.б.н., проф. С.И. Никоноров,
д.б.н., профессор В.Р. Микряков,
д.б.н. А.В. Наумова,
к.б.н., доцент А.Л. Никифоров-Никишин

ЧАСТЬ I. ВОПРОСЫ ОБЩЕЙ И ЧАСТНОЙ ИММУНОЛОГИИ

УДК 612.017+92

ВКЛАД Д. Б. Н. Г. Д. ГОНЧАРОВА В СТАНОВ- ЛЕНИЕ И РАЗВИТИЕ ИНФЕКЦИОННОЙ ПА- ТОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ РЫБ.

В.Р. Микряков

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-он*

Приводятся сведения о творческом наследии крупнейшего ихтиопатолога России XX века, доктора биологических наук Глеба Дмитриевича Гончарова, основоположника инфекционной патологии и иммунологии рыб. Освещается вклад Г.Д. Гончарова в становление и развитие исследований по иммунитету рыб к вирусным и бактериальным болезням, о роли вирусов в патологии краснухи, оспы карповых и вирусной геморрагической септицемии лососевых рыб и в разработку методических руководств по изучению вопросов патологии и иммунологии рыб.

Становление и развитие инфекционной патологии и иммунологии рыб, изучающих закономерности возникновения, течения и исхода болезни после внедрения в организм болезнетворных микроорганизмов, механизмы и факторы, обеспечивающие иммунитет рыб к инфекционным болезням, в нашей стране и за ее пределами во многом связаны с именем одного из крупнейших ихтиопатологов XX века – доктора биологических наук Глеба Дмитриевича Гончарова, которому 17 июня 2003 года исполнилось 100 лет со дня рождения.

Глеб Дмитриевич родился 17 июня 1903 года в Майоратном имении Гончаровых, селе Полотняный завод Медынского уезда Калужской губернии, в семье потомственного дворянина Дмитрия Дмитриевича Гончарова (внучатого правнука Натальи Николаевны Гончаровой, жены великого русского поэта А.С. Пушкина). Высшее образование он получил на рыбохозяйственном факультете Московской Сельскохозяйственной Академии им. К. А. Тимирязева по специальности «рыбовод-биолог», который он окончил в 1929 г.

После получения высшего образования вначале он работает гидробиологом в ВОДГЕО (1929-1931г.г.), затем заведующим отделением водного хозяйства в Алма-Ате и гидробиологом Казахского ГосРыбтреста (1931-1932 гг.).

В 1932 году он по приглашению профессора Ф.Г. Мартышева, директора вновь созданного Центрального научно-исследовательского института прудового рыбного хозяйства (ЦНИИПРХ), ныне ФГУП ВНИИПРХ, возвращается в Москву для проведения научных работ по болезням рыб под руководством Г.В. Эпштейна и М.А. Пешкова. Первоначально Г.Д. Гончаров проводит исследования по изучению этиологии краснухи карпов (синонимы - геморрагическая септицемия или брюшная водянка). Краснуха карпов, в отличие от других инфекционных болезней, вызывает массовую гибель рыб и приносит огромные убытки прудовым хозяйствам. На основании полученных результатов по изучению природы и причины краснухи карпов в 1935 году он защищает кандидатскую диссертацию по теме «К изучению этиологии краснухи карпов» на Ученом Совете Всесоюзного института экспериментальной медицины (ВИЭМ). На основе исследований характера проявления и распространения краснухи среди рыб в прудовых хозяйствах, клиники проявления болезни и роли микроорганизмов *Pseudomonas punctata* (синоним *Achromobacter punctata*, *Achromobacter liquifaciens*), *Aeromonas hydrophila* (Лобунцов, Юхименко, 1981) в инфекционном процессе Г.Д. Гончаров выдвигает гипотезу о вирусной этиологии краснухи вопреки существующему в то время положению, что основной причиной этой болезни как считал Шаперклаус (1930), являются бактерии из рода *Achromobacter* или *Aeromonas*.

Выдвинутые Г.Д. Гончаровым положения о вирусной этиологии краснухи карпов среди научных специалистов по ихтиопатологии были встречены не однозначно и не получили всеобщего одобрения. После защиты кандидатской диссертации и присвоения звания «старший научный сотрудник» по специальности «Болезни рыб» поступает на работу в ВИЭМ к академику А.П. Исаченкову, где он осваивает основные приемы вирусологических и иммунологических исследований.

В 1938 году он организует и возглавляет лабораторию болезней рыб во Всесоюзном научно-исследовательском институте морского рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО).

Основные усилия коллектива лаборатории он направляет на разработку проблем инфекционной патологии и иммунологии, в частности, изучение особо опасных для здоровья рыб болезней: инфекционной анемии лососевых, краснухи и оспы карповых, язвенной болезни судака, инвазионных болезней, а также вопросов иммунодиагностики и иммуно-

профилактики. Одновременно он продолжает развивать работы, направленные на установление вирусной природы краснухи карпов и определение роли вирусов в этиологии болезни. Для решения поставленных задач он привлекает вирусологические, иммунологические, гистопатологические и микробиологические приемы исследований.

Используя разнообразные методические приемы исследований и подходы, он приводит убедительные доказательства о вирусной природе краснухи. По материалам исследований, полученных при изучении краснухи рыб, он в 1953 году защищает докторскую диссертацию на Ученом Совете ВИЭМ по теме «Краснуха рыб как вирусное заболевание».

Выдвинутые Г. Д. Гончаровым основные выводы и положения о роли вирусов в патологии краснухи карпов в дальнейшем нашли подтверждение в работах, проводимых во Всесоюзном институте экспериментальной ветеринарии им. Р. Я. Коваленко Н.И. Рудиковым совместно с Т.Д. Пичугиной (1975 -1985), в УкрНИИРХе - Е.Ф. Осадчей, совместно с М.Г. Наконечной (1974; 1978; 1979; 1981), во ВНИИПРХе – И.С. Шелкуновым, Т.И. Шелкуновой (1981; 1984; 1990-1998; 2002).

На основе анализа характера распространения краснухи рыб в зависимости от сезона, возраста, клиники проявления болезни К.А.Лобунцовым и Н.И.Рудиковым (1972, 1974) инфекционную фодянку или краснуху в зависимости от этиологических причин предложено разделить на три самостоятельные заболевания: аэромоназ, псевдомоназ и вирусная ириверия карпов.

В настоящее время во ВНИИПРХе и ВИЭВе получены новые данные по структурной организации вируса, об его биологических, вирулентных и иммунологических свойствах (Шелкунова, 1998, 2002; Пичугина, 2001 и др.).

В 1957 году, по приглашению И. Д. Папанина из Москвы Г.Д. Гончаров переезжает в Институт биологии внутренних вод АН СССР (ИБВВ), где он работает вначале старшим научным сотрудником в лаборатории зоологии и паразитологии, руководимой доктором биологических наук Борисом Сергеевичем Кузиным, до 1965 года, затем – заведующим лабораторией физиологии пресноводных животных (1965 - 1970 гг.), а с 1970 по 1974 гг. – руководителем группы иммунологов.

Его научные интересы в ИБВВ были связаны с развитием инфекционной патологии и иммунологии рыб. Проводимые Глебом Дмитриевичем Гончаровым в ИБВВ исследования

были посвящены изучению механизмов и факторов иммунитета рыб к бактериальным и вирусным болезням, разработке научных основ иммунопрофилактики путём вакцинации и методических основ лабораторной диагностики болезней рыб.

Многие работы, проводимые Г.Д. Гончаровым и его учениками по иммунитету рыб, следует считать пионерскими. Впервые им установлено, что на иммунизацию вирусными и бактериальными антигенами, вызывающими заболевание, рыбы реагируют синтезом специфических антител и повышением эффективности протективного иммунитета. Им впервые, совместно с учениками, детально изучены закономерности формирования приобретенного иммунитета к бактериальной инфекции, выявлены механизмы и факторы, регулирующие процессы иммуногенеза, установлены сходства и различия в характере реакции на иммунизацию иммунной системы рыб и теплокровных животных (Микряков и др., 1974; Балабанова, 1978; Goncharov, Mikryakov, 1968).

Анализ исследований, проведенных им и его учениками, впервые позволил установить, что процесс иммуногенеза у рыб, подобно высшим позвоночным животным, связан с распознаванием и разрушением чужеродных тел, элиминацией продуктов их распада, презентацией иммуногена макрофагами иммунцитам, трансформацией и дифференцировкой предшественников антителообразующих клеток в сторону антителообразующих, образованием клеток иммунологической памяти, повышением функциональной активности клеточных и гуморальных факторов иммунитета и невосприимчивости рыб к инфекционным болезням. Но, в отличие от гомойотермных животных, процесс иммуногенеза у рыб зависит от температуры окружающей среды (Микряков, 1984, 1991).

На основе полученных материалов исследований по изучению механизмов и факторов иммунитета у рыб Г.Д. Гончаровым и его учениками сформулированы основные принципы управления иммунореактивностью рыб путём вакцинации и коррекции условий среды обитания.

Выдвинутые Г.Д. Гончаровым и его учениками выводы и положения о специфичности иммунного ответа и возможности управления иммунореактивностью путем иммунизации послужили основой создания вакцинных и диагностических препаратов против особо опасных вирусных и бактериальных болезней среди объектов аквакультуры. В настоящее время исследования по созданию вакцинных препаратов и серодиагностикумов проводятся как в нашей стране (Безга-

чина, 1984, 1997, 1999; Шелкунов с соавторами, 1995, 2001; Юхименко, 1995, 1998, 2001), так и за рубежом.

Г.Д. Гончаров как учёный много сил и энергии внёс в организацию ихтиопатологических исследований у рыб в СССР и в дело разработки ряда вопросов микробиологии, вирусологии и иммунологии рыб. Огромная работа проведена Г.Д. Гончаровым по исследованию таких заразных заболеваний, как краснуха и оспа карповых, инфекционная анемия лососёвых и ряда других заразных болезней рыб. Большой вклад внесён им в дело исследования заразных болезней не только прудовых рыб, но и рыб, обитающих в естественных водоёмах, в частности Азовском море, озёрах Балхаш и Иссык-Куль.

Исследования Г.Д. Гончарова по изучению заразных болезней рыб явились основой при составлении ряда разделов в руководствах по ветеринарно-санитарной экспертизе мяса и рыбных продуктов.

Кроме научно-исследовательской и организаторской работы, большое внимание он уделял внедрению новейших методических приёмов исследований. Им впервые в содружестве с В.И. Романенко внедрён радиоуглеродный метод, а также метод культивирования клеток *in vitro* для вирусологических работ. Г.Д. Гончаров – автор 100 научных работ и книги «Лабораторная диагностика рыб», до сих пор не потерявшей своей актуальности среди ихтиопатологов. Она является одним из уникальных руководств, в котором довольно просто и доступно изложены основные принципы и методы диагностики заразных болезней рыб, а так же методы и приёмы микробиологических, вирусологических и иммунологических исследований рыб. За заслуги перед Родиной он награжден многими правительственными наградами, в т. ч. орденом «Знак Почёта». Глеб Дмитриевич был не только замечательным учёным, но и хорошим воспитателем. Под его руководством защищены 5 кандидатских и одна докторская диссертация. Его ученики в настоящее время успешно продолжают развивать начатое им дело как в ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН, так и в различных учреждениях нашей страны. На базе начатых им в ИБВВ разработок в области инфекционной патологии и иммунологии рыб в 1997 г. создана первая в стране лаборатория иммунологии. Исследования лаборатории направлены на разработку иммунологических механизмов адаптации рыб и других гидробионтов к биотическим и абиотическим факторам среды, в том числе паразитам, вызывающим инфекционные и инвазионные болезни, и токсикантам.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ Г.Д. ГОНЧАРОВА:

1. Новые данные в этиологии краснухи карпов// Рыбное хозяйство. 1940. №12. С. 37-39.
2. Серологическая диагностика карпа, как доказательство вирусной природы краснухи// Рыбное хозяйство. 1949. №4. С. 45-47.
3. К иммунизации рыб// Доклады АН СССР. 1951. Т. 78. №3. С. 78-81.
4. Краснуха как вирусное заболевание рыб// Вестник АН СССР. 1955. № 6. С. 120-124.
5. Goncharov G.D. Rubella, a Viral Fish Disease// Ann. N. Y. Acad. Sci. 1965. M.126. Art I. P. 521-523.
6. Гончаров Г.Д. Лабораторная диагностика болезней рыб. М.: Колос, 1973. 120 с.
7. Гончаров Г.Д., Микряков В.Р., Владимиров В.Л. Иммуитет у рыб//Паразиты и болезни рыб и водных беспозвоночных. М.: Наука, 1972.
8. Goncharov G.D., Mikryakov V.R. Stude des facteurs de l'immunité des poissons a une infection bacterienne // Bull. Off. Int. Epiz. 1968. №69. P.9-10.
9. Гончаров Г.Д., Микряков В.Р. Влияние малых концентраций фенола на антителообразование у карпа (*Cyprinus carpio* L) // Вопросы водной токсикологии. М.: Наука, 1970.
10. Гончаров Г.Д., Романенко В.И., Микряков В.Р. Изучение механизма иммунитета при помощи C^{14} // Докл. АН СССР. 1966. Т. 171. №5.
11. Микряков В.Р., Гончаров Г.Д., Романенко В.И., Трофимова Л.В. К изучению механизма иммунитета у рыб // Флора, фауна и микроорганизмы Волги. Изд. АН СССР: Рыбинск, 1974. С. 264-275.
12. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Изд. АН СССР: Рыбинск, 1991. 155 с.

THE CONTRIBUTION OF PH. G.D.GONCHAROV IN BECOMING AND DEVELOPMENT OF AN INFECTIOUS PATHOLOGY AND IMMUNOLOGY OF FISHES.

V.R.Mikryakov

Institute for biology of inland waters RAS, Borok < Russia

Data on a creative heritage of the Russian largest ichthyopathologist of XX century, Dr.Sci.Biol. Gleb Dmitrievich Goncharov, of the founder of an infectious pathology and

immunology of fishes are resulted. G.D.Goncharova's contribution to becoming and development of researches on immunity of fishes to virus and bacterial illnesses, about a role of viruses in a pathology rubella, smallpoxes of carp and hemorrhagic septicemia virus of salmon fishes and development of methodical study guides of questions of a pathology and immunology of fishes is shined.

УДК 612.017.1

ЭВОЛЮЦИОННОЕ РАЗВИТИЕ СУПЕРСЕМЕЙСТВА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

В. Г. Галактионов

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
117 334. Москва, ул. Вавилова, 26. E-mail: galakt@aha.ru*

В работе рассматриваются происхождение и эволюция системы специфического иммунного распознавания от беспозвоночных до высших позвоночных животных. Обсуждаются основные критерии включения макромолекул в суперсемейство иммуноглобулинов, а также генная организация и распространенность членов суперсемейства иммуноглобулинов в царстве животных. Рассматривается значение «избыточного» пула иммунологической специфичности в жизни вида.

ВВЕДЕНИЕ

Среди проблем общей иммунологии изучение вопроса о происхождении системы специфического иммунного распознавания занимает центральное место. Решение данной проблемы прямо зависит от понимания эволюционного развития всего суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). Накопленный в последнее время материал ясно демонстрирует особую роль хрящевых рыб в решении поставленных вопросов как того класса животных, у которого впервые в эволюции возникает способность к специфической форме иммунного ответа, реорганизации генов для антигенраспознающих рецепторов.

Изучение последовательности аминокислотных остатков тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов позволило установить наличие в структуре молекулы гомологичных друг другу участков. Каждый такой участок имеет внутрицепевую дисульфидную связь, которая стабилизирует его конформацию. Гомологичные друг другу последовательности в структуре иммуноглобулинов стали называть *доменами*.

Всестороннее изучение особенностей организации белков, принимающих участие в различных иммунологических процессах, позволило установить, что среди них имеется значительное количество таких, которые по основным структурным требованиям (гомологии иммуноглобулинам и доменной организации полипептида) могут быть объединены в единую молекулярную систему. В нее включены молекулы Т-клеточного антигенраспознающего комплекса, молекулы I и II классов МНС, корцепторы Т-клеток CD4 и CD8, однодоменные белки – Thy-1, β_2 -м, P₀. Значительное место здесь занимают адгезины и рецепторные молекулы, способствующие контактному взаимодействию иммунокомпетентных клеток или адсорбции различных классов иммуноглобулинов на клеточной поверхности. Вся эта группа близкородственных белков составляет единое *суперсемейство иммуноглобулинов*. О выраженном представительстве иммуноглобулинподобных белков в организме говорит тот факт, что среди около 200 CD-антигенов млекопитающих более 30% относится к этому молекулярному объединению. Более того, на лимфоидных клетках одна треть поверхностных молекул – это члены суперсемейства иммуноглобулинов.

При рассмотрении вопроса об эволюции суперсемейства необходимо обратить внимание на следующее. Во-первых, в основе возникновения всего суперсемейства лежали гены, контролировавшие однодоменные белки; обычные генетические процессы в зародышевых линиях развития: случайные мутации, тандемные дубликации, транслокации, делеции и конверсии, продолженные во времени, дали то разнообразие членов суперсемейства, которое мы имеем сегодня. Во-вторых, необходимо, если не решить, то по крайней мере найти подходы к решению вопроса об эволюционном возникновении способности к специфическому иммунному распознаванию антигенной чужеродности (“не своего”). Иначе – к пониманию движущих сил возникновения специфического иммунитета, определению грани, когда неспецифические лигандные отношения перешли в специфическое взаимодействие [1 – 3, 10, 29].

1. ОСНОВНЫЕ КРИТЕРИИ ВКЛЮЧЕНИЯ МОЛЕКУЛ В СУПЕРСЕМЕЙСТВО ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Основными критериями включения белков в суперсемейство являются определенная пространственная организация молекул и статистически достоверная гомология с из-

вестными иммуноглобулинами. Каждый домен, входящий в состав иммуноглобулина, представляет собой двухслойное молекулярное образование, построенное по принципу нескольких антипараллельных β -структур, стабилизированных $-s-s-$ связями. В результате образуется молекулярная, конформационная структура, свойственная только членам суперсемейства иммуноглобулинов. В англоязычной литературе она получила обозначение Ig-fold (иммуноглобулиновая складчатость). Всего выделяют четыре основных типа доменов: V1, V2, C1 и C2. V-домен имеет четыре β -структуры в каждом слое и один дополнительный β -сегмент (C''), соединяющий два молекулярных β -слоя. 65-75 аминокислотных остатков домена данного типа составляют участок полипептидной цепи, ограниченной цистеиновым мостиком. У C-доменов отсутствует петля между C' и C''. У C2-домена отсутствует C'' структура. В связи с этим C2-домен имеет более короткую полипептидную цепь по сравнению с C1. Число аминокислотных остатков у C-доменов, ограниченных цистеиновой связью, меньше, чем у V-доменов, и равно 55-60.

Таким образом, для включения анализируемого домена в состав суперсемейства необходимо установить сходство его пространственной организации с V- или C-доменами иммуноглобулинов.

Вторым критерием для включения анализируемых доменов и построенных из них белков в состав суперсемейства служит гомологичность их аминокислотной последовательности доменам иммуноглобулинов. V-домены подразделяют на "классическую" форму организации, контролируруемую V-геном и J-сегментом, отделенным от V-гена интронной частью, и дополнительную V2-группу, контролируемую только V-геном. Участие J-сегмента существенно в формировании разнообразия V-доменов в их CDR3-регионе (третьем гипервариабельном участке) через процесс рекомбинации. Основная V1-группа состоит из вариабельных доменов изо типов иммуноглобулинов (Ig) и антигенраспознающих T-клеточных рецепторов (ТКР). При этом такие белки суперсемейства, как корецепторы T-клеток - CD4 и CD8, polyIgR (рецептор к различным изотипам Ig), SEA (адгезия клеток эпителия), MRC OX-2 (маркер T-лимфоцитов), LINK (белок сцепления млекопитающих), NITR (новый рецептор иммунного типа костистых рыб) имеют в своей структуре V2-домены.

C1-группа объединяет домены константной части иммуноглобулинов, C-домены T-клеточного рецептора и молекул I и II классов МНС. К этой же группе относится однодоменный белок β_2 -м - один из предковых белков всего суперсемейства. В C2-группу входят домены полипептидов с адгезивными и рецепторными свойствами. Среди членов суперсемейства они занимают доминирующее положение.

2. ГЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ЧЛЕНОВ СУПЕРСЕМЕЙСТВА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ (IGSF) В ЦАРСТВЕ ЖИВОТНЫХ

Использование метода клонирования кДНК выявило крайне широкое представительство в мире животных генов и контролируемых ими белков, относящихся к IgSF. Состав членов IgSF выглядит следующим образом.

У прокариот (грам-отрицательных бактерий *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*) Ig-fold структурой характеризуются шапероны, принимающие участие в построении пилей адгезии. Кроме того, бактерии имеют участки в структуре некоторых белков, соответствующие иммуноглобулиновым доменам [5, 11].

Белки P_0 и Thy-1, входящие в одну и ту же V2-группу, также являются наиболее ранними эволюционными образованиями, т.к. представляют собой однодоменные белки, не связанные на клеточной поверхности с какими-либо другими белками (Табл. 1). При этом ген, контролирующий синтез P_0 , имеет в средней части интрон. Это обстоятельство позволяет предположить его происхождение от гена для полудоменного пептида, составляющего один из β -структурных слоев в современных доменах IgSF.

В результате тандемной дубликации гена для наиболее раннего полудоменного предшественника сформировался P_0 -подобный белок. Прошедшая делеция интронной части гена P_0 обеспечила возникновение гена-предшественника для антигена Thy-1.

Полипептиды, серологически родственные белку Thy-1 млекопитающих, обнаружены у птиц, рептилий, рыб, дождевых червей, туникат, головоногих и брюхоногих моллюсков, одноклеточных эукариот, прокариот.

Функциональное предназначение антигена Thy-1 точно не определено. Возможно крайне раннее его появление в филогенезе связано с процессом возникновения многоклеточных, когда он выступал в качестве одного из поверхнос-

тных молекулярных факторов межклеточной адгезии, используя механизм гомофильного межклеточного взаимодействия, т. е. контактного взаимодействия "своего" со "своим" [4]. Гену Thy-1 сопутствовал явный эволюционный успех. Именно ему суждено было стать прародителем V-генов всего IgSF. Распространенность V-генов в суперсемействе обеспечивалась обычными генетическими процессами: тандемными дупликациями, транслокациями, делециями, точечными мутациями, реорганизацией генных сегментов для V-доменов ТКР и иммуноглобулинов.

Примером наиболее раннего тандемного события в исторической ретроспективе являются гены, контролирующие два белка суперсемейства: SAM (адгезивная молекула губок) и RTK (рецепторная тирозин киназа) у наиболее примитивного многоклеточного – губки *Geodia cydonium* (табл. 1). Эти белки имеют два поверхностных V-домена, трансмембранный и хвостовой участки. Изучение нуклеотидной и аминокислотной последовательностей RTK выявило, что первый V-подобный домен наиболее близок к V_λ, второй – к V_η человека. Известно около 40 полигенных копий данного белка. Экспрессия RTK повышается при ауто- и аллотрансплантации. Все эти факты крайне важны для понимания уровня возникновения первых признаков специфического иммунитета в мире животных.

Другой белок SAM при наличии тех же самых двух внеклеточных V-подобных доменов обладает разными по длине хвостовыми регионами. При аутотрансплантации значительно увеличивается экспрессия белка с длинным хвостовым регионом, включающим мотив, который обеспечивает через каскад тирозинкиназ клеточную активацию. Вариант SAM с коротким хвостовым регионом, ингибирующим активацию клеток, также увеличивает свою экспрессию, хотя и в меньшей степени. Авторы этой серии исследований (руководитель работ Muller W.E. Mainz Universitat, Germany) предполагают, что губки уже имеют как признаки неспецифического иммунитета с активностью, аналогичной KIR-рецепторам у млекопитающих и других позвоночных животных, так и первыми признаками адаптивного иммунитета, проявляющегося при аллотрансплантации [6, 16, 18, 19, 26].

К категории белков, контролируемых двумя V-подобными генами, относится также DTRK (рецепторная тирозин киназа дрозофилы). Экспрессия DTRK-генов связана с эмбриональным развитием нервной системы у данного вида.

Одно из свойств соответствующего белка, крайне важного для темы, поднятой здесь, - это его способность к гомофильному взаимодействию [20].

Таблица 1

V-домены в составе иммуноглобулинподобных белков у представителей различных систематических групп

Молекулярная формула и обозначение белков	Таксономическая группа
1. V2 (Thy-1, B-G, P ₀ , CD8, CTLA 4)	Thy-1 – широкое представительство в мире животных от одноклеточных простейших до высших позвоночных животных B-G – птицы P ₀ , CD8, CTLA 4 – млекопитающие
2. V2-V2 (SAM, RTK, DTRK)	SAM, RTK – губки (<i>Geodia cydonium</i>) DTRK – насекомые (<i>Drosophila melanogaster</i>)
3. V2-C2 (CTX, ChT1, CTM, CTH; A33, CD2, MRC OX2, CD80, CD86, CD58, hCAR)	CTX – амфибии (<i>Xenopus</i>) ChT1 – птицы CTM – мыши CTH – человек CD2, MRC OX2, CD80, CD86, CD58, hCAR, A33 – млекопитающие
4. V2-C2-C2 (амальгам, латесин, тактил)	амальгам, латесин – насекомые (<i>Drosophila</i>) тактил – млекопитающие
5. V2-C2-C2-C2-C2-C2 (CEA)	Млекопитающие
6. V2-V2-V2-V2-C2 (поли-IgR)	Млекопитающие
7. V2-V2/C2 (NTR)	Костистые рыбы (собака-рыба, зебра-рыба)
8. V1-C1-C1-C1-C1 (NAR)	Хрящевые рыбы (рогатая акула)
9. (V1-D-J-C1) _n кластеры (IgH, ТКР)	Хрящевые рыбы (акула-нянька, др.)
10. V1 _n —D _n —J _n —C1 _n (IgH, ТКР)	Челюстноротые позвоночные животные

Примечания: SAM – адгезивная молекула губок, RTK – рецепторная тирозин киназа, DTRK – рецепторная тирозин киназа дрозофилы, CTX, ChT1, CTM, CTH – молекулы кортикальных тимоцитов шпорцевой лягушки, курицы, мыши, человека, A33, hCAR – молекулы человека, CEA – антиген клеток эпителия, NTR – новый рецептор иммунного типа, NAR – новый антигенный рецептор, IgH – H-цепь иммуноглобулина (остальные сокращения см. в табл. 1).

Процесс тандемных дупликаций – увеличение числа копий исходного, предкового локуса, известен и для C2-генов (табл. 2). Предковый C2-ген дал набор повторяющихся гомологичных генов, которые контролируют белки с адгезивными и антибактериальными свойствами в различных систематических группах. Существенными в этой C2-группе являются двух-, трехдоменные белки KIR – рецепторы, ингибирующие активность натуральных киллеров. Эволюционно они возникли давно. KIR-рецепторы известны у дождевых червей, моллюсков (Franceschi *et al.*, 1991). Взаимо-

действие KIR с молекулами I класса MHC говорит о переходе гомофильных форм клеточного взаимодействия к гетерофильному рецепторному взаимодействию. К этой же C2-группе относятся индуцибельные антибактериальные факторы беспозвоночных: гемолин (P4) насекомых [28] и MDM (защитная молекула моллюсков) [12].

Второй важный генетический процесс, имевший место при формировании Ig-подобных локусов, связан с явлениями транслокации генетического материала. Действительно, члены IgSF, имеющие V2-C2- и V1-C1-комбинации доменов, могли образоваться в результате перемещения в составе транслокона гена С в участок хромосомы, занятый геном V (или наоборот). Наличие некодируемого (подчас очень значительного) разрыва между V- и С-генами говорит о такой возможности. В таблице 1 представлены члены IgSF, имеющие V2-C2-комбинации генетического материала разной степени сложности.

Наиболее просто организованы локусы для СТХ (рецептор кортикальных тимоцитов *Xenopus*), СТН (рецептор кортикальных тимоцитов человека) и других двухдоменных белков (табл. 1, строка 3). СТХ шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* представляет собой димерный белок с мол. весом 55 кД. Каждая цепь состоит из одного V2- и одного C2-домена, трансмембранного региона и достаточно длинного цитоплазматического хвоста (70 аминокислотных остатков), обладающего активирующим мотивом. Этот последний факт говорит о способности данного рецептора активировать клетки после взаимодействия с лигандом. V2-домен СТХ кодируется не реорганизуемым геном, характерной особенностью которого является наличие интронной части между двумя экзонами. Аналогично построен ген и для C2-домена. Наличие интронного разрыва у V-гена, подобного таковому у гена для Р-белка, говорит о древности его происхождения [7 - 9, 23, 24]. Гены, высоко гомологичные СТХ и с тем же типом организации, обнаружены также у кур (ChT1), мышей (СТМ), человека (СТН) (Du Pasquier and Flajnik, 1998). Консерватизм V2-C2-генов в эволюционной линии позвоночных с учетом особенностей их построения говорит о древности происхождения всей генетической конструкции V2-C2.

Процесс tandemных дубликаций касался не только отдельных С- и V-генов, но и их сочетания — генных блоков V-C и в том числе тех, которые усложнены включением D- и J-сегментов: (V-D-J-C) или (V-J-C). В результате сформирова-

ровался кластерный тип контроля за специфичностью антигенраспознающих молекул: ТКР и иммуноглобулинов (Табл. 1, строка 9) [14, 15, 21, 22]. У акулы-няньки таких кластеров для Н-цепи IgM – более 200. Процесс увеличения количества кластеров явно находился под давлением положительного отбора, расширяя возможности организма в защите от патогенов, нейтрализации “не своего”. Однако подобный тип генетической организации в работе иммунной системы имел определенные пределы, связанные с величиной генома, невозможностью все увеличивающегося наращивания локусов кластерного типа организации. Природа “придумала” иной путь обеспечения выраженного многообразия иммуноглобулинов – путь рекомбинаций, когда специфичность ТКР и иммуноглобулинов создается в результате случайного сочетания V-, D-, J-генных сегментов при участии RAG1/RAG2. Рубежом в данном случае являются очевидно хрящевые рыбы. Именно у представителей этого класса имеются локусы как со слитым VJ-геном (V2), так и разделенным, подверженным рекомбинациям V-(D)-J [13, 21].

Таблица 2

Иммуноглобулинподобные белки, включающие
только C2-домены

Молекулярная формула и обозначение белков	Таксономическая группа
C2 (CD3 гбс)	CD3 _{гбс} - челюстноротые позвоночные животные (от хрящевых рыб до млекопитающих)
C2-C2 (или C2-C2-C2) (KIR, Fcr2b/r1R)	KIR - беспозвоночные (функ.), позвоночные Fcr2b/r1R - млекопитающие
C2-C2-C2-C2 (гемолин)	Насекомые
C2-C2-C2-C2-C2 (MDM, MAG, NCAM, CSF1R, 61B)	MDM - моллюски MAG, NCAM, CSF1R, 61B - млекопитающие

Примечание: KIR – ингибирующий рецептор киллеров, MDM – защитная молекула моллюсков (остальные сокращения см. в табл. 1).

Особое место среди членов суперсемейства занимает Ig-подобный белок N1TR (новый рецептор иммунного типа). Белок обнаружен у костистых рыб: собаки-рыбы (*Spheroides nephelus*) и рыбы-зебры (*Danio rerio*). Он имеет нереорганизуемый V2-домен и домен, обладающий сходством как с V2-, так и C2-доменами (V2/C2), трансмембранный и хвостовой регионы (Табл. 1, строка 7). Существенными особенностями этого нового рецептора являются по крайней мере

два свойства. Это – наличие в хвостовом, цитоплазматическом регионе последовательности (ингибирующего мотива), блокирующей активацию клетки после взаимодействия рецептора с лигандом. Таким свойством обладает, например, KIR-рецептор натуральных киллеров (НК-клеток) у млекопитающих и других позвоночных. Как уже отмечалось, он препятствует НК-клеткам оказывать цитотоксическое действие на собственные клетки организма. KIR, относящийся к IgSF, состоит из двух или трех C2-доменов. V-домены у него отсутствуют.

Второе существенное свойство NITR – это наличие в его структуре нереорганизуемого V2-домена. При этом CDR1 (первый гипервариабильный) и CDR2 (второй гипервариабильный регионы) в семействе NITR-генов конституционно изменчивы, т.е. представлены несколькими десятками копий, и их вариабильность, собственно, и обеспечивает набор разных по специфичности NITR. У собаки-рыбы самостоятельных по специфичности NITR – 26; у рыбы-зебры – 40. Гены, контролирующие эти белки, образуют в хромосомах единые кластеры, включающие, соответственно, 26 и 40 самостоятельных локусов.

Таким образом, NITR представляет собой промежуточную форму между белками неспецифического ответа (например, KIR) и белками специфического иммунного реагирования (антигенраспознающими рецепторами Ig и ТКР) с нереорганизуемыми генами для V-доменов [27].

Бесспорный интерес вызывают результаты изучения нового антигенного рецептора NAR у акулы-няньки (*Ginglymostoma cirratum*). Данный белок гомодимер, каждая H-цепь которого состоит из одного V1-домена, пяти C1-доменов, трансмембранного и хвостового участков; L-цепи отсутствуют (Рис. 3, строка 8), подобно одному из подклассов IgG верблюда и ламы.

NAR, имея трансмембранный и хвостовой участки, напоминает по этим свойствам классическую форму иммуноглобулинов. Пространственная организация V-домена этого белка соответствует прототипу доменов IgSF. При этом он достаточно уникален по таким признакам, как исключительно малые размеры второго гипервариабильного региона (CDR2) и недостаточный консерватизм по тем остаткам, которые ответственны за V_H/V_L и V_C/V_F взаимодействия при формировании антигенраспознающего участка классических иммуноглобулинов и ТКР. Наиболее существенная характеристика заключается в способности распознавать антиген

посредством одного домена, а не двух, как это имеет место у Ig и ТКР. При этом V-домен NAR относится к реорганизуемым доменам (V1) суперсемейства. Аминокислотная и нуклеотидная последовательности определяют промежуточное положение V-домена NAR между ТКР и Ig. Все эти признаки заставляют предполагать, что V-домен вновь открытого рецептора вероятный, наиболее близкий предшественник V-доменов Ig и ТКР [25].

В целом по данным, представленным в этом разделе, общая картина генетической организации и распространенности в природе членов IgSF выглядит следующим образом (Табл. 3).

Таблица 3

Антигенраспознающие рецепторы и иммуноглобулинподобные белки с гомофильной и гетерофильной формами взаимодействия в различных систематических группах

Молекулярная формула	Обозначение	Таксономическая группа	Взаимодействие с лигандом
V2	Thy-1, P ₀	От одноклеточных до многоклеточных Губки	Гомофильное
V2-V2	RTK, SAM	Насекомые	Гомофильное
V2-V2	DTRK	Костистые рыбы	Гомофильное
V2-V2/C2	NTR	Хрящевые рыбы	Гетерофильное
V1-C1-C1-C1-C1-C1	NAR	Хрящевые рыбы	Гетерофильное
(V1-D-J-C1) _n	Ig, ТКР		Гетерофильное
V1 _n -D _n -J _n -C1 _n	Ig, ТКР	Челюстноротые позвоночные	Гетерофильное

Молекулярная структура Jg-fold (иммуноглобулиновая складчатость) является определяющей характеристикой доменов, из которых построены члены IgSF. Ig-подобный домен обнаружен уже у наиболее примитивных форм жизни, каковыми являются прокариоты. У них они выполняют функцию шаперонов — одного из важнейших факторов в конформационной упаковке белка.

В связи с чем и когда возникла дивергенция на V- и C-домены не ясно. Вероятно, произошло это событие еще до появления многоклеточных животных, около 2 млрд лет т.н. Присутствие V- и C-гомологов (Thy-1 и β₂-м, соответственно) у прокариот и одноклеточных эукариот подтверждает это предположение.

Оказавшись селективно успешными, V- и C-гены широко

распространились в мире животных. При этом экспансия Ig-подобных генов сопровождалась параллельными процессами геномного усложнения. Известная сегодня структура генных локусов, контролирующих антигенные рецепторы (ТКР, Ig) и Ig-подобные белки у представителей различных таксономических групп, возникла в результате обычных генетических событий: дупликаций, транслокаций, делеций, мутаций, возникновения D- и J-генных сегментов, контролем процесса рекомбинации со стороны ферментов RAG1/2. Не во всех случаях возникающие Ig-подобные белки выполняли и выполняют функцию иммунологической защиты.

Если одни из них обеспечивают неспецифическую антибактериальную защиту (гемолин насекомых, MDM моллюсков) [12, 28], то другие проявляют себя в процессах ткане-генеза (DTRK насекомых) [20] или участвуют в построении матрикса (пероксидазин насекомых) [17].

Особое место занимают потомки предковых Ig-подобных генов, ответственных за синтез антигенраспознающих рецепторов (ТКР и Ig). В этом случае три формы организации Ig-генов ясно указывает на определенное давление отбора в исторической ретроспективе при формировании таких рецепторов. Вероятный путь развития состоял из возникновения дублированного V-локуса губок, промежуточного V-V/C2-локуса, открытого у костистых рыб, кластерного типа организации Ig-генов акул (все эти локусы представлены множеством копий), NAR-белка акул (проброзда ТКР и Ig) и, наконец, рекомбинационного типа V(D)J построения специфичности с подключением в процесс реорганизации RAG1/2.

Явный эволюционный успех генов для ТКР и Ig ставит вопрос о происхождении собственно иммунологической специфичности.

3. ПРОИСХОЖДЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ

Вопрос о происхождении иммунологической специфичности – способности нейтрализовать “не свое”, - один из самых трудных и нерешенных до сих пор.

Попытки представить какие-либо формализованные схемы возникновения иммунологической, антигенраспознающей специфичности строятся в основном на представлениях о переходе гомофильных взаимодействий адгезивных белков к гетерофильным межмолекулярным отношениям по прин-

ципу рецептор:лиганд. Перечисление некоторых Ig-подобных белков с двумя формами взаимодействия представлены в таблице 2.

Данные о шаперонах прокариот (бактериальных клеток), имеющих Ig-fold строение, наличие адгезивных белков SAP и RTK у губок, DTRK у дрозифилы, построенных из V2 Ig-подобных доменов, гомодимерного иммуноглобулина NAR хрящевых рыб и, наконец, зрелых ТКР и Ig челюстноротых позвоночных животных позволяют выстроить гипотетическую линию возникновения и развития антигенраспознающих рецепторов позвоночных животных.

По самой своей природе шапероны, принимающие участие в формировании третичной структуры белков, действуют в определенных пределах конформационной специфичности. Шапероны *Escherichia coli* и других грам-отрицательных бактерий, имеющие Ig-fold структуру, могут быть реальными претендентами на роль наиболее ранних предшественников той линии развития, которая привела к созданию антигенраспознающих структур, контролируемых реорганизуемыми V-генами. Вероятными, наиболее прямыми потомками Ig-fold шаперонов явились Thy-1, P₀, построенные из V2-доменов.

Уже у губок, лежащих в основе филогенеза первично- и вторичноротых животных, имеются белки SAM и RTK с двумя V-подобными доменами. Наличие у этих белков полигенных форм (около 40 копий) говорит об их селективном успехе. Кроме того, при ауто- и аллотрансплантации экспрессия этих белков значительно увеличивается, что говорит об их функциональной активности.

Рубежом в череде рассматриваемых белков является гомодимер NAR – новый адгезивный рецептор акул, каждая цепь которого состоит из одного реорганизуемого V-домена, и пяти C1-доменов. Данный белок выступает в качестве вероятного, наиболее прямого предшественника антигенраспознающих рецепторов ТКР и Ig челюстноротых позвоночных животных. Об этом говорят следующие факты: структура V-домена NAR занимает промежуточное положение по отношению к V-доменам ТКР и Ig, он контролируется реорганизуемым геном, в состав белка входят C1-домены, никогда не ассоциирующиеся с не реорганизуемыми V2- доменами. Более того, гены для V- и C-доменов объединены в несколько (около 10) известных на сегодня кластеров. Собственно кластерный тип организации представляют собой предковую форму генетического контроля ТКР и Ig более

высоко организованных позвоночных животных.

При анализе представленного здесь филогенетического ряда необходимо ответить на некоторые, не вдруг решаемые вопросы. И первый из них: с чем связан переход от гомофильных форм взаимодействия к гетерофильным, что было побуждающим моментом такого перехода и что явилось фактором или факторами отбора, которые привели к созданию столь уникальной системы распознавания в виде клоно- и антигенспецифических ТКР и Ig.

Подобная постановка вопроса требует освещения двух моментов, определивших столь выраженное разнообразие антигенраспознающих рецепторов. Это – роль мутаций и рекомбинаций для V-генов в процессе становления антигенной специфичности.

Первым и наиболее важным событием было эволюционное возникновение Ig-fold доменов, подобных тем, какие известны для шаперонов современных прокариот. Особенностью таких доменов, сыгравших столь значимую роль в эволюции антигенраспознающих рецепторов, являются аминокислотные петли, соединяющие β -структурные последовательности. Именно эти петли (будущие гипервариабельные участки ТКР и Ig) подвергались повышенным аминокислотным заменам, поставляя таким образом сырой материал для действия отбора в виде структурно меняющихся V-доменов.

Первоначальная функция таких доменов - участие в межклеточных гомофильных взаимодействиях. Эту роль в эволюционном развитии могли выполнять предшественники однодоменных, а затем и двухдоменных V-подобных белков Thy-1, P₀, SAP, RTK, DTRK. Их появление в эволюции не случайно. Они стояли у истоков возникновения многоклеточных, обеспечивая межклеточную адгезию посредством гомофильного взаимодействия.

При этом первичные многоклеточные животные (впрочем, как и современные), находясь в тех или иных биотических условиях, неизбежно подвергались агрессии патогенов внешней среды от вирусов до тех же паразитических многоклеточных. В самом этом явлении нет ничего неожиданного, и современная жизнь различных видов животных дает тому бесчисленное множество примеров. Важно другое. Первичные V-гены, обладая повышенной мутабельностью, обеспечивали синтез варьирующих по специфичности V-доменов, некоторые из которых случайным образом взаимодействовали с лигандами патогенов. Если при таком

взаимодействии снижалось патогенетическое действие внешнего агента, повышалась устойчивость особей вида, то ген, контролирующий измененный домен, подвергался сильному давлению отбора и закреплялся в популяции вида. На этом уровне отношений между первичными многоклеточными и патогенами произошло переключение гомофильного взаимодействия на гетерофильное. При этом исходный V-ген оставался для выполнения своей основной функции. Примером тому служат однодоменные белки Thy-1, P₀ и др. Процесс накопления мутационно измененных V-генов, продолженный во времени, приводил в результате ко все большему накоплению таких генов. Выявленная полигенность V-генов у современных челюстноротых позвоночных животных тому прямое подтверждение.

Короче, при эволюционном развитии многоклеточных произошла смена функций на молекулярном уровне – переход от гомофильного межклеточного взаимодействия к гетерофильному взаимодействию для распознавания чужеродности.

В связи с рассматриваемой проблемой невольно возникает вопрос о неизбежности возникновения таких мутационных изменений, которые приводили бы к синтезу V-доменов с аутоиммунной активностью. Ясно, что подобные мутации без тех селективных внутритимусных процессов, которыми обладают позвоночные животные, приводили бы к гибели носителей таких генов и, следовательно, к невозможности их закрепления в популяциях вида.

Второй момент рассматриваемой проблемы связан с RAG-1 и RAG-2. Процесс накопления меняющихся V-генов через tandemные дубликации и случайные мутации был столь значим для выживания вида, что природа “побеспокоилась” об усилении возможного разнообразия V-доменов. На этом пути эволюционного преобразования в работу вступают RAG-1 и -2, контролирующие процесс рекомбинации V, D, J-сегментов как Ig, так и ТКР.

Предполагается, что первоначально RAG в составе ретровируса интродуцировался в ту часть генома предковых позвоночных животных, которая была занята единым V-геном. Подобное событие привело к расщеплению V-гена на собственно V-ген и D- и J-сегменты. Геномные участки (V,D,J), оказавшись самостоятельными, подвергались обычным генетическим процессам – в первую очередь tandemным дубликациям и случайным мутациям. Результатом таких процессов явилось накопление множества V-генов (у млекопитающих их более 500).

Вторая важная функция RAG состоит в обеспечении синтеза рекомбиназ – ферментов, принимающих участие в процессе реорганизации V-,D-,J-генов. Случайность объединения данных сегментов при участии RAG определяет множественность синтезируемых V-доменов. Для H-цепей Ig только за счет рекомбинации образуется около 1.2×10^5 вариантов. Ясно, что появление в эволюции механизма рекомбинации V-генов было прогрессивным событием. Однако, как и в случаях с теми событиями, которые обеспечивали вариабильность Ig-подобных структур только за счет мутаций, был необходим биологический механизм, препятствующий появлению ауторецепторов, направленных против антигенов собственного организма. Такой механизм появился в виде отрицательной селекции аутоклонов на территории тимуса и костного мозга. Не случайно процессы рекомбинации эволюционно сопряжены с возникновением функционально активного тимуса, что и наблюдается у хрящевых рыб. Короче, без появления тимуса невозможно было ожидать формирования рекомбинационных процессов для V-доменов.

Неоднократно поднимался вопрос: зачем конкретному индивидууму такой большой запас реорганизуемых V-генов, если в жизни он встречается с ограниченным числом антигенов, и большинство V-генов оказывается “бесполезным”. Ответ на этот вопрос лежит в двух плоскостях. Во-первых, мы ничего не знаем о том, с каким истинным многообразием антигенов входит в контакт конкретный организм в течение жизни. Помимо традиционных бактериальных, вирусных, грибковых антигенов, возможны антигенные нагрузки, связанные с мутационно измененными собственными клетками. Во-вторых, для жизнедеятельности вида, его стабильности не столь важно, проявляется ли нет тот или иной признак у конкретной особи, но существенно присутствие генов, контролирующих этот признак, если он имеет адаптационное значение, в популяции вида. Такие гены через механизм панмиксического скрещивания являются достоянием всей популяции, входят в состав ее генофонда.

Эти общие положения, сформулированные при анализе процесса видообразования, самым тесным образом связаны с пониманием значения “избыточного” пула иммунологической специфичности для жизни вида. Невостребованные антигенраспознающие рецепторы или антитела у какой-либо особи вида в течение ее индивидуальной жизни могут оказаться необходимыми для другой особи данной популяции

или для особей других генераций той же популяции. В целом тот уровень специфичностей антигенраспознающих рецепторов и антител, который имеется у высших позвоночных животных, создает необходимый запас прочности для стабильной жизнедеятельности вида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Случайные мутации и отбор как определяющие факторы в эволюции антигенраспознающих рецепторов были сопряжены с рядом явлений.

- 1) Самостоятельное развитие генов для С-доменов.
- 2) Их объединения с V-генами в единый локус за счет транслокационных событий.
- 3) Накопление посредством тандемных дупликаций копий как собственно V-генов, так и V-C-локусов.
- 4) Формирование кластерного типа наследования ТКР и Ig, появление дополнительных D- и J-генных сегментов,
- 5) Переход от мономерных Ig-подобных молекул к димерным, что увеличивало эффективность лиганд-рецепторных взаимодействий.
- 6) Смена кластерного типа наследования на рекомбинационный с включение в процесс рекомбинации RAG-1 и RAG-2 генов, значительно увеличивших разнообразие антигенраспознающих рецепторов.

Все эти процессы были крайне важны для формирования молекулярной системы антигенного распознавания, окончательный вариант которой представлен у млекопитающих. При этом следует еще раз подчеркнуть, что ведущими, определяющими событиями в этих процессах были мутационные изменения V-генов, их отбор под давлением антигенно чужеродных соединений, а также формирование рекомбинационного механизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Галактионов В.Г.* Эволюция суперсемейства иммуноглобулинов. // Усп. соврем. биологии. 1992. Т. 112. С. 29-43.
2. *Галактионов В.Г.* Очерки эволюционной иммунологии. М.: Наука. 1995. С. 256.
3. *Фонталин Л.Н.* Происхождение антигенраспознающей иммунной системы позвоночных. 1. Молекулярно-биологические и иммунологические аспекты. // Иммунология. 2000. Т. 3. С. 3-14.
4. *Barclay A.N.* Ig-like domains: Evolution from simple interaction

molecules to sophisticated antigen recognition. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96, P. 14672-14674.

5. Bateman A., Eddy S.R., Chothia C. Members of the immunoglobulin superfamily in bacteria. // Protein Sci. 1996. V. 5. P. 1939-1941.

6. Blumbach B., Diehl-Seifert B., Seach J. et al. Cloning and expression of new receptors belonging to the immunoglobulin superfamily from the marine sponge *Geodia cydonium*. // Immunogenetics. 1999. V. 49. P. 751-763.

7. Chretien I., Marcuz A., Courtet M. et al. CTX, a *Xenopus* thymocyte receptor, defines a molecular family conserved throughout vertebrates. // Eur. J. Immunol. 1998. V. 28. P. 4094-4104.

8. Chretien I., Robert J., Marcuz A. et al. CTX, novel molecule specifically expressed on the surface of cortical thymocytes in *Xenopus*. // Eur. J. Immunol. 1996. V. 26. P. 780-791.

9. Du Pasquier L., Courtet M., Chretien I. Duplication and MHC linkage of the CTX family of genes in *Xenopus* and in mammals. // Eur. J. Immunol. 1999. V. 29. P. 1729-1739.

10. Du Pasquier L., Flajnik M. Origin of Immunoglobulins and T-cell receptors. // Fundamental Immunology / Ed. Paul W., LWW, 1998. P. 191-195.

11. Holmgren A., Kueha M.J., Bstrand C.I. et al. Conserved immunoglobulin-like features in family of periplasmic pilus chaperones in bacteria. // EMBO J. 1992. V. 11. P. 1617-1622.

12. Hoek R/M., Smit A.B. et al., Frings H. A new Ig-superfamily member, molluscan defence molecule (MDM). // Eur. J. Immunol. 1996. V. 26. P. 939-944.

13. Lee S.S., Fitch D., Flajnik M.F. et al. Rearrangement of immunoglobulin genes in shark germ cells. // J. Exp. Med. 2000. V. 191. P. 1637-1648.

14. Litman G., Anderson M.K., Rast J.P. et al. Evolution of antigen binding receptors. // Ann. Rev. Immunol. 1999. V. 17. P. 109-147.

15. Marchalonis J.J., Schluter S.F., Bernstein R.M. et al. Antibodies of sharks: revolution and evolution. // Immunol. Rev. 1998. V. 166. P. 103-122.

16. Muller W.E., Skorokhod A. Receptor tyrosine kinase, an autapomorphic character of metazoa: identification in marine sponges. // Acta Biol. Hung. 1999. V. 50. P. 395-411.

17. Nelson R.E., Fessler L.I., Takagi Y. et al. Peroxidase a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. // EMBO J. 1994. V. 13. P. 3438-3447.

18. Pancer Z., Kruse M., Schacke H. et al. Polymorphism in the immunoglobulin-like domains of the receptor tyrosine kinase. // Cell Adhes Commun. 1996. V. 4. P. 327-339.

19. Pancer Z., Skorokhod A., Blumbach B. et al. Multiple Ig-like featuring genes divergent of the sponge. // Gene. 1998. V. 207. P. 227-233.

20. Pulido D., Campuzano S., Koda T. et al. Dtrk, a *Drosophila*

gene related to the tkr family of neurotrophin receptors, encodes a novel class of neural cell adhesion molecule. // *EMBO J.* 1992. V. 11. P. 391-404.

21. *Rast J.P., Anderson M., Litman G.W.* The structure and organization of immunoglobulin genes in lower vertebrates. // *Immunoglobulin Genes.* Acad. Press Lim. 1995. P. 315-341.

22. *Rast J.P., Litman G.W.* Towards understanding the evolutionary origins and early diversification of rearranging antigen receptors. // *Immunol. Rev.* 1998, V. 166. P. 79-86.

23. *Robert J., Cohen N.* Ontogeny of CTX expression in *Xenopus*. // *Dev. Comp. Immunol.* 1998. V. 22. P. 605-612.

24. *Robert J., Sung M., Cohen N.* In vitro thymocyte differentiation in MHC class I-negative *Xenopus* larvae. // *Dev. Comp. Immunol.* 2001. V. 25. P. 323-336.

25. *Roux K.H., Greenberg A.S., Greene L. et al.* Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR). // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 11804-11809.

26. *Schutze J., Shorokhod A., Muller I.M. et al.* Molecular evolution of the metazoan extracellular matrix. // *J. Mol. Evol.* 2001. V. 53. P. 402-412.

27. *Strong S.J., Mueller M.G., Litman R.T. et al.* A novel multigene family encodes diversified variable regions. // *PNAS.* 1999. V. 96. P. 15080-15085.

28. *Sun S.C., Lindstrom I., Boman H.G. et al.* Hemolin: an insect-immune protein belonging to the immunoglobulin-superfamily. // *Science.* 1990. V. 21. P. 1729-1732.

29. *Williams F.F., Barclay A.N.* The immunoglobulin superfamily – domains for cell surface recognition. // *Ann. Rev. Immunol.* 1988. V. 6. P. 381-405.

EVOLUTIONARY DEVELOPMENT OF SUPERFAMILY IMMUNOGLOBULINOV

V.G.Galaktionov

Institute of biology of development by him(it). N.K.Kol'tsova RAS,

117 334. Moscow. E-mail: galakt@aha.ru

In work the origin and evolution of system of specific immune recognition from invertebrate up to the supreme vertebrate animals are considered. The basic criteria of inclusion of macromolecules in superfamily of immunoglobulins, and also the genic organization and prevalence of members of superfamily of immunoglobulins in an empire of animals are discussed. Value of abundant pool of immunological specificity in life of a kind is examined.

**ИММУННЫЙ СТАТУС ГИДРОБИОНТОВ БЕЛОГО
МОРЯ В НОРМЕ И ПРИ СТРЕССЕ**

**¹Кондратьева И.А., ²Киташов А.В., ²Киташова А.А.,
²Криксунов Е.А.**

*Московский государственный университет
им. М.В.Ломоносова,*

*¹Международный учебно-научный биотехнологический центр,
²Биологический факультет*

В статье рассматриваются изменения параметров иммунитета моллюсков и иглокожих, а также рыб при антигенном и паразитарном воздействии. Обсуждается роль биофильтрации у иммунизированных и интактных моллюсков в поглощении чужеродного материала. Указывается на большую чувствительность к загрязнителям у иглокожих по сравнению с моллюсками. Показано, что изменение условий окружающей среды, включая биологическое и химическое загрязнение, уменьшение аэрирования воды и повышение температуры, вызывают сходные защитные реакции.

ВВЕДЕНИЕ

В онтогенезе водных животных стратегия поддержания гомеостаза основана главным образом на врожденном иммунитете [6, 7, 11, 15, 21, 22, 34, 38, 39, 41]. Защитные реакции водных беспозвоночных осуществляются разнообразными клетками и гуморальными факторами. Клетки выполняют реакции фагоцитоза, лизиса, инкапсуляции и секреции гуморальных факторов. Гуморальные факторы — это различные бактерицидные, фунгицидные, антипротозойные и противовирусные вещества, содержащиеся в гемолимфе, межклеточной жидкости и секретах. К ним относятся лизоцим, лектины и антимикробные низкомолекулярные белки. Эти механизмы защиты и поддержания гомеостаза быстро активируются, длятся короткий промежуток времени и осуществляют своевременную защиту против микробной инфекции.

У мидий защитные функции обеспечиваются подвижными фагоцитирующими клетками (гемоцитами) и веществами, вырабатываемыми этими клетками. Гемоциты содержат мембранные рецепторы лектиновой природы и гранулы с лизирующими веществами [43], благодаря которым осуществляется распознавание и уничтожение прокариот. На взаимодействие с чужеродными объектами гемоциты от-

вещают продукцией активных форм кислорода [17] и синтезом и секрецией опсонинов, агглютининов, антимикробных пептидов и ферментов, которые предохраняют организм мидий от чужеродного воздействия [24, 25, 33; 39].

У иглокожих обнаружены клетки (амебоциты перивисцеральной жидкости и аксиального органа), поглощающие чужеродные вещества и синтезирующие гуморальные факторы (лектины и гемолизины; гомологи таких факторов позвоночных животных, как альфа-2-макроглобулин, С-реактивный белок, белки системы комплемента и цитокины) [23, 31]. Из перивисцеральной жидкости морских звезд выделены вещества, подавляющие *in vitro* у млекопитающих пролиферацию опухолевых клеток и активирующие систему комплемента, направленную на уничтожение бактерий [32, 35, 36].

У рыб, так же как и у млекопитающих, представлены и врожденная, и приобретенная составляющие иммунитета. Однако основные функции поддержания гомеостаза водных низших позвоночных животных опосредуются через реакции врожденного иммунитета, как у водных беспозвоночных. Это прежде всего синтез лизоцима, цитокинов, антимикробных пептидов, белков острой фазы воспаления, каскадные реакции системы комплемента. Врожденные иммунные реакции у рыб осуществляют макрофаги, гранулоциты и естественные киллерные клетки [19, 28, 30, 40, 42, 44]. Условия окружающей среды играют важную роль в регуляции функционирования иммунной системы рыб, не менее существенную, чем внутренние механизмы организма [5, 8, 18, 20].

С 1992 года на Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (ББС МГУ) в июле-августе в рамках научной программы учебно-производственной практики по сравнительной иммунологии студентов 3 курса кафедры клеточной физиологии и иммунологии (с 2002 года — кафедра физиологии микроорганизмов) биологического факультета и стажёров отделения клеточной инженерии и иммунологии Международного биотехнологического центра проводятся исследования показателей врожденного иммунитета у представителей массовых видов — мидии обыкновенной (*Mytilus edulis*), морской звезды (*Asterias rubens*), северной наваги (*Eleginus navaga*) и беломорской трески (*Gadus morhua maris-albi*). Целью работы было сравнительное изучение различных параметров животных в естественных (норма) и экспериментальных (стресс) условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

1. Половозрелые животные одинакового размера: мидия обыкновенная *Mytilus edulis*, класс Bivalvia; морская звезда *Asterias rubens*, класс Echinodermata; северная навага *Eleginus navaga* и беломорская треска *Gadus morhua marisalbi*, класс Osteichthyes, отряд Gadiformes.

2. Паразитический червь *Echinorhynchus gadi*, класс Acanthocephala.

3. Культуры бактерий: *Bacillus subtilis*; *B. licheniformis*; *Corynebacterium sp.*; *Cytophaga sp.*; *Escherichia coli* №613*; *Micrococcus lysodeicticus* №137*; *M. roseus*; *Mycococcus sp.*; *Staphylococcus aureus*.

4. Антигены: тимусзависимые — эритроциты человека (ЭЧ) — корпускулярный антиген; бычий сывороточный альбумин (БСА) — растворимый антиген; тимуснезависимый растворимый антиген — липополисахарид (ЛПС) из клеточных стенок грамотрицательных бактерий *Salmonella typhimurium*; иммунологически инертное вещество — черная китайская тушь (сажа).

Методы исследования

1. Мидии были собраны в Кислой губе и бухте Биофильтров; морские звезды отловлены на глубине 5–15 м в проливе Великая Салма; рыбы отловлены неводом в проливе Великая Салма. Животных содержали в естественных условиях (в садках в море на глубине 2–5 м) и лабораторных (в аквариумах с аэрацией при температуре 10°C).

2. Определение морфофизиологических параметров животных, взятие гемолимфы мидий, перивисцеральной жидкости морских звезд и крови рыб, получение сыворотки крови рыб, выделение клеток, приготовление препаратов для микроскопирования, определение концентрации клеток, введение антигенов проводили в соответствии с методиками, описанными в «Практикуме по иммунологии» (2001). СОЭ, концентрацию гемоглобина и цветной показатель крови определяли по стандартным методикам.

3. Паразитологические исследования проводили по стандартным методикам.

4. Оптимальные концентрации антигенов для иммунизации мидий и морских звезд были определены экспериментально. Мидии: БСА - 16 мкг/жив., ЭЧ - 100 млн./жив.,

тушь - 0,1% взвесь в морской воде аквариума. Морские звезды: БСА - 100 мкг/жив., ЛПС - 120 мкг/жив., ЭЧ - 480 млн./жив.

5. Определение белка проводили по методу Брэдфорд (по методике компании Bio-Rad, [26]).

6. Определение концентрации лизоцима проводили по методу Лабинской [9]. Оптическую плотность суспензии клеток измеряли на однолучевом спектрофотометре фирмы Jasco, модель Uvidес 4, при длине волны 540 нм.

7. Количественный учет микробионтов мидий определяли по методу Коха [14]

8. Определение микробионтов мидий проводили по стандартным методикам [12].

9. Определение антибактериальной активности гемолимфы мидий проводили в соответствии со стандартной методикой [2].*

10. Двухступенчатый электрофорез иммуноглобулинов рыб, кролика и сывороток рыб проводили по методу Laemmli в 5/15% ПААГ, содержащем ДСН и 2-МЭ в качестве восстанавливающего агента. Сыворотки рыб разводили в 20 раз и вносили в количестве 20 мкл в карман. Электрофограммы обрабатывали с помощью оригинального программного обеспечения [4].

11. Достоверность полученных данных оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента с уровнем значимости 0,05 [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Фагоцитоз у мидий

Мидии являются донными организмами-биофильтраторами. Моллюски отфильтровывают из воды детрит и микропланктон, отделяя несъедобную минеральную взвесь и крупные пищевые частицы, которые оседают на поверхности мантии и затем удаляются из организма в виде псевдофекалий. При температуре 20°C одна мидия длиной 5–6 см может профильтровать около 3 л воды в час [3].

Для изучения реакции мидий на загрязнение воды животных содержали в аквариумах с добавлением туши (0,1%). На рис.1 представлена фагоцитарная активность гемоцитов в гемолимфе и печени мидий. Через 0,5 ч после добавления туши клетки с частицами туши составляют около 10% всех гемоцитов гемолимфы и 4% гемоцитов печени, этот показа-

* Любезно предоставлены музеем кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова

тель достигает максимального значения к 12 ч в печени (32%) и к 24 ч — в гемолимфе (40%), далее идет постепенное снижение содержания клеток с тушью. Через 3 сут. они составляют 1,5% всех гемоцитов в гемолимфе и 13,4% в печени. Таким образом, в течение 1 сут. после добавления в воду инертного загрязняющего вещества у мидий наблюдали рост числа клеток, поглотивших это вещество, в общем количестве гемоцитов гемолимфы и печени. Эти результаты согласуются с данными, полученными при иммунизации *Mytilus galloprovincialis* грамположительными бактериями [37]. Высокий уровень клеток поддерживается в течение 2 сут. в гемолимфе и 3 сут. в печени, затем содержание клеток с тушью в гемолимфе и печени мидий снижается по мере очищения воды.

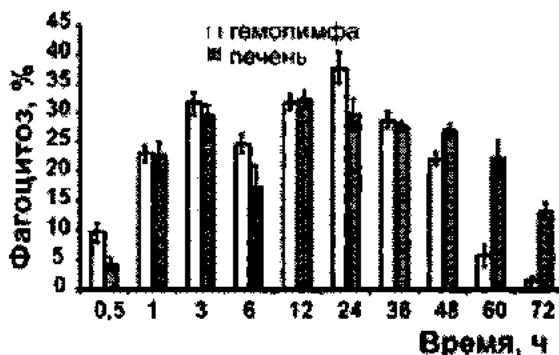


Рис. 1. Фагоцитарная активность гемоцитов гемолимфы и печени *Mytilus edulis* после добавления в воду аквариума 0,1% чёрной туши

2. Иммунизация мидий различными антигенами в естественных и экспериментальных условиях содержания

При изучении влияния различных антигенов на концентрацию гемоцитов мидий животных содержали в естественных и экспериментальных условиях. В качестве контроля использовали интактных животных, так как в предварительных опытах было показано, что повреждение раковины моллюсков и инъекция растворителя для антигенов (морской воды) не изменяют содержания гемоцитов в гемолимфе и печени.

В предварительных опытах было также показано, что на протяжении 7 сут. после антигенной стимуляции мидий увеличение концентрации гемоцитов в гемолимфе происходит только в первые 3 сут. независимо от природы вводимого вещества. Поэтому в дальнейших исследованиях наблюде-

ния проводили в течение 72 ч.

На рис. 2 представлена динамика концентрации гемоцитов в гемолимфе мидий после инъекции антигена (ЭЧ) или добавления туши в воду аквариума. Во всех экспериментах независимо от способа введения чужеродных веществ наблюдали достоверное увеличение концентрации гемоцитов в гемолимфе. Отчетливо видно два максимума: первый — уже в первые часы после введения веществ, второй максимум — на вторые-третьи сутки.

Содержание гемоцитов в гемолимфе увеличивается почти в 3 раза при инъекции животным ЭЧ или добавлении туши в воду аквариума. Показано, что в печени концентрация гемоцитов возрастает в 3 раза при инъекции ЭЧ и почти в 12 раз при добавлении туши.

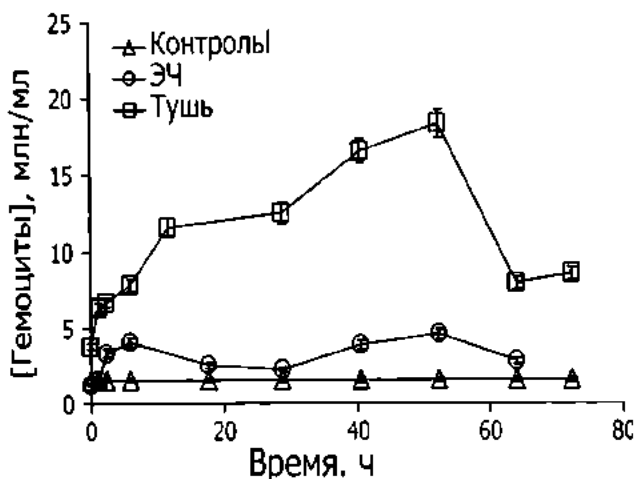


Рис. 2. Динамика концентрации гемоцитов печени *Mytilus edulis* после воздействия различных типов антигенов

Вероятно, первое увеличение численности гемоцитов в гемолимфе мидий связано с привлечением в мантийную полость циркулирующих клеток с периферии, которые затем перемещаются в печень, а второе увеличение — с рекрутированием клеток из пищеварительных органов и эпителиальных тканей мидий, где они находятся в большом количестве. Различия во времени возникновения максимумов можно связать с разной природой веществ, используемых в качестве антигенов. Разница в распознавании гемоцитами частиц туши и ЭЧ была обнаружена и при визуальном на-

блюдении фагоцитоза [7].

Возможно, второй максимум концентрации гемоцитов в опыте с тушью объясним ухудшением условий обитания мидий в аквариумах, произошедшим вследствие застоя воды. Это подтверждается данными бактериологических исследований, согласно которым количество бактерий на жабрах моллюсков увеличилось за это время в группе мидий, содержащихся в аквариуме с тушью, в 35 раз, а в группе мидий, содержащихся в аквариумах без туши, — в 100 раз. Тот факт, что у контрольных животных концентрация бактерий на жабрах стала значительно выше, чем у опытных, объясняется, прежде всего, образом жизни и физиологией моллюсков. Известно, что моллюски способны отфильтровывать и накапливать содержащиеся в воде бактерии, причем скорость фильтрации сильно зависит от условий окружающей среды [16, 29]. Таким образом, можно предположить, что у мидий, содержащихся в загрязнённой воде (0,1% туши), фильтрационная способность значительно ослаблена по сравнению с животными, содержащимися без добавления загрязнителя. Кроме того, возможно, что тушь подавляет и рост бактерий. Качественный состав бактерий существенно не изменился (табл. 1).

Таблица 1
Видовой состав бактерий в жаберных смывах мидий

Естественные условия обитания (Кислая Губа)	<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Aureobacterium flavescens</i> , <i>Marinococcus hispanicus</i>
Аквариальные условия (контроль)	<i>Aureobacterium testaceum</i> , <i>Marinococcus hispanicus</i> , <i>Microbacterium lacticum</i>
Аквариальные условия (тушь 0,1%)	<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Microbacterium lacticum</i>

Все выделенные нами бактерии являются неспорообразующими грамположительными палочками или кокками и относятся к родам *Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Marinococcus* и *Microbacterium*.

3. Концентрация гемоцитов в гемолимфе и печени мидий после первичной и вторичной иммунизации ЭЧ

При сравнении динамики количества гемоцитов в гемолимфе и печени мидий после первичного и повторного (через 7 дней) введения ЭЧ было показано, что во втором случае пик наступает раньше и максимальное число клеток в 1,5 раза выше и в гемолимфе и в печени (рис. 3). Через сутки концентрация клеток в обоих случаях снижается и

достигает одного уровня. Более сильный ответ мидий на повторное введение вещества может свидетельствовать о наличии у них механизмов, подобных кратковременной иммунологической памяти высших позвоночных животных. Литературные данные на этот счет неизвестны.

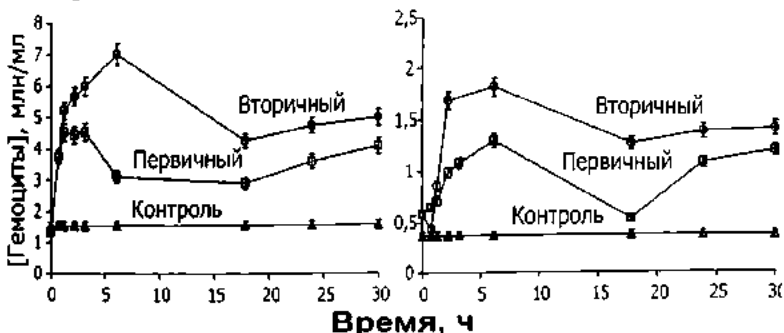


Рис. 3. Динамика концентрации гемоцитов гемолимфы (правый график) и печени (левый график) *Mytilus edulis* после первичного и вторичного введения ЭЧ

4. Антибактериальная активность гемолимфы мидий

Изучение антибактериальной активности гемолимфы интактных мидий (контроль) и экспериментальных животных, иммунизированных ЭЧ, проводили на пике концентрации гемоцитов в гемолимфе (через 1 ч после стимуляции). Гемолимфа проявляет антибиотические свойства в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (рис. 4).

Цельная гемолимфа интактных животных оказывала заметный подавляющий эффект на рост грамположительных бактерий *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium sp.*, *Micrococcus roseus* и *Staphylococcus aureus*. Гемолимфа не оказывала влияния на жизнедеятельность бактерий *B. licheniformis*. В группе грамотрицательных бактерий цельная гемолимфа мидий интактной группы действует на *Cytophaga sp.*, *Escherichia coli* и *Mycococcus sp.* В разведении 1:10 гемолимфа интактных мидий активна против грамположительных бактерий *Corynebacterium sp.* и *M. roseus*, а также против грамотрицательных бактерий рода *Cytophaga*.

Гемолимфа экспериментальных животных активна против грамположительных бактерий *B. subtilis*, *Corynebacterium sp.*, *M. roseus*, *S. aureus*. Из грамотрицательных бактерий чувствительны *E. coli* и *Mycococcus sp.* В разведении 1:10 гемолимфа экспериментальных животных

действует на грамположительные бактерии *B. subtilis*, *Corynebacterium* sp., *M. roseus*, *S. aureus*, а также на грамотрицательные бактерии рода *Mycococcus*.

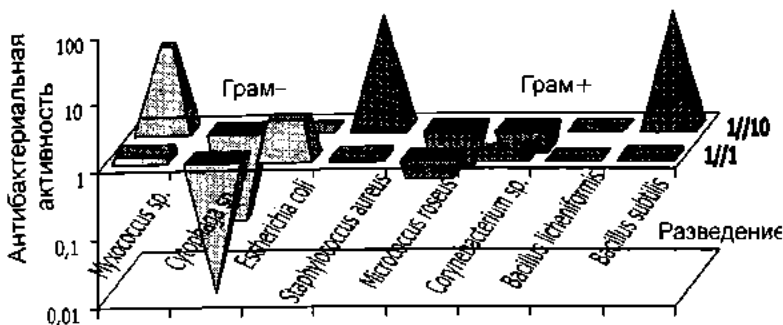


Рис. 4. Антибактериальная активность гемолимфы *Mytilus edulis* после иммунизации ЭЧ, рассчитанная как площадь подавления роста микроорганизмов по отношению к контролю

В случае с *E. coli* отмечено усиление антибактериальной активности гемолимфы после иммунизации ЭЧ (в 3,8 раза). В случае с *Cytophaga* sp. активность гемолимфы опытных животных отсутствовала, тогда как активность гемолимфы интактных животных была высокой. В остальных случаях активность гемолимфы не зависела от иммунизации.

Различия в действии гемолимфы контрольных и экспериментальных мидий на разные бактериальные культуры можно объяснить большей избирательностью антимикробных веществ по отношению к грамположительным бактериям, возможно, благодаря строению их клеточных стенок. Внутри групп грамположительных и грамотрицательных бактерий также существует селективность, что, вероятно, связано с отличиями в строении структур клеточной стенки бактериальных клеток разных видов.

5. Иммунизация морских звезд в различных экспериментальных условиях содержания

Для изучения влияния условий содержания на защитные реакции морских звезд животные, содержавшиеся в аквариумах, были разделены на 4 группы и подвергнуты следующим видам воздействия: добавление в воду бензина в качестве загрязняющего агента (0,003%); повышение температуры воды до 15°C; уменьшение аэрирования воды. Одна группа служила в качестве контроля. В каждой группе животных разделяли на 4 подгруппы и вводили антигены (БСА,

ЛПС, ЭЧ) или стерильную морскую воду (растворитель для антигенов). В течение 1 сут. после воздействий проводили сравнительный анализ концентрации амебоцитов, общего белка и лизоцима у контрольных и экспериментальных животных.

Показано, что у морских звезд, содержащихся в условиях, приближенных к естественным, при введении различных антигенов достоверно увеличивалось содержание лизоцима (в 2 раза), концентрация амебоцитов и белка в перивисцеральной жидкости не изменялась (рис. 5). Наибольшее влияние на морских звезд оказала пониженная аэрация: у опытных животных увеличилось количество амебоцитов (в 2,7 раза), белка (в 1,8 раза), лизоцима (в 3 раза) независимо от природы вводимого антигена. Повышенная температура и добавление в воду бензина привели к росту концентрации амебоцитов в 2,1 раза, белка в 1,6 раза, концентрации лизоцима в 3 раза.

Следовательно, ухудшение условий среды обитания приводит к изменению всех исследованных параметров врожденного иммунитета морских звезд (увеличению концентрации амебоцитов, общего белка и лизоцима). Антигенная стимуляция вызывает статистически достоверные изменения только концентрации лизоцима в перивисцеральной жидкости.

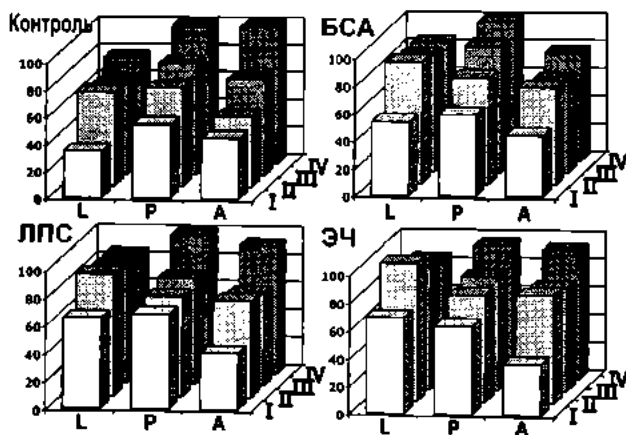


Рис. 5. Параметры гемолимфы *Asterias rubens* после введения различных антигенов в условиях стресса: I — контроль, II — бензин, III — повышенная температура, IV — низкая аэрация; L — лизоцим, P — общий белок, A — амебоциты. Все параметры приведены в процентном отношении

6. Иммунные и гематологические параметры наваги и трески в ответ на паразитарную инвазию

В ходе комплексного обследования наваги и трески Белого моря определяли морфологические параметры рыб, зараженность рыб паразитами, гематологические, биохимические и иммунологические показатели и сравнивали их в норме и при инвазии. Рыбы были разделены на группы в зависимости от интенсивности заражения скребнем *Echinorhynchus gadi* (табл. 2 и 3).

Оба вида рыб являются основными дефинитивными хозяевами паразита. Экстенсивность инвазии исследуемой трески составила 97,9% при средней интенсивности инвазии 11,7 паразита на особь, а наваги — соответственно 52,8% и 1,4 паразита на особь. Выявлено, что интенсивность инвазии не зависит от длины и веса рыб. Это учитывали в ходе дальнейшей обработки данных.

Показано, что у зараженных рыб уменьшилось содержание в крови форменных элементов — эритроцитов и лейкоцитов (табл. 3). Уменьшение концентрации эритроцитов составило 30% у наваги и 45% у трески, снижение концентрации лейкоцитов — около 40% в обоих случаях. Зарегистрировали уменьшение концентрации гемоглобина в крови: на 13,8% у наваги и на 27,5% у трески. Цветной показатель крови достоверно не варьировал. СОЭ незараженных и зараженных рыб не изменялась и находилась на уровне 2,5–3 мм/ч, но у наиболее зараженных рыб она снизилась до 2 мм/ч.

Установлено, что у зараженных паразитами наваги и трески в естественных условиях обитания изменились показатели врожденного гуморального иммунитета: на электрофореграмме сыворотки крови выявлены новые фракции белка (рис. 6, 7), в том числе низко-молекулярная фракция (около 14,5 кДа); в сыворотке существенно увеличались общая концентрация белка (на 50% у наваги и почти вдвое у трески) и содержание лизоцима (в 5 раз у наваги и в 2 раза у трески). Известно, что основной функцией лизоцима является гликозидазная активность, субстратом для которой являются компоненты клеточной стенки бактерий. Однако лизоцим обладает и другими, не связанными с ферментативной активностью и неизученными в полной мере свойствами. Впервые обнаруженный рост концентрации лизоцима в зависимости от увеличения зараженности наваги и трески скребнем *Echinorhynchus gadi* можно объяснить следующим. Во-первых, любая биологическая агрессия стиму-

лирует у рыб одновременное развитие различных форм врожденного иммунного ответа, который проявляется в том числе и в увеличении концентрации лизоцима в сыворотках крови рыб. Однако если считать, что основная роль лизоцима в организме — борьба с микробной инфекцией, то в случае паразитарной инвазии эта реакция оказывается напрасной. Во-вторых, из литературы известно, что заболевание паразитами может, с одной стороны, повысить риск вторичной инфекции рыб и спровоцировать развитие заболеваний смешанного типа, а с другой стороны — активировать иммунные реакции [1, 27]. Роль лизоцима оказывается превентивной, направленной на возможное предотвращение вторичной инфекции. В-третьих, лизоцим может обладать и неизвестными в настоящее время свойствами, эффективными в борьбе с паразитами. В таком случае активация лизоцима позволяет рыбам повысить общую сопротивляемость организма инвазии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменение условий среды обитания, паразитарная инвазия и антигенное воздействие приводят к изменениям клеточных и биохимических параметров внутренней среды гидробионтов. Однако характер этих изменений зависит от образа жизни животных.

Мидии, как донные биофильтраторы, чувствительны к антигенному воздействию. В ответ на стимуляцию различными антигенами концентрация гемоцитов в гемолимфе и печени моллюсков растет и достигает максимума в первые часы после воздействия. Через 1–3 сут. наблюдается второй пик. При изучении биофильтрации у мидий было показано, что в гемолимфе и печени мидий в течение первых суток после добавления туши в фильтруемую воду растет относительное содержание клеток, поглотивших частицы туши. В лабораторных условиях качественный состав бактерий на жабрах мидий существенно не меняется в зависимости от добавления загрязнителя (0,1% туши). Однако загрязнитель, по-видимому, ухудшает фильтрационные способности мидий. При повторной стимуляции ЭЧ максимальное увеличение количества гемоцитов в гемолимфе наблюдается раньше, и концентрация клеток в 1,5 раза выше. Эти данные получены на мидиях впервые и свидетельствуют о наличии у моллюсков механизмов, подобных иммунологической памяти высших позвоночных животных. Гемо-

лимфа интактных и иммунизированных ЭЧ мидий проявляет антибактериальную активность по отношению к разным видам грамположительных и грамотрицательных бактерий. Исследование

антибактериальной активности гемолимфы мидий показало, что разведенная гемолимфа оказывает больший эффект на рост различных микроорганизмов.

Морские звезды более чувствительны к ухудшению условий среды обитания, чем к антигенной стимуляции. Любое ухудшение среды обитания (добавление загрязняющего вещества, повышение температуры, уменьшение аэрирования воды) ведет к достоверному увеличению концентрации амёбоцитов, общего белка и лизоцима в перивисцеральной жидкости морских звезд. Экспериментальное введение в организм животных чужеродных веществ (БСА, ЛПС из клеточной стенки грамотрицательных бактерий и ЭЧ) не оказывает такого действия.

Рыбы — низшие позвоночные животные. Биологическая агрессия стимулирует реакции и врожденного, и приобретенного иммунитета рыб. Заражение наваги и трески Белого моря скребнем *Echinorhynchus gadi* вызывает уменьшение содержания в крови форменных элементов и гемоглобина, повышение концентрации в сыворотке крови белка и лизоцима, появление в сыворотке новых фракций белка.

Таким образом, у всех исследованных животных, относящихся к различным эволюционным и экологическим нишам, изменения условий окружающей среды, включая биологическое и химическое загрязнение, уменьшение аэрирования воды и повышение температуры, вызывают схожие реакции. Характеристики врожденного клеточного и гуморального иммунитета водных беспозвоночных и позвоночных животных можно использовать как индикатор состояния организмов и на этом основании делать выводы об изменении условий среды обитания.

Изучение стратегий защиты, используемых массовыми видами водных беспозвоночных и низших позвоночных животных, дает возможность проследить возникновение, развитие и функционирование иммунной системы, свойственной высшим позвоночным животным и человеку. Знания о влиянии факторов среды обитания на защитные механизмы гидробионтов могут снизить ущерб при промышленном разведении животных [8].

Таблица 2

Морфологические и паразитологические показатели наваги и трески

Группа	L (см) ¹	l (см) ²	Q (г) ³	Экстенсивность инвазии ⁴	Интенсивность инвазии ⁵	Средняя интенсивность инвазии	Средняя удельная интенсивность инвазии ⁶
<i>Навага</i>							
1	22,7 ± 2,2	21,1 ± 1,8	92,1 ± 28,0	52,8%	0	0	0
2	22,6 ± 2,2	21,0 ± 2,1	95,7 ± 33,1		1	1	0,01
3	22,0 ± 0,89	20,7 ± 0,9	75,4 ± 9,5		2	2	0,02
4	27,5	25,8	148,2		4	4	0,03
<i>Треска</i>							
1	21,8 ± 4,3	20,0 ± 3,9	134,4 ± 36,4	97,9%	0-5	2,9	0,02
2	24,1 ± 4,2	22,8 ± 3,6	161,3 ± 51,6		6-15	10,4	0,07
3	26,7 ± 3,1	24,6 ± 2,8	202,3 ± 61,6		16-25	18,8	0,09
4	20,9 ± 1,9	19,7 ± 1,5	106,2 ± 17,8		26-35	26,5	0,25
5	24,5	22,5	137,7		36-45	36,0	0,26
6	30,2	28,1	315,0		56-65	65,0	0,21

Примечание: 1 - расстояние от переднего конца головы до конца хвостового плавника; 2 - расстояние от переднего конца головы до конца чешуйного покрова; 3 - масса рыбы; 4 - приведена для данной выборки; 5 - количество паразитов на особь; 6 - количество паразитов на 1г тела особи хозяина

Таблица 3

Гематологические и иммунологические показатели наваги и трески

Группа	Количество паразитов на особь	Концентрация		СОЭ (мм/ч)	Концентрация			Цветной показатель крови (пг гемоглобина/эритроцит)
		Эритроцитов (млрд/мл)	Лейкоцитов (млн/мл)		Белка (мг/мл)	Гемоглобина (г/л)	Лизоцима (мкг/мл)	
<i>Навага</i>								
1	0	1,90 ± 0,08	5,20 ± 0,11	2,5 ± 0,5	40,3 ± 2,1	94 ± 3	0,51 ± 0,05	49,5
2	1	1,74 ± 0,09	4,94 ± 0,21	3,0 ± 0,3	45,5 ± 1,7	88 ± 5	2,34 ± 0,13	51,1
3	2	1,58 ± 0,07	3,61 ± 0,12	2,5 ± 0,4	52,4 ± 0,9	86 ± 4	2,72 ± 0,17	54,4
4	4	1,30	3,20	2,0	60,8	81	2,53	62,3
<i>Трески</i>								
1	0-5	1,40 ± 0,09	8,17 ± 0,19	2,5 ± 0,2	35,5 ± 1,9	80 ± 6	1,03 ± 0,07	57,1
2	6-15	1,46 ± 0,04	11,06 ± 0,51	2,8 ± 0,3	37,0 ± 3,1	79 ± 2	1,29 ± 0,10	54,1
3	16-25	1,24 ± 0,06	10,27 ± 0,32	2,5 ± 0,1	42,7 ± 2,4	81 ± 4	1,74 ± 0,05	65,3
4	26-35	0,77 ± 0,07	8,20 ± 0,12	2,5 ± 0,3	52,9 ± 1,7	68 ± 5	1,98 ± 0,15	88,3
5	36-45	1,01	6,41	2,5	59,7	60	2,03	59,4
6	56-65	0,98	6,35	2,0	68,3	58	1,51	59,1

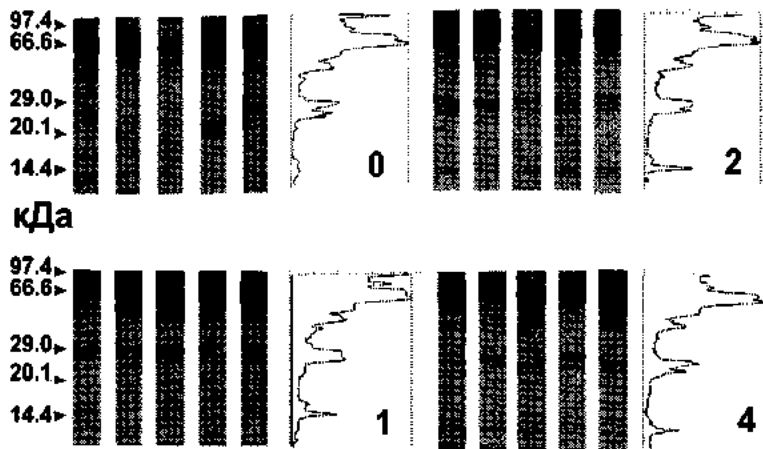


Рис. 6. Электрофореграммы сыворотки крови *Egelinus navaga* при паразитарной инвазии (слева — молекулярная масса, справа — количество паразитов на особь)

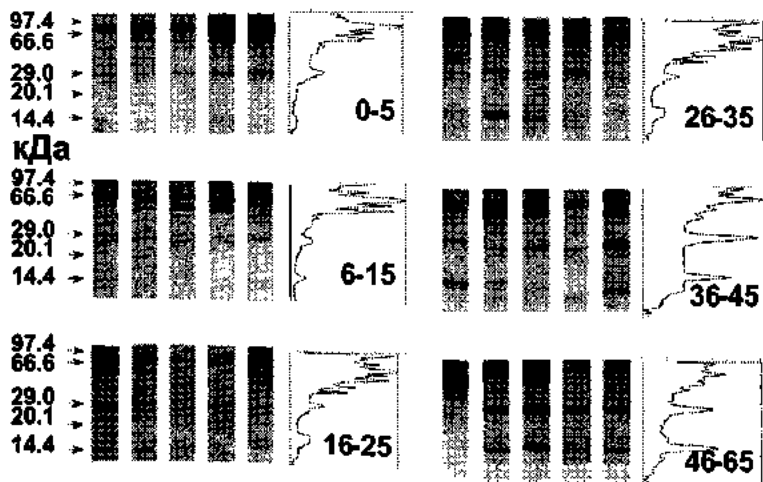


Рис. 7. Электрофореграммы сыворотки крови *Gadus morhua* при паразитарной инвазии (слева — молекулярная масса, справа — количество паразитов на особь)

Иммунологические тесты могут оказаться эффективным инструментом:

- мониторинга водной биоты (например, в районе освоения месторождений нефти и газа на морском шельфе),
- нормирования техногенных (токсических) нагрузок на водные экосистемы,
- контроля здоровья природных водных экосистем и аквакультуры,
- определения воздействия на водные организмы факторов техногенной природы,
- оценки эффективности природоохранных мероприятий, направленных на смягчение воздействий хозяйственной активности на водные экосистемы.

Авторы признательны студентам и стажёрам разных лет обучения, к.б.н. М.А. Валовой, к.б.н. Л.А. Гиченок, к.б.н. И.А. Косевичу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильков Г.В. Паразитарные болезни рыб и санитарная оценка рыбной продукции. М: ВНИРО. 1999.

2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: МГУ. 1994.

3. Зацепин В.И., Филатова З.А. Класс двустворчатые (Bivalvia). // В кн.: «Жизнь животных», под ред. акад. Л.А. Зенкевича, т. 2. 1968.

4. Киташов А.В., Заякин Н.А. Возможности применения компьютерной техники в практикуме по иммунологии. // В кн. «Практикум по иммунологии. Учебное пособие», М.: Академия (в печати), 2004. с.298-325.

5. Киташова А.А., Кондратьева И.А., Наумова А.Ю. Действие лекарственных препаратов на молодь радужной форели. // Проблемы рыболовства. 2002. 1 (9). с. 125–136.

6. Кондратьева И.А., Киташова А.А., Ланге М.А. Современные представления об иммунной системе рыб. Часть I. Организация иммунной системы рыб. // Вестник Московского университета, сер. 16. Биология. 2001. №4. с. 11–20.

7. Кондратьева И.А., Киташова А.А. Функционирование и регуляция иммунной системы рыб. // Иммунология. 2002. №2. с. 97–101.

8. Криксунов Е.А., Павлов Д.С., Бобырев А.Е., Полонский Ю.М. Расчетные процедуры оценок ущербов биоресурсам в свете современных научных данных. // В кн.: «Проблемы научно-методического обеспечения оценок ущербов рыбо-

му хозяйству от разработки нефтегазовых месторождений на морском шельфе». М., 1999. с. 62–70.

9. *Лабинская А.С.* Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина. 1978.

10. *Лакин Г.Ф.* Биометрия / Изд. 4-е, переработанное и дополненное. М.: Высш. шк. 1990.

11. *Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И.* Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и на закисление среды. М.: Наука. 2001.

12. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. / Дж. Хоулт, Н. Криг. М.: Мир. 1997.

13. Практикум по иммунологии. Учебное пособие / Под ред. И.А. Кондратьевой, В.Д. Самуилова. М.: МГУ. 2001.

14. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. М.: МГУ. 1995.

15. *Фонталин Л.Н.* Происхождение антигенраспознающей иммунной системы позвоночных животных. II. Сравнительно-иммунологические и эволюционные аспекты. Иммунология. 1999. №6. с. 4–11.

16. *Школьникова С.С.* Микрофлора промысловых беспозвоночных. М.: Пищевая промышленность. 1981.

17. *Adema C.M., Loker E.S.* Specificity and immunobiology of larval digenean-snail associations. // In: "Advances in trematode biology" (Eds.: Fried B., Graczyk T.K.), CRC Press, Boca Raton, New York, 1997. 229–263.

18. *Blazer V.S.* Nutrition and disease resistance in fish // Annu. Rev. Fish Dis. 1992. 2. 309–323.

19. *Clem L.W., Sizemore R.C., Ellsaesser C.F., Miller N.W.* Monocytes as accessory cells in fish immune responses // Dev. Comp. Immunol. 1985. 9. 803–809.

20. *Faisal M., Huggett R.J.* Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the activity of lymphocytes of the spot *Leiostomus xanthurus*. // Mar. Environ. Res. 1993. 35. 121–124.

21. *Fisher W.S., Oliver L.M., Winstead J.T., Volety A.K.* Stimulation of defense factors for oysters deployed to contaminated sites in Pensacola Bay, Florida. // Aquat Toxicol. 2003. 64(4). 375–391.

22. *Gliniski Z, Jarosz J.* Immune phenomena in echinoderms. // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 2000. 48. 189–193.

23. *Gross P.S., Clow L.A., Smith L.C.* SpC3, the complement homologue from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes. // Immunogenetics. 2000. 51. 1034–1044.

24. Hubert F., van der Knaap W., Noel T., Roch P. Cytotoxic and antibacterial properties of *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (bivalve molluscs) hemolymph. // *Aquat. Living Resour.* 1996. 9. 115–124.
25. Hubert F., Cooper E.L., Roch P. Structure and differential target sensitivity of the stimutable cytotoxic complex from hemolymph of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. // *Biochim. Biophys. Acta*, 1997. 1361. 29–41.
26. Instructions for the Bio-Rad Protein Assay. 1994.
27. Johansen L.H., Sommer A.I. Infectious pancreatic necrosis virus infection in Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts affects the outcome of secondary infections with infectious salmon anaemia virus or *Vibrio salmonicida*. // *Dis. Aquat. Organ.* 2001. 47. 109–117.
28. Koumans-van Diepen J.C.E., van de Lisdonk M.H.M., Taverne-Thiele A.J.L., Verburg-van Kemenade B.M., Rombout J.H.W.M. Characterization of immunoglobulin-binding leukocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.). // *Dev. Comp. Immunol.* 1994. 18. 45–56.
29. Kueh C.S., Chan K.Y. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. // *J. Appl. Bacteriol.* 1985. 59(1). 41–47.
30. Lally J., Al-Anouti F., Bols N., Dixon B. The functional characterisation of CK-1, a putative CC chemokine from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). // *Fish Shellfish Immunol.* 2003. 15(5). 411–424.
31. Legac E., Vaugier G.L., Bousquet F., Bajelan M., Leclerc M. Primitive cytokines and cytokine receptors in invertebrates: the sea star *Asterias rubens* as a model of study. // *Scand. J. Immunol.* 1996. 44. 375–380.
32. Leclerc M. Human kappa-like expression in the axial organ of the sea star *Asterias rubens* (Echinoderma). // *Eur. J. Morphol.* 2000. 38. 206–207.
33. Leippe M., Renwantz L. Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus* hemocytes. // *Dev. Comp. Immunol.* 1988. 12. 297–308.
34. Marchalonis J.J., Schluter S.F. Development of an immune system. // *Ann. NY Acad. Sci.* 1994. 712. 1–12.
35. Matranga V. Molecular aspects of immune reactions in Echinodermata. // *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 1996. 15. 235–247.
36. Matranga V., Toia G., Bonaventura R., Muller W.E. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes // *Cell. Stress Chaperones.* 2000. 5. 113–120.

37. *Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F., Roch P.* Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. // *J. Cell Sci.* 1999. 112 (Pt 23). 4233–4242.

38. *Muta T., Iwanaga S.* The role of hemolymph coagulation in innate immunity. // *Curr. Opin. Imm.* 1996. 8. 41–47.

39. *Roch Ph., Mitta G., Hubert F., Kondratieva I.A., Th. Noel, Chavanieu A., Aumelas A., Calas B.* Biotechnologie des peptides antibiotiques des moules. Rapport de la Société Francaise de l'Immunologie, Paris, Novembre, 1998. 1–25.

40. *Rombout J.H.W.M., Taverner-Thiele J.J., Villena M.I.* The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical study. // *Dev. Comp. Immunol.* 1993. 17. 55–66.

41. *Shen L., Stuge T.B., Zhou H., Khayat M., Barker K.S., Quintou S.M., Wilson M., Bengten E., Chinchar V.G., Clem L.W., Miller N.W.* Channel catfish cytotoxic cells: a mini-review. // *Dev. Comp. Immunol.* 2002. 26(2). 141–149.

42. *Shen L., Stuge T.B., Evenhuis J.P., Bengten E., Wilson M., Chinchar V.G., Clem L.W., Miller N.W.* Channel catfish NK-like cells are armed with IgM via a putative FcμR. // *Dev. Comp. Immunol.* 2003. 27(8). 699–714.

43. *Stefano G.B., Cadet P., Dokun A., Sharrer B.* A neuroimmunoregulatory-like mechanism responding to stress in the marine bivalve *Mytilus edulis*. // *Brain. Behav. Immun.* 1990. 4. 323–329.

44. *Verburg-van Kemenade L.B.M., Groeneveld A., Van Rens B.T.T.M., Rombout J.H.W.M.* Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*). // *J. Exp. Biol.* 1994. 187. 143–158.

THE IMMUNE STATUS OF HYDROBIONTS OF THE WHITE SEA IN NORM AND AT STRESS

**Kondratieva I.A., Kitashov A.V., Kitashova A.A.,
Kriksunov E.A.**

The Lomonosov's Moscow state university

In article changes of parameters of immunity of mollusks and echinoderms, and also fishes are considered at antigenic and parasitic influence. The role of a biofiltration at immunized and intact mollusks in absorption of an alien material is discussed. It is underlined the big sensitivity to pollutant at echinoderms in comparison with molluscs. Change of conditions of an environment, including biological and chemical pollution, reduction of aeration of water and rise in temperature is shown, that, cause similar protective reactions.

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНИТЕТА ПРИ ИНФИЛЬТРАЦИОННЫХ СПОСОБАХ ВАКЦИНАЦИИ КАРПА (*Cyprinus carpio* L.) ПРОТИВ АЭРОМОНОЗА

Балабанова Л.В., Микряков В.Р.

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина,
п. Борок, Ярославская обл.*

Приводятся данные исследований влияния вакцинации карпов против аэромоназа на синтез специфических антител, бактерицидные свойства сыворотки крови и слизи и напряженность приобретенного иммунитета. Определены количественные характеристики исследуемых признаков. Показана зависимость реагирования иммунной системы рыб от способа иммунизации. Рыбы на иммунизацию методом гиперосмотической инфильтрации синтезом антител, активацией защитных свойств слизи, повышением напряженности иммунитета к аэромоназу реагировали эффективнее, чем на иммунизацию иммерсионным способом

ВВЕДЕНИЕ

Интенсивное разведение рыб в прудовых хозяйствах приводит к вспышкам бактериальных и вирусных болезней рыб, вызывающих высокую смертность. Это способствовало разработке экономически приемлемых и простых в применении способов вакцинации рыб. В 1976 году Аменд и Фендер [4] показали возможность введения антигена (бычьего сывороточного альбумина) в рыбу методом гиперосмотической инфильтрации. Затем была показана эффективность этого метода иммунизации лососевых против вибриоза [5 – 7]. Александер и др. [3] при иммунизации кумжи *Salmo trutta* L. методом гиперосмотической инфильтрации использовали корпускулярный антиген – бактерии *Escherichia coli* и *Pseudomonas*, при этом бактерии были найдены в жабрах, крови, печени, головной почке, селезенке. Таким образом, ими была показана возможность иммунизации рыб методом гиперосмотической инфильтрации при применении бактериального антигена. В последние годы для профилактики инфекционных заболеваний разводимых рыб широко используется вакцинация методом иммерсии [11, 12, 17].

Нами предпринята попытка определения эффективности иммунизации карпа *Cyprinus carpio* L. против аэромоназа методами гиперосмотической инфильтрации и иммерсии.

В опытах использовались карпы-годовики и сеголетки. Рыбы иммунизировались 2 методами - гиперосмотической инфильтрации и иммерсии. При первом способе карпы сначала погружались на 1,5 - 2 мин. в 5,32% раствор NaCl, затем на 3 - 30 мин. в суспензию инактивированных нагреванием бактерий *Aeromonas hydrophila*. При втором способе рыб погружали только в суспензию инактивированных бактерий на 3 - 30 мин. Рыб иммунизировали от 2 до 4 раз с промежутком между иммунизациями 14 - 30 сут. Определялись выживаемость рыб после их заражения вирулентными бактериями *A. hydrophila*, бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК) и слизи, титры антител в сыворотке крови. Для определения выживаемости рыб их заражали внутривентральной инъекцией вирулентных бактерий *A. hydrophila*. Титры антител и бактерицидную активность сыворотки крови и слизи определяли по общепринятой методике [1, 2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что иммунизация рыб гиперосмотической инфильтрацией и иммерсией стимулирует иммунную систему рыб, однако степень ее реагирования на воздействие антигенного раздражителя зависит как от способа, так и от количества иммунизаций.

У трех- и четырехкратно иммунизированных методом гиперосмотической инфильтрации карпов титры антител были 1:160 - 1:640, у одно- и двукратно иммунизированных - 1:20 - 1:40.

При иммунизации рыб методом иммерсии антитела при трех- и четырехкратной иммунизации обнаружены в титрах 1:80 - 1:320.

БАСК иммунизированных обоими способами карпов достоверно не отличалась от таковой интактных.

Бактерицидная активность слизи опытных карпов была через 5 недель после трех иммунизаций гиперосмотической инфильтрацией на 19% выше, чем у контрольных, через 6 - на 35%. Через 5 месяцев после иммунизации рост бактерий с добавлением слизи иммунизированных рыб был в 4 раза, а через 6 месяцев в 2,7 раза меньше, чем с добавлением слизи интактных рыб.

Такое сильное подавление роста бактерий слизью имму-

низированных рыб можно объяснить наличием в эпидермисе рыб клеток, содержащих иммуноглобулины. Такие клетки были идентифицированы в эпидермисе радужной форели [16, 18]. Ряд авторов [8 - 10, 13, 14] определили наличие антител в слизи некоторых видов рыб. Peleteiro a. Richards [16] показали наличие иммуноглобулин-содержащих клеток в эпидермисе радужной форели *Salmo gairdneri*, вакцинированной иммерсией. Это позволяет предположить, что кожа является активной частью иммунной системы рыб, и это объясняет высокую бактерицидную активность слизи, наблюдаемую нами у карпов, иммунизированных гиперосмотической инфильтрацией.

Опыты по определению выживаемости интактных и иммунизированных 2 раза методом гиперосмотической инфильтрации карпов-сеголеток после внутрибрюшинного введения вирулентных бактерий *A. hydrophila* показали, что иммунизация рыб повысила их выживаемость с 10 до 75 %.

Таким образом, проведенные нами опыты позволили установить, что интенсивность реагирования иммунной системы рыб на воздействие бактериального антигена зависит от способа иммунизации и количества иммунизаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Гончаров Г. Д. Лабораторная диагностика болезней рыб. М.: Колос, 1973, 119 с.
2. Смирнова О.В., Кузьмина Т. Д. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом фотонейлометрии // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. 1966. № 4. С. 8-11.
3. Alexander J.B., Bowers A., Ingram G.A., Shamshoom S.M. The portal of entry of bacteria into fish during hyperosmotic infiltration and the fate of antigens // Dev. Comp. Imm. 1982. Suppl. 2. P. 41-46.
4. Amend D.F., Fender D.S. Uptake of bovine serum albumin by rainbow trout from hyperosmotic solution: a model for vaccinating // Science. 1976. V. 192, № 4241. P. 793-793.
5. Antipa R., Amend D.F. Immunization of pacific salmon: comparison of intraperitoneal injection and hyperosmotic infiltration of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* bacterins // J. Fish Res. Board Can. 1977. V. 34. № 2. P. 203-208.
6. Bowers A., Alexander J.B. Hyperosmotic infiltration: immunological demonstration of infiltrating bacteria in brown

trutta, *Salmo trutta* L.// *J. Fish Biol.* 1981. V. 18, № 1. P. 9-13.

7. *Croy T.R., Amend D.F.* Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique// *Aquaculture.* 1977. V. 12. P. 317-325.

8. *Di Conza J.J.* Some characteristics of natural haemagglutinins found in serum and mucus of the catfish, *Tachysurus australis*// *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1970. V. 48. P. 515-523.

9. *Fletcher T.C., Grant P.T.* Immunoglobulins in the serum and mucus of the plaice (*Pleuronectes platessa*)// *Biochem. J.* 1969. V. 115. P.65.

10. *Fletcher T.C., White A.* Antibody production in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.) after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens// *Aquaculture.* 1973. V. 1. P. 417-428.

11. *Gudding R., Lillehaug A., Evensen III.* Recent developments in fish vaccinology // *Vet. Immunol. a. Immunopathol.* 1999. V.72. N 1-2. P.203-212.

12. *Jeremiж S., Andjeliж D.* Immersive vaccination of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) with *Yersinia ruckeri* bacterin. *Acta vet.* 2000. V. 50. N 2-3. P. 77-82.

13. *Lobb C.J., Clem L.W.* Phylogeny of immunoglobulin structure and function. XI. Secretory immunoglobulins in the cutaneous mucus of the sheephead, *Archosargus probatocephalus*// *Dev. Comp. Immunol.* 1981. V. 5. P. 587-596.

14. *O'Rourke F.J.* Presence of blood antigens in fish mucus and its possible parasitological significance // *Nature.* 1961. V. 189. P. 943.

15. *Peleteiro M.C., Richards R.H.* Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson // *J. Fish Dis.* 1985. V. 8. P. 161-172.

16. *Peleteiro M.C., Richards R.H.* Immunocytochemical studies on immunoglobulin-containing cells in the epidermis of the rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson: influence of bath vaccination// *J. Fish Biol.* 1988. V. 32. № 6. P. 845-858.

17. *Shoemaker C.A., Klesius Ph. H., Bricker J. M.* Efficacy of modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine in channel catfish as young as seven days post hatch. *Aquaculture.* 1999. V.176. N 3-4. P. 189-193.

18. *St. Louis-Cormier E.A., Osterland C.K., Anderson P.D.* Evidence for a cutaneous secretory immune system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)// *Dev. Comp. Immunol.* 1974. V. 8, № 1. P. 71-80.

**CHANGE OF SPECIFIC AND NONSPECIFIC
PARAMETERS OF IMMUNITY AT INFILTRATED
WAYS OF VACCINATION OF THE CARP (CYPRINUS
CARPIO L.) AGAINST AEROMONOSIS**

Balabanova L.V., Mikrjakov V.R.

*Papanin's Institute for biology of inland waters, Borok,
the Yaroslavl region.*

The data of researches of influence of carps vaccination against aeromonosis on synthesis of specific antibodies, bactericidal properties of whey of blood and slime and intensity of the acquired immunity are cited. Quantitative characteristics of researched attributes are determined. Dependence of reaction of immune system of fishes on a way of immunization is shown. Fishes on immunization by a method of hyperosmotic infiltration synthesis of antibodies, activation of protective properties of slime, increase of intensity of immunity to aeromonosis reacted more effectively, than to immunization of an immersed way.

УДК 597.554:591.2

**ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА У ИММУНИ-
ЗИРОВАННЫХ ГОЛОДАЮЩИХ И ПИТАЮЩИХСЯ
КАРПОВ ПРИ СПОНТАННОМ АЭРОМОНОЗЕ**

В.В. Богдан *, Л.П. Смирнов *, Л.Н. Юхименко **

**Институт биологии КНЦ РАН, г. Петрозаводск,
Пушкинская, 11, 185610*

***ВНИИ прудового рыбного хозяйства, п. Рыбное, Дмит-
ровский р-н, Московская обл. 141821.*

lsmirnov@krz.karelia.ru; leo46@onego.ru

Выявлены различия в липидном и жирнокислотном составе некоторых тканей у голодающих и питающихся карпов при спонтанном аэромонозе после иммунизации, которые наряду с тканевой резистентностью обеспечивают также иммунологическую реактивность рыб. У иммунизированных голодающих рыб при аэромонозе повышенное содержание в печени и почках фосфолипидов, содержащих полиеновые жирные кислоты (эйкозапентаеновую преимущественно в печени) по сравнению с питающимися, затрагивает как структуру мембран, так и процессы энергообеспечения, что должно определять более высокий уровень детоксикационной способности этих органов, а также активности клеточных механизмов иммунного ответа.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционные болезни вызывают изменения различных метаболических процессов в организме животных. В зависимости от тяжести заболевания выраженность биохимических реакций носит адаптивно-приспособительный или патологический характер, что в значительной степени определяется физиологическим состоянием рыб. Отдельные изменения характеризуют работу иммунных механизмов, представленных гуморальными и клеточными факторами.

Устойчивость рыб к инфекционным агентам определяется деятельностью многих систем, а также образуемых ими факторов приобретенного или врожденного иммунитета. Защита организма на клеточном уровне в значительной степени обусловлена составом липидов, выполняющих в клетке структурную, запасную и биоэффакторную роль [6]. Иммуногенез также сопровождается определенными модификациями метаболизма липидов, что во многом определяет исход инфекционного процесса. Известно, что динамика иммунологических процессов в условиях стресса связана с характером питания. Показано, что у голодающих и питающихся карпов постинфекционный характер липидного обмена при экспериментальном аэромонозе различался [4].

Аэромоноз является распространенным бактериальным заболеванием карповых и лососевых рыб в условиях прудового рыбоводства. Эффективным способом повышения резистентности рыб к разного рода инфекциям, в том числе и к аэромонадной, является иммунизация. При этом у иммунизированных рыб болезнь не возникает совсем или протекает в ослабленной форме [9]. Однако отдельные биохимические аспекты этой проблемы, связанные с характером питания, остаются неясными.

В задачу настоящего исследования входило сравнение липидного и жирнокислотного состава некоторых тканей голодающих и питающихся карпов при спонтанном аэромонозе после иммунизации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на карпах из прудов рыбоводных хозяйств Молдовы. Годовиков карпа иммунизировали вакциной ВЮС-2 в дозе 70-100 мкг на рыбу внутримышечно. В дальнейшем часть рыб выдерживали на нормальном рационе питания. Другая часть содержалась без кормле-

ния. После возникновения спонтанного аэромоноза у голодающих и питающихся особей брали ткани для анализа липидов.

Сборные пробы печени, почек и мышц (от 10 рыб) фиксировали 96% -ным этанолом и хранили при 4°C до анализа. Липиды экстрагировали смесью хлороформа с метанолом (2:1) [7]. Фракционирование липидов проводили с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол» в системе растворителей: петролейный эфир - серный эфир - уксусная кислота (90:10:1). Количественно липидные фракции определяли гидроксаматным методом [10]. Их содержание рассчитывали в процентах от общей суммы липидов и к сухой массе.

Метилловые эфиры жирных кислот, фосфолипидов и триацилглицеридов получали прямым метилированием в абсолютном метаноле, содержащем 8% хлористого ацетила [12] и анализировали на газожидкостном хроматографе «Хром-41» на полярной фазе - 15% -ный Reoplex-400 на Хроматоне N-AW-DMCS в изотермическом режиме при 190°C. Идентификацию жирных кислот проводили сравнением со временами удерживания метчиков, а также по совпадению вычисленных эквивалентных длин цепей молекул с табличными данными [15]. Относительное содержание отдельных кислот определяли по Бартлету и Айверсону [14] и рассчитывали в процентах от суммы всех жирных кислот.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты анализа тканевых липидов карпа (рис.1) показали, что в печени голодающих иммунизированных карпов при спонтанном аэромонозе содержится больше фосфолипидов, чем у питающихся (8,5 и 6,4% от сухой массы соответственно). Липидный состав почек у голодных карпов также отличался повышенным уровнем фосфолипидов по сравнению с питающимися, составляя 9,7 и 7,8% от сухой массы соответственно. При этом следует отметить более высокое (в 2,5 раза) содержание холестерина в почках питающихся особей. В мышцах голодающих рыб тенденция к увеличению уровня фосфолипидов сохранилась, но количественно была менее выражена. В то же время доля холестерина в сумме всех липидов оказалась ниже, чем у питающихся. У голодных больных рыб вследствие повышенного содержания фосфолипидов (ФЛ) и меньшего холестерина (Х), коэффициент Дьердьи (Х/ФЛ), характеризующий вяз-

костные свойства мембран, оказался ниже, чем у питающихся. Уровень запасных липидов во всех изученных тканях у питающихся рыб был выше, чем у голодающих. При этом триацилглицеринов оказалось значительно больше в мышцах, а эфиров холестерина (ЭХ) – в почках. Коэффициент эстерификации (ЭХ/Х), по которому косвенно можно судить об уровне патологии, оказался значительно выше в печени и мышцах сытых рыб и не отличался в почках у разных по типу питания карпов.

При изучении жирнокислотного состава мембранных липидов у иммунизированных больных рыб найдены специфические различия в количественных соотношениях отдельных жирных кислот между исследованными вариантами (рис. 1). Так, фосфолипиды печени голодающих рыб содержали на 10% больше полиненасыщенных жирных кислот, в основном за счет эйкозапентаеновой, и в меньшей степени докоза-тетраеновой, докозапентаеновой и докозагексаеновой при снижении доли пальмитиновой и стеариновой кислот по сравнению с питающимися особями. В мембранных липидах почек у голодных карпов отмечена лишь тенденция к повышению концентрации полиеновых кислот по сравнению с сытыми за счет докозагексаеновой кислоты. Фосфолипиды мышц голодных рыб при спонтанном аэромонозе отличались от сытых более высоким содержанием пальмитиновой и стеариновой кислот при меньшей концентрации длинноцепочечных ненасыщенных кислот, в основном докозапентаеновой.

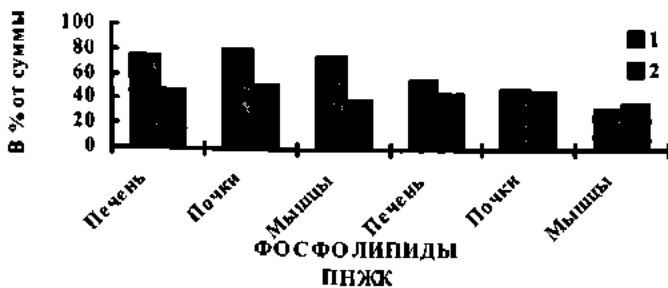


Рис. 1. Уровень фосфолипидов и полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в тканях голодающих и питающихся карпов при спонтанном аэромонозе после иммунизации. 1 – голодающие; 2 – питающиеся.

Жирнокислотный состав триацилглицеринов у карпов из разных вариантов опыта значительно различался для всех исследованных тканей. В печени голодных рыб оказалось

значительно меньше ненасыщенных жирных кислот: моноеновых и полиеновых, при повышенном уровне насыщенных, преимущественно пальмитиновой кислоты по сравнению с сытыми особями. В запасных липидах почек обнаружено больше полиеновых кислот, в основном докозагексаеновой. В мышцах голодных карпов уровень полиеновых кислот превалировал над таковым питающихся (48 и 20% соответственно) за счет снижения уровня моноеновых, преимущественно олеиновой кислоты.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При сопоставлении полученных результатов обнаружено, что при спонтанном аэромонозе после иммунизации различия в ответных реакциях на уровне липидного обмена в значительной степени связаны с перестройками мембранных структур клеток. Показан рост уровня фосфолипидов во всех изученных тканях в обоих вариантах эксперимента. Но у голодавших иммунизированных карпов в печени и почках выявлена более высокая концентрация фосфолипидов и более низкая – холестерина, чем у питающихся особей, что свидетельствует о более высокой жидкости мембран клеток этих органов.

Отличия в жирнокислотных спектрах имели специфический характер для разных тканей больных рыб. При этом у голодающих карпов в печени и почках отмечалось усиление синтеза фосфолипидов, содержащих ненасыщенные длинноцепочечные жирные кислоты. Увеличение доли полиеновых кислот считается одним из механизмов адаптивного повышения функциональной активности мембранных структур. Полиеновые жирные кислоты модулируют проницаемость мембран, транспортные свойства, активность многих мембраносвязанных ферментов [8]. И оптимизация структурной организации клеток таких органов, как печень и почки, участвующих в детоксикации, вносит вклад в поддержание гомеостаза в организме рыб. Поэтому повышенный уровень полиеновых кислот в фосфолипидах этих органов у голодных иммунизированных рыб при аэромонозе в известной мере можно рассматривать как усиление защитной функции по сравнению с питающимися. В частности, значительно большая ненасыщенность жирных кислот наряду с меньшей величиной коэффициента Дьердьи в печени и почках голодающих карпов указывают на пониженную вязкость мембранных структур по сравнению с питающими-

мися особями, что должно обеспечивать более высокую активность монооксигеназ, участвующих в процессах детоксикации. Причем, в печени это было выражено в большей степени, чем в почках.

О тесной связи между уровнем полиеновых жирных кислот, в основном докозагексаеновой и арахидоновой, и физиологическим состоянием организма свидетельствуют и другие литературные данные [1, 2], но реакция не является универсальной. Следует отметить, что если у неиммунизированных карпов постинфекционные изменения были связаны с увеличением в печени и крови доли полиненасыщенных жирных кислот за счет докозагексаеновой и арахидоновой [3], то в данном эксперименте иммунизация приводила к повышению в печени преимущественно уровня эйкозапентаеновой кислоты.

Учитывая важную роль фосфолипидов в структурной организации мембран, можно предположить, что у сытых рыб нарушена ориентация реакций пластического обмена с участием жирнокислотных радикалов сложных липидов. Источником этих кислот для фосфолипидов могут быть запасные липиды мышечной ткани при их гидролизе в условиях стресса. Это, вероятно, и происходило у голодавших больных карпов, в мышцах которых доля полиеновых кислот в триацилглицеринах значительно ниже, чем у питающихся. Высокий уровень этих кислот в мышцах сытых особей при продолжающемся накоплении запасных липидов в процессе питания предполагает нарушение адаптивной направленности метаболизма липидов.

Обсуждаемые липидные показатели в печени и почках, несомненно, связаны с иммунологической реактивностью рыб. Так, ранее нами была обнаружена корреляция между уровнем полиеновых кислот в печени, цельной крови и лимфоцитах у голодных карпов при аэромонозе [5]. Поэтому более активный синтез фосфолипидов с ненасыщенными жирными кислотами в печени голодных иммунизированных рыб, в отличие от питающихся, должен обеспечить увеличение их содержания в мембранных липидах иммунокомпетентных клеток. Исследование липидного состава лимфоцитов у неиммунизированных рыб показало повышение уровня докозагексаеновой и арахидоновой кислот в их мембранах в постинфекционный период. В то же время сравнение жирнокислотных спектров лимфоцитов у разных по физиологическому состоянию рыб показали, что у «сильных» рыб они содержали значительно больше эйкозапента-

еновой кислоты, чем у «слабых» [5]. Есть основание предположить, что в стимуляции иммунных реакций карпов эйкозапентаеновая кислота играет более существенную роль, чем докозагексаеновая.

Подтверждением участия полиеновых кислот в активации лимфоцитов могут служить данные по теплокровным животным, показавшие повышение скорости включения длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот, в частности, арахидоновой в фосфолипиды лимфоцитов при применении специфических стимуляторов активности, в том числе бактериальных антигенов [16]. Полиеновые кислоты переводят мембранные структуры в состояние, необходимое для активизации ферментных констелляций иммунокомпетентных клеток, особенно дегидрогеназ, тесно связанных со способностью клеток к участию в иммуногенезе [13]. В частности, показано, что активность сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1), входящей в систему энергообеспечения лимфоцитов, прямо пропорциональна степени ненасыщенности липидов в мембране [8]. Поскольку субпопуляция лимфоцитов у карпа состоит из аналогов Т- и В-лимфоцитов млекопитающих и клеток, выполняющих смешанные функции [11], то повышенная ненасыщенность фосфолипидов у голодающих рыб при аэромонозе может сопровождаться усилением как фагоцитарной, так и антителообразующей способностей.

Таким образом, выявлены поствакцинальные различия липидного состава у голодающих и питающихся карпов при спонтанном аэромонозе, которые наряду с тканевой резистентностью обеспечивают также иммунологическую реактивность рыб. У иммунизированных голодающих рыб при аэромонозе повышенное содержание в печени и почках фосфолипидов, содержащих полиеновые жирные кислоты (эйкозапентаеновую преимущественно в печени) по сравнению с питающимися, затрагивает как структуру мембран, так и процессы энергообеспечения, что должно определять более высокий уровень детоксикационной способности этих органов, а также активности клеточных механизмов иммунного ответа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белковский Н.М. Жирнокислотный состав липидов зимующих сеголеток карпа *Cyprinus carpio* L. // Биохимия экто- и эндотермных организмов в норме и при патологии. Петрозаводск: Карельский научный центр АН СССР. 1990. С. 145-156.

2. Богдан В.В., Лысенко П.В., Яржомбек А.А. Липидный состав печени и мышц годовиков карпа после зимовки // Сравнительная биохимия водных животных. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. 1983. С. 66-72.

3. Богдан В.В., Смирнов Л.П. Изменение фосфолипидного состава крови у разных по физиологическому состоянию карпов при аэромонозе // Биохимия экто- и эндотермных организмов в норме и при патологии. Петрозаводск: Карельский научный центр АН СССР. 1990. С. 116-120.

4. Богдан В.В., Смирнов Л.П. Влияние аэромонадной инфекции на мембранные липиды некоторых тканей питающихся и голодающих годовиков карпа *Cyprinus carpio* // Вопр. ихтиол. 2000. Т. 40, № 1. С. 128-132.

5. Богдан В.В., Смирнов Л.П., Сидоров В.С. Липидный состав лимфоцитов крови карпа при бактериальной инфекции // Прикл. биох. и микробиол. 2002. Т. 38, №2. С. 190-193.

6. Дятловицкая Э.В., Безуглов В.Д. Липиды как биоэффекторы. Введение // Биохимия. 1998. Т. 63, вып. 1. С. 3-5.

7. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 322 с.

8. Крекс Е.М. Липиды клеточных мембран. Л.: Наука. 1981. 339 с.

9. Лукьяненко В.И. Иммунобиология рыб. М.: Пищепром. 1971. 364 с.

10. Сидоров В.С., Лизенко Е.И., Болгова О.М., Нефедова З.А. Липиды рыб. I. Методы анализа тканевая специфичность липидов ряпушки *Coregonus albula* // Лососевые (Salmonidae) Карелии. 1972. Вып. 1. С. 152-163.

11. Степанова В.М., Микряков В.Р. Использование метода Мендеса для изучения субпопуляций лимфоцитов карпа (*Cyprinus carpio* L.) // Биология внутренних вод. 2002. № 3. С. 84-87.

12. Цыганов Э.П. Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагеля // Лаб. дело. 1971, №8. С.490-493.

13. Шишова М.Б., Калинин А.А., Мкреецков В.В., Сарычева Н.Ю. Влияние тафцина на активность некоторых ферментов энергетического метаболизма лимфоцитов // Бюлл. exper. биологии и медицины. 1983. № 5. С. 55-57.

14. Bartlett J., Iverson J.L. Estimation of fatty acid composition by gas chromatography using peak heights and retention time // J. Assoc. Offic. Analytical Chem. 1966. V.49. N1. P. 21-27.

15. Jamieson G.R. GLC-identification techniques for long-

chain unsaturated fatty acids // J. Chromatogr. Sci. 1975. V. 13, № 10. 491-497.

16. Resch K., Ferber E. The role of phospholipids in lymphocyte activation. // Immune recognition. New York: Academic Press. 1975. P. 281-312.

FEATURES OF LIPIDIC EXCHANGE AT IMMUNIZED STARVING AND EATING CARPS AT SPONTANEOUS AEROMONOSIS

V.V.Bogdan, L.P.Smirnov, L.N.Juhimenko
lsmirnov@krc.karelia.ru; leo46@onego.ru

Distinctions in lipidic and fatty acid structure of some fabrics at starving and eating carps are revealed at spontaneous aeromonosis after immunization which alongside with tissues resistance provides also immunological reactance of fishes. At immunized starving fishes at aeromonosis the increased contents of phospholipids in a liver and kidneys, containing polyenic fat acids (acosopentaenic mainly in a liver) in comparison with eating, mentions both structure of membranes, and processes supply, that should define more a high level of detoxic abilities of these bodies, and also activity of cellular mechanisms of the immune answer.

УДК 597-11:639.3.03(282.247.41)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА РЫБ ДЕЛЬТЫ ВОЛГИ И РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

О. М. Валедская
ФГУП «КаспНИРХ», 414056, г. Астрахань, ул. Савушкина 1.
414011, г. Астрахань, пер. Алуштинский д.4,
proxima@mail.ru

Статья посвящена изучению естественного иммунитета четырех видов рыб дельты Волги - судака, сома, белорыбицы и севрюги. Показано, что в нормально-физиологическом состоянии у всех рыб пропорционально представлены как клеточные, так и гуморальные составляющие иммунореактивности.

Показано, что при отборе производителей судака для воспроизводства рекомендуется проводить оценку напряженности иммунитета, с целью исключения попадания рыб из группы риска по дерматофибросаркоме, у которых средний цитохимический коэффициент в лизосомально-катионном тесте меньше 1,00, ин-

декс Бредекка меньше 4,0, бактериостатическая активность сыворотки более 60% и уровень иммуноглобулинов более 0,9 г/л.

При заготовке производителей сома для нерестово-выростных хозяйств их следует отбирать в тех районах лова, где иммунореактивность рыб высокая, что снижает количество особей с иммунодефицитом, у которых более высока вероятность развития заболеваний, в том числе и папилломатоза.

Определен иммунный статус половозрелой белорыбицы. Выявлена корреляционная связь между уровнем иммуноглобулинов у производителей и процентом оплодотворения икры.

На основании иммунологического скрининга севриги для целей искусственного воспроизводства рекомендуется использовать самок с уровнем иммуноглобулинов в сыворотке крови не менее 0,8 г/л и не более 1,8-2,0 г/л.

ВВЕДЕНИЕ.

Одним из путей сохранения видового разнообразия ихтиофауны дельты Волги является искусственное воспроизводство ценных и исчезающих видов рыб, которое в условиях постоянно меняющейся экологической обстановки вносит ощутимый вклад в поддержание численности осетровых рыб и белорыбицы [5, 12].

Несмотря на некоторое сокращение загрязнения волжских вод, экологическое состояние гидросферы остается неблагоприятным. Содержание многих токсикантов превышает предельно допустимые концентрации. Это, прежде всего, нефтеуглеводороды, фенолы, тяжелые металлы, особенно медь и цинк [6], большинство из которых способны изменять иммунореактивность гидробионтов.

Условия жизни гидробионтов в результате усиления антропогенного влияния на гидросферу в значительной мере отличаются от тех, которые имели место ранее. Изменение гидрологического и гидрохимического режима, увеличивающаяся эвтрофикация приводят к перераспределению численности ихтиофауны [14, 7], модифицируются отношения в системе паразит-хозяин, появляются новые и исчезают регистрируемые ранее заболевания [9].

Успешное выживание гидробионтов в постоянно меняющихся условиях обеспечивается системой поддержания гомеостаза, одной из составляющих частей которой является иммунитет. Поэтому цель настоящей работы - дать представление о функционировании иммунной системы рыб дельты Волги на примере судака, сома, белорыбицы и севриги, а также выявить закономерности изменения их иммунореактивности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Объектами исследований служили судак (*Lucioperca lucioperca*, L.), сом (*Silurus glanis*, L.), белорыбца (*Stenodus leucichthys* Guldenstadti) и севрюга (*Acipenser stellatus* Pallas).

Всего иммунологическому обследованию подвергнуто 832 экз. судака, 273 сома, 210 белорыбца и 147 особей севрюги.

В исследованиях использовался комплекс иммунологических методов, включающий лизосомально-катионный тест [13], индекс Бредекка [3], бактериостатическая активность сыворотки крови [11], уровень циркулирующих иммунных комплексов [15] и иммуноглобулинов [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Результаты иммунологического обследования рыб дельты Волги представлены в таблице 1.

У всех обследованных рыб показатели как клеточного, так и гуморального иммунитета оказались достаточно хорошо выраженными.

Лизосомально-катионный тест характеризует обеспеченность нейтрофилов неферментными катионными белками. У белорыбца он был самым низким и достоверно отличался от других обследованных рыб - судака ($P < 0,001$), сома ($P < 0,05$) и севрюги ($P < 0,005$). У сома он был достоверно ниже, чем у судака ($P < 0,001$). У севрюги он, достоверно отличаясь от такового у сома ($P < 0,05$) и белорыбца ($P < 0,005$), приближался к уровню судака ($P > 0,05$).

Индекс Бредекка отражает относительное содержание различных классов лейкоцитов. Как видно из таблицы 1, все рыбы, за исключением белорыбца имели примерно одинаковые значения индекса Бредекка. Из четырех обследованных видов рыб у белорыбца наименьшее значение индекса Бредекка ($P < 0,001$).

Бактериостатическая активность сыворотки крови обеспечивается комплексом гуморальных факторов таких как естественные антитела, пропердин, лизоцим, комплемент и другие. По литературным данным, бактериостатическая активность сыворотки различных рыб варьирует в широких пределах - от 5-10% до 90-95% - в зависимости от вида и условий обитания рыб [10, 11]. В наших исследованиях рост бактерий подавлялся на 40-60%. Среди обследованных рыб самой высокой бактериостатической активностью сыворотки обладали севрюга и сом.

Показатели иммунитета рыб дельты Волги

Показатели	Судак	Сом	Белорыбца	Севрюга
Средний цветной коэффициент в лизосомально-катионном тесте	1,20±0,01	1,12±0,02	1,10±0,02	1,26±0,05
Индекс Бредекка	12,15±0,20	12,66±0,82	5,29±0,22	11,47±1,45
Бактериостатическая активность сыворотки, %	41,91±1,80	51,35±1,98	42,30±2,17	69,66±4,71
Уровень иммуноглобулинов, г/л	0,64±0,01	1,25±0,05	0,62±0,05	1,14±0,02
Циркулирующие иммунные комплексы, усл. ед.	0,033±0,003	0,026±0,006	0,046±0,007	0,033±0,002

Так же как и по бактериостатической активности, наиболее высокое содержание иммуноглобулинов у сома и севрюги, у судака и белорыбца - заметно ниже. Возможно, это связано с условиями обитания этих рыб. Судак - реофил, предпочитает участки с песчаным дном, чистой, проточной водой. Часть измерений бактериостатической активности сыворотки у белорыбца проводили ранней весной (феврале-апреле), когда температура воды еще низкая и ее микробная обсемененность невысокая [8, 9]. В отсутствие антигенного пресса не происходит активного синтеза антител, как, впрочем, и других факторов гуморального иммунитета.

В нормально-физиологическом состоянии концентрация циркулирующих иммунных комплексов невелика, что подтвердили и наши исследования. Их наибольшее количество выявлено у белорыбца.

Иммунологические исследования белорыбца проводили во время ее нерестового хода (март-апрель, температура воды 4-6 °С) при заготовке производителей для целей воспроизводства и при получении половых продуктов (октябрь-ноябрь, при температуре воды 6-7 °С и ниже). За это время в организме рыбы происходит важнейший процесс - созревание половых продуктов. Кроме этого, рыба переходит из соленой морской воды в пресную, где практически не питается. Все это сопряжено с перестройкой системы гомеостаза, в том числе и иммунореактивности (таб. 2.).

Миграция белорыбца в дельту Волги идет зимой и ранней весной, когда температуры воды еще низкие. В это время в волжской воде присутствует небольшое количество микроорганизмов [8, 9], способных стимулировать выработку антител и других иммунных факторов. Напряженность большинства изученных показателей имеет тенденцию к повышению в осенний период как результат физио-

логических изменений, происходящих при созревании половых продуктов и под воздействием достаточно сильного антигенного пресса при высоких летних и осенних температурах.

Таблица 2

Показатели иммунитета белорыбицы при заготовке производителей весной и осенью во время нерестовой кампании

Сезон	Средний цитохимический коэффициент	Индекс Бредекка	Бактериостатическая активность, %	Уровень иммуноглобулинов, г/л	Циркулирующие иммунные комплексы, усл. ед.
весна	1,10±0,07	5,30±0,24	45,57±2,06	0,53±0,07	0,043±0,003
осень	1,06±0,04	5,90±0,41	49,34±8,42	1,08±0,09	0,047±0,013

Статистический анализ многолетних данных показал, что достоверность этих изменений довольно низкая ($P > 0,05$), за исключением уровня иммуноглобулинов, где изменения статистически достоверны ($P < 0,001$).

Однако результаты наблюдений в отдельные годы говорят о достоверном увеличении не только уровня иммуноглобулинов, но и некоторых других факторов иммунитета к осени. Так, в 1995 и 1996 гг. достоверно изменялась бактериостатическая активность сыворотки крови ($P < 0,05$), в 1997 – уровень циркулирующих иммунных комплексов ($P < 0,001$). Все изменения касались различных показателей гуморального иммунитета, что определяется различным антигенным окружением в годы наблюдения.

Что касается многолетней динамики, то наиболее постоянным является средний цитохимический коэффициент в лизосомально-катионном тесте. В большинстве случаев осенью он несколько выше, чем весной, что свидетельствует о некоторой стимуляции иммунореактивности у белорыбицы в речной период жизни.

За все время наблюдения среднегодовое значение индекса Бредекка увеличивалось вплоть до 1997 г., а затем началось его постепенное уменьшение. Это, по-видимому, связано с колебаниями других факторов неспецифической резистентности. Что касается сезонных колебаний, то так же как и лизосомально-катионный тест, индекс Бредекка к осени несколько увеличивается, хотя это увеличение и не достигает порога достоверности.

Бактериостатическая активность сыворотки крови изменялась в достаточно широком диапазоне. Почти во все годы сохранялась общая тенденция увеличения показателя в осенний период.

Характер колебаний уровня иммуноглобулинов в целом также не отличался закономерностью. На протяжении всех лет наблюдения количество иммуноглобулинов достоверно повышалось в осенний период, что отражает реакцию организма на новую антигенную среду.

Пик накопления циркулирующих иммунных комплексов пришелся на 1995 г. В дальнейшем межгодовые колебания были небольшими. В отличие от остальных показателей сезонные изменения уровня циркулирующих иммунных комплексов носили противоположное направление, т. е. к осени их содержание уменьшалось.

По результатам иммунологического скрининга 2001 года была обнаружена обратная корреляция процента оплодотворяемости икры с гуморальными показателями у спонтанно созревших самок. Наиболее высокой проявлялась корреляция с уровнем иммуноглобулинов ($r = -0,91$). Ретроспективный анализ показал, что в период с 1990 по 1999 гг. экстремальным по качеству производителей и количеству полученной молоди был 1996 г. [1]. Именно в этот год наблюдается самая высокая бактериостатическая активность сыворотки крови и повышенное содержание иммуноглобулинов. Высоким содержанием иммуноглобулинов отличались самки, выловленные в предплотинной зоне Волгоградской ГЭС в 1999 году. Качество икры, полученной от этих самок, было невысоким [1].

Иммунологическое обследование севрюги проводили непосредственно в дельте Волги в момент заготовки производителей и на рыбоводных заводах во время получения икры.

Иммунный статус севрюги представлен в таблице 3. Обращает на себя внимание преобладание гуморальных факторов иммунореактивности. Это согласовывается с данными, полученными другими исследователями. Например, Лукьяненко В. И. [10], изучая естественную иммунореактивность различных видов рыб, отмечает самую высокую активность пропердина в сыворотке крови осетровых, сравнимую с таковой у некоторых высших позвоночных. Средняя активность комплемента у осетровых в 5-10 раз выше, чем у большинства карповых рыб (синец, сазан, карась, чехонь). Высокую активность сывороточных компонентов у осетровых отмечали в своих исследованиях Микряков В. Р. [11], Вихман А. А. [2] и др..

В табл. 3 представлены данные о состоянии иммунитета севрюги в дельте Волги и на различных осетровых рыбоводных заводах (ОРЗ).

Таблица 3

Показатели иммунитета севрюги в дельте Волги и на ОРЗ

Место отбора проб	Средний цитохимический коэффициент	Индекс Бредекка	Бактериостатическая активность, %	Уровень Иммуноглобулинов, г/л
Дельта Волги	1,40±0,08	6,69±1,18	42,91±4,78	1,46±0,13
ОРЗ «Бертюльский»	1,06±0,05	18,26±2,66	76,34±4,68	0,86±0,07
ОРЗ «Лебяжий»	0,93±0,05	9,75±1,21	74,11±2,82	0,97±0,06

Как видно из таблицы 3, после вылова и доставки производителей на ОРЗ происходит заметное изменение иммунного статуса. Достоверно снижается активность нейтрофилов в лизосомально-катионном тесте у рыб как с ОРЗ «Бертюльский» ($P < 0,005$), так и с ОРЗ «Лебяжий» ($P < 0,001$). Изменялось и относительное содержание различных групп лейкоцитов, что привело к резкому увеличению индекса Бредекка у севрюги на ОРЗ «Бертюльский» ($P < 0,001$). Увеличение индекса Бредекка у рыб на ОРЗ «Лебяжий» было менее выраженным и не достигло порога достоверности.

У производителей на рыбоводных заводах заметно возросли бактериостатические свойства сыворотки крови ($P < 0,001$), причем на ОРЗ «Бертюльский» более выражено, чем на ОРЗ «Лебяжий». Так как в это же время наблюдается снижение содержания иммуноглобулинов на обоих заводах ($P < 0,001$), то, следовательно, усиление бактерицидности произошло за счет неспецифических факторов — лизоцима, пропердина, комплемента, С-реактивного белка и т. п.

Таким образом, выявлены достоверные отличия в иммунном статусе севрюги, выловленной в дельте Волги и у производителей с различных рыбоводных заводов. Снижение активности нейтрофилов в лизосомально-катионном тесте и уровня иммуноглобулинов свидетельствуют об истощении этих механизмов иммунореактивности. Повышение бактериостатической активности сыворотки следует расценивать как компенсаторную реакцию. Причиной такой перестройки иммунореактивности производителей является стресс, вызванный выловом и перевозкой рыбы к месту расположения рыбоводных заводов, которые находятся на различном расстоянии от места заготовки производителей. В целом следует отметить тот факт, что у производителей севрюги с ОРЗ «Лебяжий» все показатели иммунитета были ниже, чем на ОРЗ «Бертюльский». Это связано с более продолжитель-

ным стрессированием рыбы при перевозке, так как ОРЗ «Лябязный» располагается дальше от места заготовки сеvрюги.

Корреляционный анализ индивидуальных показателей иммунитета с процентом оплодотворения полученной икры показал наличие связи некоторых параметров, что отражает опосредованное влияние иммунного статуса на общее физиологическое состояние, а следовательно и на качество икры. Выявлена прямая корреляция процента оплодотворения икры сеvрюги и напряженности гуморальных факторов иммунитета и обратная – от клеточного звена иммунореактивности. Наиболее убедительной ($\eta = 0,74$) оказалась зависимость процента оплодотворения от уровня иммуноглобулинов. Наилучший процент оплодотворения отмечался у рыб, уровень иммуноглобулинов которых находился в пределах 1,0-1,5 г/л. Теоретический расчет по уравнению регрессии ($y = - 63,965x^2 + 191,99x - 47,304$) показал, что при содержании иммуноглобулинов в пределах от 0,8 до 1,8 г/л процент оплодотворения икры будет выше 50%, поэтому в рыбоводном процессе рекомендуется использовать самок, у которых уровень иммуноглобулинов попадает в эти границы.

После разработки биотехнологии искусственного воспроизводства судака и ее успешного применения на рыбоводных заводах одной из основных задач стало обеспечение предприятий здоровыми производителями. Одним из наиболее опасных вирусных заболеваний судака в дельте Волги остается дерматофибросаркома. Развитие опухоли сопровождается закономерным изменением иммунореактивности: происходит подавление клеточных составляющих естественного иммунитета и стимулирование гуморального звена. Это позволяет новообразованию более или менее успешно противостоять иммунологическому контролю со стороны организма.

Проведение иммунологического скрининга в местах, неблагоприятных по данному заболеванию (определенных на основании эпизоотического мониторинга), показало наличие рыб с измененным иммунным статусом, близким к таковому у больных особей. Так, в неблагоприятных районах примерно у 31,5% рыб отмечалось повышение бактерицидной активности сыворотки крови, у 35,8% увеличивалось количество циркулирующих иммунных комплексов, у 26,3% возрастал уровень иммуноглобулинов, у 34,0% снижалась активность нейтрофилов в лизосомально-катионном тесте, у 15,0% понижался индекс Бредекка и у 18,5% увеличивался показатель повреждения нейтрофилов. Динамика из-

менения количества рыб, отнесенных в группу риска, в разные годы исследования повторяет динамику колебания заболеваемости судака дерматофибросаркомой.

Это может быть обусловлено либо латентным периодом заболевания, либо особенностями иммунитета рыбы. В любом случае у этих рыб велика вероятность проявления дерматофибросаркомы, и их можно выделить в группу риска по опухолевому заболеванию, что необходимо учитывать при проведении акклиматизационных и рыбоводных работ.

Сом как объект аквакультуры используется для посадки в нерес-тово-выростные хозяйства. Основная задача при его заготовке, так же как и для других видов рыб, - это отбор качественных производителей, не только по рыбоводным, но и по иммуно-физиологическим критериям. У сома, как и у судака, достаточно часто регистрируется опухолевое заболевание вирусной природы [9].

Папилломатоз сопровождается развитием иммунодефицитного состояния: средний цветной коэффициент в лизосомально-катионном тесте снижается до $0,74 \pm 0,05$, индекс Бредекка - до $8,86 \pm 0,83$, уровень иммуноглобулинов - до $1,08 \pm 0,07$ г/л, содержание циркулирующих иммунных комплексов - до $0,013 \pm 0,001$ усл. ед.. Поэтому при отборе рыб для рыбоводных и акклиматизационных работ необходимо проводить экспертную оценку иммунного статуса сома в местах вылова с целью уменьшения попадания особей с признаками иммунодефицита, что позволит уменьшить заболеваемость не только папилломой, но и другими инфекционными и инвазионными заболеваниями.

ВЫВОДЫ

1. Иммунная система обследованных рыб представлена достаточно хорошо выраженными клеточными и гуморальными компонентами.

2. У белорыбицы, заходящей на нерест в дельту Волги, происходит достоверное увеличение количества иммуноглобулинов в осенний период, что требует постоянного контроля, так как высокий темп роста этого показателя свидетельствует о неблагополучии состояния рыбы и как, следствие, возможно ухудшение качества получаемой икры.

3. Иммунный статус северяги после поимки и доставки на рыбоводные заводы снижается. Направленное воздействие на иммунную систему производителей, а именно ведущее к увеличению гуморальных составляющих и особенно уровня

иммуноглобулинов, опосредованно приведет к улучшению оплодотворяемости икры севрюги.

4. При заготовке судака для целей искусственного воспроизводства рекомендуется проводить определение иммунного статуса этого вида рыб в местах заготовки. При наличии большого количества рыб с измененным иммунитетом («группа риска по дерматофибросаркоме») отбор производителей следует прекратить.

5. Отлов сома для зарыбления нерестово-выростных хозяйств лучше всего проводить в местах, где общая иммунореактивность рыб выше.

6. Включение иммунологических тестов в систему оценки качества объектов аквакультуры позволит не только оздоровить производителей, используемых для получения половых продуктов, но и в определенной степени повысить эффективность искусственного воспроизводства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильченко О. Н., Шабанова Д. А., Карпунина Н. В. Структура и воспроизводительная способность нерестовых популяций белорыбицы. // Биология, биотехника разведения и промышленного выращивания сиговых рыб. – Тюмень, 2001. – С. 30-33.

2. Вихман А.А. Системный анализ иммунологической реактивности рыб в условиях аквакультуры. – М.: Экспеди-тор, 1996, 148 с.

3. Волегов А.И. Устойчивости организма к злокачественным опухолям. - М., Медицина. - 1987. - 240с.

4. Воловенко М.А. Определение уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови новорожденных телят // Ветеринария. - 1975. - N4. - С. 100-104.

5. Иванов В.П., Михайлова М.В. Состояние запасов основных промысловых рыб и их воспроизводство в бассейне Каспийского моря//Материалы Всероссийского совещания «Искусственное воспроизводство и охрана ценных видов рыб» (г. Южно-Сахалинск, 28 августа-1 сентября 2000) – Москва, 2001. – с.219-227.

6. Катунин Д. Н., Курочкина Т. Ф., Насибулина Б. М., Попова О. В., Хорошко В. И., Рылина О. Н., Ивлиева Л. М., Мироненко О. Е., Даирова Д.С. Эколого-токсикологическая характеристика Волго-Каспийского бассейна в современных условиях. // Сб. “Рыбохозяйственные исследования на Каспии: результаты НИР за 2000 г.” – Астрахань, изд-во Кас-

пНИРХа, 2001. – С. 35-42.

7. *Кушнарченко А. И., Кузнецов Ю. А., Родионова О. В., Никитин Э. В.* Состояние запасов крупных пресноводных рыб. // Сб. "Рыбохозяйственные исследования на Каспии: результаты НИР за 2001г." – Астрахань, изд-во КаспНИРХа, 2002. С236-247.

8. *Ларцева Л. В.* Гигиеническая оценка по микробиологическим показателям рыбы и рыбных продуктов Волго-Каспийского региона.// Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.б.н. – Астрахань, издательство КаспНИРХ., 1998. – 44 с.1998,

9. *Ларцева Л. В., Вьюшкова Л. А., Проскурина В. В., Дубовская О. В., Митрофанова Е. С., Нестерова Л. А., Воронина Е. А., Манова И. Б.* Мониторинг инвазий промысловых видов рыб. Оценка санитарного состояния водоема.// Сб. "Рыбохозяйственные исследования на Каспии: результаты НИР за 2001г." – Астрахань, изд-во КаспНИРХа, 2002. С. 536–547.

10. *Лукьяненко В.И.* Иммунология рыб. Врожденный иммунитет. - М., Агропромиздат. - 1989. - 271с.

11. *Микряков В.Р.* Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. – Рыбинск, 1991. – 154с.

12. *Михайлова М.В.* Искусственное воспроизводство осетровых в Волго-Каспийском регионе: вчера, сегодня, завтра. // Научно-производственный журнал «Рыбоводство и рыболовство». 2001. С.45-46.

13. *Пигаревский В.Е., Мазинг Ю.А.* К методике применения лизосомально-катионного теста в лабораторной диагностической практике. // Лаб. дело. - 1981. - N10. - С.579-582 1981,

14. *Седов С. И., Парицкий Ю. А., Колосюк Г.Г.* Состояние запасов и прогноз их вылова на 2003. - Сб. "Рыбохозяйственные исследования на Каспии: результаты НИР за 2001г." – Астрахань, изд-во КаспНИРХа, 2002. С 336-340.

15. *Силкин И. Ф., Стафани Д. В., Виноградова Т. В.* Методика определения концентрации циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови рыб. // Тез. докл. «Экологическая физиология и био-химия рыб». - Ярославль. - 1989. - Т.2. - С.141-142.

RESULTS OF STUDYING OF THE FISH IMMUNE STATUS OF VOLGA'S DELTA AND RECOMMENDATIONS FOR THEIR USE

O.M.Valedskaja

The article is devoted to studying of natural immunity of four kinds of fishes of Volga's delta - a pike perch, a catfish, an inconnu and a starred sturgeon. It is shown, that in a normal - physiological condition at all fishes are proportionally submitted as cellular, and humoral components of immunoreactivity.

It is shown, that at selection of manufacturers of a pike perch for reproduction it is recommended to carry out an estimation of intensity of immunity, with the purpose of exception of hit of fishes of group of risk on dermatofibrosarcoma at which average the cytochemical factor in the lysosomal cationic test is less 1,00, index Bredecc is less 4,0, bacteriostatic activity of whey more than 60 % and a level of immunoglobulins more than 0,9 g/l.

At preparation of manufacturers of a catfish for spawning-growing facilities of them it is necessary to select in those areas of haul where the fish immunoreactivity was high, that reduces amount of animal with immunodeficiency at which probability of development of diseases including papillomatosis is higher.

The immune status of mature inconnu is determined. Correlation communication between a level of immunoglobulins at manufacturers and interest of fertilisation of caviar is revealed.

On the basis of immunological scrining of starred sturgeon for the purposes of artificial reproduction it is recommended to use females with a level of immunoglobulins in whey of blood not less than 0,8 g/l and no more than 1,8-2,0 g/l.

УДК: 597 – 12: 576.85: 639. 371. 52

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКА АЭРОМОНАДНОЙ ИНФЕКЦИИ КАРПА (CYPRINUS CARPIO L.)

Гаврилин К.В., Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И.
ФГУП «ВНИИПРХ» 141821 п/о Рыбное Дмитровский р-он
Московской области, vniiprh@dmitrov.ru

Бактериальная геморрагическая септицемия уже многие десятилетия является серьёзной проблемой рыбоводства. Наиболее рациональным в борьбе с данным заболеванием представляется использование экологи-

чески чистых препаратов, повышающих устойчивость организма рыбы, к которым относятся и корпускулярные вакцины - бактериины.

В 1998 г. начаты работы по получению вакцины для групповой обработки рыбы методом прямой иммерсии. Установлена концентрация бактерина, дающая наибольший иммуногенный эффект - 10^9 микробных клеток в 1 мл рабочего раствора, и оптимальная длительность обработки - 10 мин.

Иммуно-протективные свойства бактерина изучены в экспериментально- производственных условиях. Средний титр агглютининов к гомологичному штамму *A.sobria* 77-18 и к гетерологичным *A.sobria* 300-32п и *A.sobria* 55-15пч в опытных группах статистически достоверно ($P > 0,01$) превысил таковой в контрольной, а количество карпов со значительными изменениями во внутренних органах в контрольных группах заметно превосходит такое же количество в опытных.

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальная геморрагическая септицемия (БГС) уже долгое время является серьёзной проблемой отечественного рыбоводства. Особенно она актуальна для Европейской части Российской Федерации, где аквакультура базируется в основном на выращивании товарного карпа, наиболее восприимчивого к данному заболеванию [12, 9]. Следует учитывать, что речь идёт не только о гибели выращиваемой рыбы, но и о не рациональном расходовании энергетических и пластических ресурсов, направленных на поддержание гомеостаза и элиминацию внедрившихся патогенов, а не на продукционный рост [7].

Этиологическими агентами данного заболевания в основном являются подвижные аэромонады - неотъемлемая часть сапрофитного звена водного микробиоценоза. В воде рыбноводных прудов аэромонады встречаются всегда, а эпизоотическое благополучие хозяйства зависит от их количества, вирулентности и этиологической структуры [6, 8].

Причина развития заболевания кроется в изменении экологических связей аэромонад, повышении их вирулентности, обусловленном, с одной стороны, несовершенством биотехнологии культивирования рыбы, приводящим её к физиологическим дисфункциям и снижению иммунного статуса, а, с другой стороны, - в пренебрежении санитарно-про-

филактическими мероприятиями по ликвидации чрезмерного органического загрязнения в интенсивно эксплуатируемых рыбоводных прудах [3, 1]. В этих условиях, наряду с аэромонадами, болезнетворными агентами последние годы выступают и некоторые другие условно-патогенные для рыб грамотрицательные бактерии (представители рр. *Acinetobacter*, *Moraxella*, сем. *Enterobacteriaceae*).

Учитывая видовое и родовое разнообразие микроорганизмов, разный диапазон их чувствительности к антибактериальным препаратам, способность многих патогенов рыб, в частности аэромонад, к быстрому формированию антибиотикорезистентности [13, 11], наиболее рациональным в борьбе с данным заболеванием является использование экологически чистых препаратов, повышающих резистентность организма рыбы, позволяющих ей осуществлять нормальную жизнедеятельность в условиях неблагоприятия окружающей среды.

Принципиальную возможность специфической иммунопрофилактики аэромонадной инфекции продемонстрировал в 30-е г. прошлого века В. Шаперклаус. В лабораторных опытах и в производственных экспериментах, проведённых в 40-е г., было доказано, что инъекция карпу инaktivированного антигена вызывает у него формирование иммунитета [14].

Крупным успехом в иммунопрофилактике аэромоноза рыб в наши дни стало создание в лаборатории ихтиопатологии ВНИИПРХ совместно с Карельским филиалом РАН биохимической вакцины ВЮС-2. Лабораторные и производственные испытания продемонстрировали высокие иммуногенные и протективные свойства препарата, не имеющего аналогов в мире [4, 5, 7, 15]. Широкое использование вакцины было ограничено трудоёмким и требующим специальных навыков способом введения антигена (внутрибрюшинная инъекция).

Попыткой преодолеть это препятствие стали начатые в 1998 г. работы по получению вакцины для групповой обработки рыбы. Препарат должен был вводиться рыбе методом иммерсии, т.е. купания её во взвеси убитых бактериальных клеток. В качестве продуцента бактериина был выбран штамм *Aeromonas sobria* 77-18, являющийся облигатным высоковирулентным патогеном рыб и использованный при создании вакцины ВЮС-2.

Бактерин изготовлялся в лабораторных условиях. После накопления бактериальной массы на эритроагаре её дважды отмывали изотоническим раствором хлорида натрия с последующим центрифугированием. Полученный осадок ресуспендировали и обрабатывали формалином. Затем делали контрольные высевы на эритроагар для подтверждения стерильности бактерины. Протективный эффект вакцинации оценивали в биопробе и выражали через индекс защиты [10] при заражении карпов высоковирулентным штаммом аэромонад, выделенным от рыбы.

Базой для экспериментально-производственной работы служили пруды ЭПО ВНИИПРХ «Якоть». Исследования велись общепринятыми ихтиопатологическими, микробиологическими и иммунологическими методами (реакция микроагглютинации). Определение титров циркулирующих антител сыворотки крови проводилось по отношению к гомологичному (*Aeromonas sobria* 77-18) и гетерологичным (*A.sobria* 300-32п и *A.sobria* 56-15пч) высоковирулентным штаммам аэромонад, выделенным при микробиологическом исследовании рыб на ЭПО «Якоть» и ОАО «Бисеровский рыбокомбинат».

Для статистической оценки достоверности различия средних величин, полученных при учёте результатов реакции агглютинации, использовался *t*-критерий Стьюдента при уровне значимости 95% [2].

Условия проведённого в 2002 г. эксперимента были максимально приближены к производственным, т.е. рыбоводный процесс на экспериментальных прудах не отличался от принятых технологических норм. В два нагульных пруда (4 и 5) было посажено 4 группы годовиков карпа. В каждом пруду 60% рыбы были помечены и привакцинированы бактерином в транспортировочной ёмкости при перевозке в нагульные пруды. Они составили опытные группы карпов прудов 4 и 5 (О-4 и О-5), остальные 40% годовиков - группы контроля (К-4 и К-5).

Весной 2003 г. была проведена сравнительная оценка вакцинированных и интактных карпов после зимовки. В качестве контроля к группе вакцинированных весной 2002 г. рыб (В) были взяты товарные карпы того же возраста и сходной массы (НВ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Серия экспериментов, проведённых в аквариальных условиях, позволила установить концентрацию бактериона, дающую наибольший иммуногенный эффект, как 10^9 микробных клеток в 1 мл рабочего раствора, и оптимальную длительность обработки – 10 мин. Защитный эффект, оказываемый бактерином при данных условиях, изменялся в зависимости от способа заражения, но был достаточно выраженным и коррелировал с иммуногенным эффектом (табл. 1).

Таблица 1
Иммуногенная активность и протективное действие бактериона при различных способах заражения рыбы

Группа рыб	Кол-во шт.	Метод заражения	Кол-во погибших рыб	Индекс защиты	Титр антител
Опыт	20	Внутримышечная инъекция	13	35%	1:8 – 1:64
Контроль	20	инъекция	20		1:2 – 1:16
Опыт	20	Внутрибрюшинная инъекция	0	100%	1:128 – 1:1024
Контроль	20	инъекция	13		1:32 – 1:256
Опыт	20	Скарификация	0	100%	1:128 – 1:1024
Контроль	20		17		1:32 – 1:256

Опираясь на полученные экспериментальные данные, в 2001 году были начаты исследования по оценке протективного и иммуногенного эффекта применения бактериона в экспериментально-производственных условиях. Данные, полученные в ходе работ, приведены в таблице 2.

Таблица 2
Характеристика иммуногенных свойств бактериона в течение рыбоводного сезона 2002 г.

Группа рыб	Количество, шт.	Дата	Log 2 обратного титра антител	
			A.sobria 77-18	A.sobria 300-32п
Карпы при выходе с зимовки	54	28.04.	4,9 ± 0,4	3,2 ± 0,8
О-4	20	21.08.	6,0 ± 0,4	3,9 ± 0,5
К-4	20		4,9 ± 0,6	3,0 ± 0,8
О-5	20		4,7 ± 0,4	3,2 ± 0,8
К-5	20		4,3 ± 2,1	3,3 ± 0,6
О-5 ₁	20	22.10	9,1 ± 0,3	2,1 ± 0,3
К-5 ₁	20		6,3 ± 2,2	1,2 ± 0,2

При анализе данных, полученных 21.08, обнаружены статистически достоверные различия ($P \leq 0,05$) между средними титрами антител, специфичных к A.sobria 77-18, опытной и контрольной групп пруда 4. Достоверных различий средних титров агглютининов к A.sobria 300-32п в этих же

выборках не установлено. Различия между средними по выборкам пруда 5 статистически не существенны.

У этих рыб не удалось обнаружить различий в уровне контаминации бактериальной микрофлорой внутренних органов вакцинированных и интактных карпов. От обследованных рыб выделялись единичные вирулентные и высоко-вирулентные аэромонады.

На получение достоверных результатов по 5-му пруду могло повлиять значительное поражение гельминтами стада годовиков карпа, которыми он был зарыблен. В полости кишечника 52% обследованных весной годовиков обнаружены паразиты, идентифицированные как *Khawia sinensis*, интенсивность инвазии составила 1 – 28 шт. на рыбу. При последующих обследованиях гельминтов обнаружено не было, но наличие инвазии на момент вакцинации могло снизить интенсивность синтеза антител, не причиняя ущерба потенциалу их продукции.

Учитывая вышеизложенные факты, 22 октября проведены дополнительные исследования рыб 5-го пруда. Средний титр агглютининов к *A. sobria* 77-18 и к *A. sobria* 300-32п в опытной группе (О-5₁) статистически достоверно ($P \leq 0,01$) превысил таковой в контрольной (К-5₁). К данному моменту в условиях отсутствия бактериального прессинга микроорганизмы были элиминированы, а внутренняя среда организма исследованных рыб стерильна.

Однако прослеживаются чёткие закономерности при анализе данных патологоанатомического вскрытия. Количество карпов со значительными изменениями во внутренних органах в контрольных группах заметно превосходит таковое в опытных. Показательно то, что патологические изменения у подавляющего большинства рыб были представлены выраженным спаечным процессом в брюшной полости – признаком перенесённого воспалительного процесса. Несмотря на высокие значения ОМЧ воды опытных прудов (до 6480 КОЕ/мл) и значительный удельный вес в микробиоценозе вирулентных аэромонад, вся рыба была без клинических признаков заболевания на протяжении всего времени наблюдения.

Тот факт, что внедрившиеся в карпов патогены обладали значительной вирулентностью, но были малочисленны, несмотря на высокие показатели ОМЧ воды, и в ряде случаев не оказывали повреждающего эффекта, достаточно положительно характеризует протективный потенциал бактериина.

Иммунологические данные, полученные весной 2003 г. приведены в таблице 3.

Сравнительная характеристика напряженности специфического иммунитета ранее вакцинированных (В) и интактных (НВ) карпов весной 2003 г.

Группа рыб	Количество, шт	Дата	Log 2 обратного титра антител	
			A. sobria 77-18	A. sobria 55-15лч
В	10	20.05	8,0 ± 0,4	6,0 ± 1,4
НВ	10	20.05	3,6 ± 0,4	3,3 ± 1,9

Титры циркулирующих антител в группе (В) статистически достоверно превысили ($P \leq 0,01$) таковой в контроле (НВ). Причём паренхиматозные органы 80% невакцинированных рыб были контаминированы микрофлорой, в то время как внутренняя среда ранее обработанных бактерином рыб была стерильна.

Полученные в течение 2002 г. и весной 2003 г. обнадеживающие результаты позволяют говорить о перспективности разрабатываемой вакцины. Продолжаются исследования её иммунопротективных свойств, и проводится оценка влияния ревакцинации на напряженность иммунитета рыб и эффективности вакцинации в более ранние сроки при более низких температурах воды. В случае получения положительных достоверных результатов можно ставить вопрос о производственных испытаниях бактериона в неблагополучном по аэромонозу (ВГС) хозяйстве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каховский А.Е., Михайловская А.В., Кузьмина Л.В. Взаимосвязь интенсификации рыбоводства, условий обитания аэромонад и клинического состояния рыб // Сб. науч. тр. Молд. НИРХС/ Интенсификация выращивания товарной рыбы в Молдавии. – Кишинёв, – 1989. – С. 68-79.

2. Пьяцца А. Анализ иммунологических данных // Методы исследований в иммунологии. - М.: Мир, – 1981. – С. 429-435.

3. Юхименко Л.Н., Викторова В.Ф., Федорченко В.И. Выделение аэромонад из воды рыбоводных прудов // Сб. науч. тр. / Болезни рыб и водная токсикология. – М.: ВНИИПРХ, 1987. – Вып. 50. – С. 37-46.

4. Юхименко Л.Н., Гусева Н.В., Керекеша Г.С. Результаты использования новой вакцины против аэромоноза и энтеросептического заболевания рыб // Тез. докл. Всерос. науч.-

произв. совещ. по пробл. развития пресноводной аквакультуры. – М.: ВНИИПРХ, 1993. – С. 77-78.

5. Юхименко Л.Н., Щелкунов И.С., Койдан Г.С., Бычкова Л.И. Специфическая и неспецифическая профилактика аэромоназа карпа в тепловодном хозяйстве // Мат. совещ. «Состояние и персп. науч.-практ. разработок в области марикультуры России». – М.: ВНИРО, 1996. – С. 354-360.

6. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С. Современное состояние проблемы аэромоназа рыб // Рыбн. хоз.-во. Сер. Аквакультура: Информ. пакет «Болезни рыб». – М.: ВНИЭРХ, 1997. – Вып. 2. – С. 1-9.

7. Юхименко Л.Н., Смирнов Л.П., Койдан Г.С., Гусева Н.В. Специфическая профилактика бактериальной геморрагической септицемии (аэромоназа) рыб // Рыбн. хоз.-во. Сер. Аквакультура: Информ. пакет «Болезни рыб». – М.: ВНИЭРХ, 1998. Вып. 2. С. 14-21.

8. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Бычкова Л.И., Смирнов Л.П. Биологические свойства аэромонад и их роль в патологии рыб // Рыбн. хоз.-во. Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре: Анализ. и реф. инф. – М.: ВНИЭРХ, – 2001. – Вып. 1. – С. 1-10.

9. Яременко Н.А., Мачнев А.Н. Эпизоотическая обстановка по заразным болезням рыб в Российской Федерации // Теж. докл. науч.-практ. конф. «Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре». – М.: Россельхозакадемия, 2000. – С. 10-13.

10. Amend D.F. Potency testing of fish vaccines // Dev. Biol. Standart. 1981. - V 49, №1, – P. 447-454.

11. Dixon B.A. Antibiotic resistance of bacterial fish patogen. // J. of the World Aquaculture Society. – 1994. - №25. - P. 60-63.

12. Golovin P.P. Fish Diseases in aquaculture of the central-european region of Russia: Book of abstracts first Russia-USA symposium «Aquaculture and fish health». - Moscow, 1998. – P. 21.

13. Lewin C.S. Mechanisms of resistance development in aquatic microorganisms // In: Michel C. and Alderman D.J. (Eds.). Chemotherapy in aquaculture: From theory to reality. Paris: O.I.E. 1992. P. 288-301.

14. Schøperclaus W. Fischkrankheiten. Berlin: Akademie-verlag, 1954. 708p.

15. Yukhimenko L.N. Bacterial haemorrhagic septicaemia of fish caused by motile aeromonads and it is prophylaxis in Russia: Book of abstracts first Russia-USA sumposium «Aquaculture and fish health». Moscow, 1998. P. 66.

SPECIFIC IMMUNOPROPHYLAXIS AEROMONOSIC INFECTIONS OF A CARP (*CYPRINUS CARPIO L.*)

Gavrilin K.V., Juhimenko L.N., Bychkova L.I.

Bacterial hemorrhagic septicemia many decades is a serious problem of fish culture. The most rational in struggle against the given disease represents use of the non-polluting preparations raising stability of an organism of a fish to which corpuscular vaccines - bacterins concern also.

In 1998 works on reception of a vaccine for group processing a fish by a method of a straight line immersia are begun. Concentration of bacterin, giving the greatest immunogenic effect - 109 microbic cells(cages) in 1 ml a working solution, and optimum duration of processing - 10 minutes is established.

Immunoprotective properties of bacterin are investigated in experimentally industrial conditions. The average credit of agglutinins to gomologic strain *A.sobria* 77-18 and to heterologic *A.sobria* 300-32p and *A.sobria* 55-15ptch in skilled groups statistically authentically ($P < 0,01$) has exceeded those in control, and the amount of carps with significant changes in internal bodies in control groups appreciably surpasses the same quantity in skilled.

УДК [597:612.017] 57.086.3

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ИММУНОЦИТОВ НА ИММУНИЗАЦИЮ РЫБ КОРПУСКУЛЯРНЫМ И РАСТВОРИМЫМ АНТИГЕНОМ: УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Е.А. Заботкина, Л.В. Балабанова, В.Р. Микряков

*Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН,
152742, п. Борок Некоузского р-на Ярославской обл.,*

E-mail: zabel@ibiw.yaroslavl.ru

В работе изложены результаты электронно-микроскопических исследований реакции иммуноцитов в тканях туловищной почки, селезенки и печени карпа после внутривентральной инъекции инактивированной культуры бактерий *Aeromonas hydrophila* и человеческого альбумина. Обсуждаются общие и характерные для каждого антигена изменения в иммуноцитах тканей. Отмечено, что растворимый антиген вызывает более быструю реакцию со стороны кле-

ток иммунокомпетентных органов. Отмечено, что в обоих случаях иммуноциты почек раньше реагировали на антиген, чем клетки селезенки и печени. Обсуждается значение изменений структуры клеток ткани печени в свете их участия в реакции на антиген.

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшими функциями иммунной системы рыб являются распознавание «своего-чужого» и защита от генетически чужеродных тел (включая паразитов), направленные на сохранение гомеостаза и обеспечение жизнедеятельности особи на разных этапах онтогенеза в изменяющихся условиях окружающей среды. Против чужеродных объектов любого происхождения возникают однотипные реакции, конечный результат которых – изоляция объекта от организма, которая достигается путем эндоцитоза, отторжения или инкапсуляции. У позвоночных выделяют три этапа защитных реакций: распознавание объекта, подготовка реакции и эффективное действие. Завершающим этапом защитной реакции становится эндоцитоз или инкапсуляция чужеродного объекта. В зависимости от размеров объекта поглощение его идет путем фаго- или пиноцитоза [7].

Фагоцитоз относится к эволюционно наиболее древним клеточным защитным реакциям. У многоклеточных животных механизм данного явления однотипен и хорошо исследован у разных классов как беспозвоночных, так и позвоночных животных (в том числе рыб) [12, 16-18, 21, 22].

Он является также одной из начальных стадий иммунного ответа - комплекса ответных реакций организма на попадание чужеродного антигенного материала. Реакции иммунной системы рыб на введение антигена достаточно подробно изучены на уровне гуморального иммунитета: синтеза антител в различных органах, активности лизоцима и комплемента, распределения антигена в организме [4, 9, 10, 13, 15]; а также клеточного: методом световой микроскопии [10, 22], но исследованию изменений состава и ультраструктуры иммунокомпетентных клеток в различных иммунокомпетентных органах при попадании антигена посвящены единичные работы [5, 8, 16, 17, 23]. Не исследованы субклеточные изменения всех типов иммунокомпетентных клеток в процессе формирования иммунного ответа. Отсутствуют сведения об изменении ультраструктуры иммуноцитов в зависимости от природы антигена у костистых рыб.

В соответствии с этой задачей настоящей работы было исследовать субклеточные изменения иммунокомпетентных клеток в процессе формирования иммунного ответа, выявить особенности реагирования иммунокомпетентных клеток на растворимый и корпускулярный антиген, сравнить субклеточные изменения, происходящие в клетках при ответе на антигены различной природы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Нами были проведены исследования по влиянию различных типов антигенов (растворимых и корпускулярных) на иммунную систему рыб (на примере карпа). В разных вариантах эксперимента было использовано 90 экз. карпа обыкновенного в возрасте 1+, массой 57.5 ± 3.5 г и длиной 16.3 ± 1.0 см.

Данная работа имела целью выяснить различия в механизме клеточных реакций иммунной системы на растворимый и корпускулярный антиген. Для этого поставленный нами эксперимент имел следующую схему: 1 группа рыб была интактной и служила контролем, вторую группу рыб иммунизировали инактивированной суточной культурой *Aeromonas hydrophila*, 3 группу - человеческим альбумином. Отбор проб внутренних органов (почек, селезенки, печени) производили одновременно из всех групп через 6 часов, 1, 4, 7 суток и 1 месяц с начала эксперимента.

В качестве антигенов использовали:

- корпускулярный антиген: суспензию суточной культуры бактерий *Aeromonas hydrophila* (250 тыс./мл) инактивировали нагреванием на водяной бане при 60° С и вводили внутривентрально по 0.1 мл/рыбу;
- растворимый антиген: человеческий альбумин (0.1 мг/мл) вводили внутривентрально по 0.1 мл/рыбу.

Образцы тканей для электронной микроскопии (туловищная почка, селезенка и печень) отбирались у забитых рыб, отмывались в физрастворе, фиксировались в 2.5% глутаральдегиде, постфиксировались в 1% OsO₄, обезвоживались в батарее спиртов и ацетона возрастающей крепости и заливались в Эпон 812. Ультратонкие срезы приготавливали на ультратоме LKB 8800, контрастировали водными растворами уранилацетата и цитрата свинца и просматривали под электронным микроскопом JEM 100C при ускоряющем напряжении 80 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Результаты исследований показали, что партикулярный и растворимый антигены оказывают на клетки тканей иммуно-компетентных органов действие, характерное для генетически чужеродных веществ, но вместе с тем обнаружены особенности, присущие только партикулярному или растворимому антигену. Основные черты происходящих в тканях изменений показаны в табл. 1.

Как видно из данных таблицы, в обеих группах у иммунизированных рыб наиболее явно изменяется структура лимфоидных клеток, в частности, малых лимфоцитов. В цитоплазме клеток увеличивается количество свободных рибосом и полирибосом, в ней появляются лизосомоподобные гранулы и каналы шероховатого эндоплазматического ретикулума, свидетельствующие об активизации синтеза белков. Структура подобных клеток резко отличается от структуры малых и средних лимфоцитов, наблюдаемых у контрольных рыб. Ободок цитоплазмы становится шире, поверхность клеток приобретает выросты типа микровилл или небольших бугров. Подобные лимфоциты называют «активированными лимфоцитами». Изменяется структура гранулоцитов: возрастает соотношение опустошенных и заполненных гранул в клетке, что свидетельствует об изменении содержания ферментов в них, перехода их в активную форму и выведения фермента из клеток [7]. Вместе с тем, имеются существенные различия во времени развития соответствующих изменений. Следует отметить и скопления гранул гликогена в гранулоцитах только после инъекции партикулярного антигена. По всей видимости, это может быть связано с запасом энергии при последующем ее расходовании на захват антигена, синтез и секрецию ферментов специфических гранул.

На основании литературных данных и результатов собственных исследований можно предложить следующую схему развития событий при контакте клеток с корпускулярным или растворимым антигеном (Рис. 1).

**Особенности изменения иммуноцитов при иммунизации
растворимым и корпускулярным антигеном**

Антиген Сроки сут	Растворимый	Корпускулярный
1	<p>В почках изменяется структура малых лимфоцитов, макрофагов и гранулоцитов: появляются активированные лимфоциты, в макрофагах - большое количество фагосом, в нейтрофилах и эозинофилах - фагосомы, в гранулоцитах - изменение структуры специфичных гранул.</p> <p>В селезенке активированных лимфоцитов меньше, чем в почках, ядерная оболочка малых лимфоцитов образует петли, степень конденсации хроматина в ядрах выше, чем в малых лимфоцитах почек. Плазматические клетки встречаются редко. Структура гранулоцитов и макрофагов подобна таковой почек.</p> <p>В печени структура клеток не отличается от контроля, но отмечено расширение пространства Дюсса и миграция эозинофилов в периваскулярные области.</p>	<p>В почках и селезенке ядерная мембрана малых лимфоцитов образует ядерные петли. В цитоплазме клеток появляются лизосомоподобные гранулы, каналы ШЭР становятся более регулярными, на поверхности некоторых клеток появляются микровилли. В средних лимфоцитах ядре происходит увеличение конденсации в аневдрыйского хроматина, в цитоплазме - увеличение количества рибосом и попирибосом. В цитоплазме нейтрофилов отмечено скопление гранул гликогена, в эозинофилах - изменение структуры специфичных гранул. Структура макрофагов не отличается от контроля.</p> <p>В печени цитоплазма макрофагов содержит фагосомы со спонстными включениями различной формы. Тонкая структура малых лимфоцитов не отличается от контроля. Эозинофилы содержат измененные гранулы</p>
4	<p>В почках лимфоциты располагаются преимущественно группами по 3-4 клетки, встречаются активированные лимфоциты. В макрофагах присутствуют фагосомы с деструктурированными эритроцитами и гранулоцитами и пигментные гранулы. В гранулоцитах нет фагосом.</p> <p>В селезенке малые лимфоциты также встречаются группами. Активированные лимфоциты встречаются чаще, чем в почках. Макрофаги образуют скопления в периваскулярных зонах. Структура остальных типов клеток подобна контролю.</p> <p>В печени наблюдается утолщение гранул</p>	<p>В почках наблюдаются активированные лимфоциты. В средних лимфоцитах увеличивается количество гетерохроматина. Возрастает количество незрелых плазматических клеток. Структура нейтрофилов такая же, как и через 1 сут. Эозино- и базофилы содержат большие фаголизосомы. В базофилах появляются крупные гранулы</p> <p>В селезенке присутствуют активированные лимфоциты, а также незрелые плазматические клетки. Ультраструктура гранулоцитов подобна таковой почек.</p> <p>В печени активированных лимфоцитов и</p>

	<p>эозинофильных гранулоцитов.</p>	<p>плазматических клеток не обнаружено, но увеличивается количество малых лимфоцитов под эндотелиальной выстилкой синусов. В эозинофилах печени не обнаружено фатгосом, но специфичные гранулы разнo размерные и более крупные. Макрофаги содержат фатгосомы фибриллярной структуры.</p>
7	<p>В почках скопления лимфоцитов насчитывают 8-10 клеток. В ядрах малых и средних лимфоцитов отмечены ядерные петли. Плазматических клеток довольно много, но каналы ШЭР не расширены. Макрофаги образуют скопления, каждая клетка содержит до 12-14 фатгосом.</p> <p>В селезенке присутствуют скопления лимфоидных клеток обычной структуры. Плазматических клеток нет, встречается значительное количество незрелых нейтрофильных клеток. Эозино- и базофилы содержат увеличенные специфические гранулы, макрофаги - большое количество фатгосом (до 8 - 11).</p> <p>В печени вдоль кровеносных синусов располагаются ретикулярные клетки, малые и средние лимфоциты и гранулоциты.</p>	<p>В почках - Большое количество активированных лимфоцитов и незрелых и зрелых плазматических клеток. В нейтрофилах скопления гликогена практически исчезают. В эозино- и базофилах отмечены фатгосомы, а также опустошенные гранулы.</p> <p>В селезенке изменения, подобно таковым в почках.</p> <p>В печени расположение и структура малых лимфоцитах такие же, как и на 4 сут.</p>
28	<p>В почках лимфоидные и гранулярные клетки имеют структуру, подобную контролю.</p> <p>В селезенке структура клеток подобна контролю.</p> <p>В печени структура клеток подобна контролю.</p>	<p>В почках активированных лимфоцитов нет. Структура малых лимфоцитов, как в 1 сут... а средних лимфоцитов, плазматических клеток, нейтро- и эозинофилов не отличается от контроля. Базофилы содержат опустошенные гранулы.</p> <p>В селезенке малые лимфоциты типичной структуры встречаются группами по 4-6 клеток. Остальные изменения аналогичны таковым почек.</p> <p>В печени малые лимфоциты единичны, эозинофилов в периваскулярных областях не наблюдается.</p>

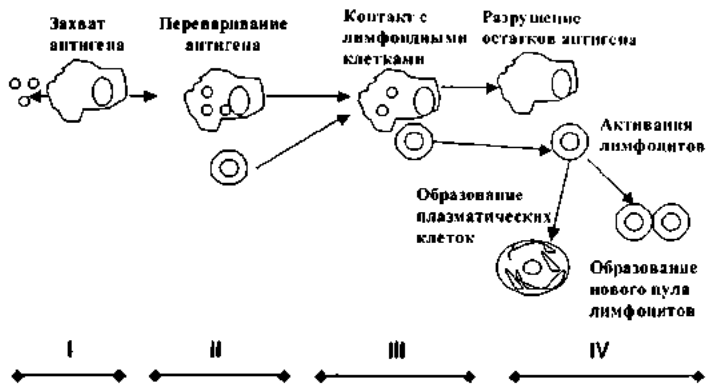


Рис. 1 *Схема взаимодействия антигена и иммунокомпетентных клеток.*

Как видно из таблицы, в переваривании антигена (I фаза) участвуют не только макрофаги, но и гранулоциты. В пользу их участия в процессах представления антигена свидетельствует тот факт, что после инъекции антигена (как растворимого, так и корпускулярного) гранулоциты проявляют фагоцитарную активность в виде крупных или мелких фагосом (при размере которых менее 0.1 мкм речь идет скорее о пиноцитозе). Изменение структуры специфических гранул гранулоцитов косвенно свидетельствует об изменении содержания в них ферментов и об участии данных ферментных систем в формировании иммунного отклика. Вместе с тем, следует отметить, что различия в ответе тканей на корпускулярный и растворимый антигены начинается с первых фаз ответа. При инъекции растворимого антигена существенно сокращаются фазы I-III ответа и IV фаза наблюдается с 1-4 суток, тогда как при инъекции корпускулярного антигена IV фаза наблюдается только с 7 суток.

Вместе с тем изменение содержания ферментов в гранулах наблюдается вплоть до 3-4 недели наблюдений, что свидетельствует о более длительном колебании содержания ферментов в клетках и их секреторной активности.

В случае растворимого антигена следует отметить следующие особенности: ускорение фазы I-II ответа, поглощение преимущественно путем пиноцитоза, агрегацию макрофагов вокруг кровеносных синусов и Боуменовых капсул в мезонефросе. Кроме различий в форме представляемого антигена (корпускулярный или растворимый) обнаруженные из-

менения могут быть связаны и с тем, что используемые антигены относятся к Т-независимым (инактивированная культура *Aeromonas hydrophila*) и Т-зависимым (человеческий сывороточный альбумин) [19].

Анализ полученных результатов показывает, что макрофаги принимают самое активное участие на начальных стадиях тканевого ответа как в случае партикулярного, так и растворимого антигена. Об этом свидетельствуют увеличение в них количества фагосом при инъекции корпускулярного антигена (что косвенно свидетельствует об усилении фагоцитарной активности) и агрегация их вокруг кровеносных синусов и Боуменовых капсул туловищной почки при инъекции растворимого антигена, что можно связать с их функцией захвата и переваривания чужеродных веществ, что подтверждает их роль в захвате и презентации антигена лимфоидным клеткам [1]. Подключение гранулоцитов к захвату партикулярного антигена свидетельствует об их фагоцитарной способности, а также, вероятно, способности презентировать антиген, подобно макрофагам.

Более раннее появление активированных лимфоцитов в почках по сравнению с селезенкой при инъекции корпускулярного антигена, по-видимому, связано с секреторной функцией почек, их большой фильтрующей способностью. Еще более раннее — на первые сутки — появление активированных лимфоцитов после инъекции растворимого антигена, присутствие в гранулоцитах очень мелких фагосом, свидетельствует о том, что растворимый антиген более активно поглощается клетками и быстрее вовлекается в иммунные процессы. Вместе с тем, в обоих случаях соблюдается тенденция более ярко выраженной реакции на антигены со стороны клеток почек. Наши наблюдения подтверждают более ранние наблюдения, авторы которых сообщали об увеличении гемолизинпродуцирующих клеток при формировании иммунного ответа сначала в почках, а потом в селезенке [6, 20]. Более активны в поглощении бактериальных клеток у карпа почки, затем — селезенка и печень [4]. Вместе с тем свидетельства, что, несмотря на чуть запаздывающий ответ, селезенка реагирует затем на антигенный стимул более ярко [14], находят подтверждение и в наших экспериментах (Табл.).

В данном контексте интересно рассмотреть роль печени в ответных реакциях карпов на антигены разного типа. Обычно степень участия печени в иммунных реакциях редко учитывают, хотя ее значение в иммунобиологических процес-

сах у млекопитающих давно известна [2]. По данным Л.В.Балабановой [4], после инъекции бактериального антигена печень рыб достаточно активно поглощает антиген, уступая по количеству поглощенного антигена лишь почкам и селезенке, хотя содержит незначительное количество клеток лимфомиелоидной и ретикуло-эндотелиальной тканей, которые располагаются в основном вдоль кровеносных сосудов. В ответ на инъекцию антигена, по нашим данным, происходит миграция лимфоидных клеток и гранулоцитов (в основном эозинофилов) под эндотелиальную выстилку синусов печени, изменяется структура специфических гранул эозинофилов и появляются фагосомы слоистой структуры в макрофагах после инъекции корпускулярного антигена. Все это говорит об усилении фагоцитарной способности иммунокомпетентных клеток печени, секреторной активности гранулоцитов. Ни активированных лимфоцитов, ни плазматических клеток в ткани печени ни в один из сроков наблюдений не отмечено, что свидетельствует о том, что печень как иммунокомпетентный орган не участвует в синтезе антител, и подтверждает данные Л.В.Балабановой об отсутствии антител и постоянстве состава белковых фракций экстрактов печени после инъекции бактерий [3, 4, 9, 11] и важной роли печени в утилизации продуктов распада бактерий [4].

В заключение можно сказать, что антигены различной природы вызывают в тканях изученных иммунокомпетентных органов сходные структурно-функциональные изменения, которые вместе с тем имеют свои особенности. На основе полученных результатов можно сказать, что растворимый антиген (в данном случае человеческий альбумин) вызывает более быструю реакцию со стороны клеток иммунокомпетентных органов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Азнаурян А.В., Бахшиян М.З. Макрофаги и лимфоидные клетки в условиях антигенной стимуляции. // Арх. ана. т.гист. и эмбр. 1985. Т. 88, Вып.2. С.56-58.

2. Арцимович Н.Г., Настоящая Н.Н., Казанский Д.Б., Ломакин М.С. Печень как орган иммунобиологической системы гомеостаза // Усп. совр. биол. 1992. Т.112, Вып.1. С.88-99.

3. Балабанова Л.В. Влияние иммунизации на белковый состав сыворотки крови и экстрактов печени и почек карпа *Surgilus carpio L.* // Биология и физиология пресноводных организмов. Л., 1971.

4. Балабанова Л.В. Судьба парентерально введенных бактерий в организме рыб.// Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., Наука, 1979. С.88-104.
5. Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. Ультраструктура клеток иммунной системы карпа *Cyprinus carpio* L. в норме и при иммунизации//Цитология, т.ХХХ, N 6,1988, с. 657 - 661.
6. Гончаров Г.Д. Иммунологическая реакция клеток почек карпа. Сообщение 1. Фагоцитоз бактерий клетками почек *in vitro*//Биол.внутр.вод: Информ.бюл. Л., 1970. N 8.С.54-56.
7. Горышина Е.Н., Чага О.Ю. Сравнительная гистология тканей внутренней среды с основами иммунологии. Л.: Изд-во Ленинградского университета. 1990. 320 с.
8. Заботкина Е.А., Балабанова Л.В. Изменение ультраструктуры иммунокомпетентных клеток селезенки при иммунизации карпа *Cyprinus carpio* L.//Информ. Бюлл.Биол.-Внутр.вод. 1989. N 82. С. 64-71.
9. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск, 1991. 154 с.
10. Микряков В.Р., Балабанова Л.В. Клеточные основы иммунитета у рыб//Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., Наука, 1979. С.105-114.
11. Микряков В.Р., Романенко В.И., Трофимова Л.В., Гончаров Г.Д. К изучению механизма иммунитета у рыб// Флора, фауна и микроорганизмы Волги. Рыбинск. 1974. С. 264-285.
12. Bayne C.J. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates: Phagocytosis appears to be an ancient line of defence//Bioscience. 1990. Vol.40, N 10. P.723-731.
13. Cain K.D., Jones D.R., Raison R.L. Antibody-antigen kinetics following immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a T-cell dependent antigen// Dev. Comp. Immunol. 2002. V. 26. N 2. P. 181-190.
14. Chiller J.M., Hodkins H.O., Chambers V.C., Weiser R.S. Antibody response in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*).I. Immunocompetent cells in the spleen and anterior kidney// J.Immun. 1969. Vol. 102. P.1193-1201.
15. Ellis A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria// Dev. Comp. Immunol. 2001. V. 25. N 8-9. P. 827-839.
16. Ellis A.E., Munro A.Z.S., Roberts R.J. Defence mechanisms in fish. I. A study of the phagocytic system and the of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.)// J.Fish Biol. 1976. Vol.8, N 1. P.67-78.
17. Finco-Kent D., Thune R.L. Phagocytosis by catfish neutrophils//J.Fish Biol. 1987. Vol. 31, Suppl.A. P. 41-49.

18. Hirota Y., Mukamoto M., Baba T.S., Kodama H., Azuma I. Effect of muramyl dipeptide on phagocyte functions in rainbow trout (*Onco-rhynchus mykiss*)//Bull.Univ.Osaka Prefect. B. 1993.Vol.45. P.67-74.

19. Lam S. H., Chua H. L., Gong Z., Lam T. J. and Sin Y. M. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study // Develop/ & Comp/ Immunol/2004. V. 28. N 1. P.9-28

20. Lamers C.H.J., De Haas M.J.H. Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio* L.)//Cell Tissue Res. 1985. Vol.242. P.491-498.

21. McArthur J.I., Fletcher T.C., Pirie B.J.S., Davidson R.J.Z., Thomson A.W. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin// J.Fish Biol. 1984. Vol.25, N 1. P. 69-81.

22. Neumann N.F., Stafford J.L., Barreda D., Ainsword A.J., Belosevic M. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense// Dev. Comp. Immunol. 2001. V. 25. N 8-9. P. 807-825.

23. Secombes C.J., Manning M.J. Histological changes in lymphoid organs of carp following injection of soluble or particulate antigens// Dev. Comp. Imm. 1982. Suppl. 2. P. 53-58.

**FEATURES OF IMMUNOCYTES REACTION ON
IMMUNIZATION OF FISHES
PARTICULATE AND A SOLUBLE ANTIGENE: ULTRA
STRUCTURAL RESEARCHES**

E.A.Zabotkina, L.V.Balabanova, V.R.Mikrjakov
*Papanin's Institute for biology of inland waters of the
Russian Academy of Science,
Borok, Yaroslavl region, E-mail: zabel@ibiw.yaroslavl.ru*

In work results of electron-microscopic researches of reaction of immunocytes in tissues of mesonephric kidneys, spleens and a liver of a carp after intraperitoneal injections of inactivate cultures of bacteria *Aeromonas hydrophila* and human albumine are stated. The general and characteristic changes for each antigene in immunocytes of tissues are discussed. It is marked, that the soluble antigene causes faster reaction on the part of cells of immunocompetence organs. It is marked, that in both cases immunocytes of kidneys cells of a spleen and a liver earlier reacted to an antigene, than. Value of changes of structure of cells of a fabric of a liver is discussed in view of their participation in reaction to an antigene.

**ВЛИЯНИЕ СУБЛЕТАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ
ИОНОВ КАДМИЯ НА СТРУКТУРУ
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНОВ КАРПА**

Е.А. Заботкина¹, Е. В. Бубенкова², Е. А. Назарова²

*1-Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина
РАН, 152742, п. Борок Некоузского р-на Ярославской
области, E-mail: zabel@ibiw.yaroslavl.ru.*

*2-Ярославский государственный университет
им. П.Г. Демидова, 150000, г. Ярославль, пр. Матросова, 8.*

На примере карпа изучено влияние сублетальной концентрации ионов кадмия на структуру туловищной почки и селезенки. Методом световой микроскопии оценено состояние данных органов через 2, 3 и 4 недели после начала экспозиции. Отмечено, что туловищная почка более подвержена воздействию данного токсиканта. Во всех исследованных органах на начальных этапах воздействия токсиканта в первую очередь пострадали клетки гемопоэтической и лимфомиелоидной ткани, оказалась повреждена система кровоснабжения органов. Через две недели после начала экспозиции наблюдали обширные очаги некроза в интерстициальной ткани почек и селезенки. С 3-ей недели наблюдений отмечено локализация очагов некроза, скопления нейтрофильных гранулоцитов в местах разрушения тканей и формирование новых элементов нефрона и кровеносных сосудов.

ВВЕДЕНИЕ

Кадмий считается одним из самых опасных по степени токсичности для гидробионтов тяжелых металлов, который легко поглощается из воды и накапливается в теле обитателей водоемов [4; 12]. Воздействие его на рыб и других водных животных основано на его способности повреждать клеточные мембраны и вызывать нарушение ионного гомеостаза, прежде всего, содержания ионов магния [2]. Кроме того, кадмий инактивирует металлоферменты, и, как следствие, нарушает метаболические процессы, ингибирует окислительное фосфорилирование, синтез белков, нуклеиновых кислот и т.д. [3]. Известно, что длительное воздействие сублетальных концентраций ионов кадмия приводило к токсическому поражению почек, появлению признаков вторичного

иммунодефицита, появлению очаговых некрозов, изменению показателей крови [2; 5; 7; 9 - 11; 13 - 15]. Отмечено, что кадмий наиболее токсичен для почек, вызывая некротические явления в нефроне и почечных тельцах. В селезенке кадмий индуцировал угнетение эритропоэза, повреждение структуры иммунокомпетентных клеток, вакуолизацию их цитоплазмы [1; 8]. Вместе с тем, характер процессов, происходящих в тканях иммунокомпетентных органов при воздействии сублетальных концентраций кадмия, на ранних сроках воздействия пестицида мало исследован.

Задачей настоящей работы было детально проследить характер и последовательность изменений структуры иммунокомпетентных органов при воздействии кадмия и постараться представить динамику этого процесса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выполнения данной задачи 2 группы карпов по 15 рыб массой $108,35 \pm 15,6$ г и размером $17,2 \pm 0,9$ см содержали в 60-литровых пластиковых аэрируемых аквариумах. Одна группа рыб находилась в водопроводной воде и служила контролем. Другую содержали в аквариуме, где поддерживали концентрацию кадмия 5 мг/л. Пробы туловищной почки и селезенки отбирали через 2, 3 и 4 нед. Материал фиксировали в глутаральдегиде и тетраокиси осмия, обезжизняли в спиртах возрастающей концентрации и заливали в Эпон 812 по стандартной методике. Затем с блоков нарезают полутонкие срезы (2-4 мкм), которые помещали на предметные стекла и окрашивали метиленовым синим [6]. Полутонкие срезы просматривали под световым микроскопом МБИ-6 при увеличении $7 \times 2,5 \times 20$ и $7 \times 2,5 \times 40$. Измеряли размеры основных структурных элементов органов, результаты подвергали статистической обработке при помощи программ Excel 2000 и Quattro Pro.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали, что кадмий вызывает изменение структуры обоих исследуемых органов с первых сроков наблюдения. Во всех органах в первую очередь повреждению подверглись клетки лимфомиелоидной и гемопоэтической ткани. Через три недели после начала экспозиции наблюдали обширные очаги лизиса и некроза в интерстициальной ткани почек и селезенки. Наиболее силь-

ные изменения отмечали в туловищной почке в первые 14 суток. В почке отмечено утолщение стенки боуменовой капсулы, разрушение эпителиоцитов проксимального и дистального отделов нефрона и выводящих канальцев. Наряду с полным разрушением клеток наблюдали вакуолизацию цитоплазмы эпителиоцитов, набухание клеток и, как следствие, сужение просветов канальцев. Под действием кадмия существенно изменялись размеры и структура почечных клеток, в результате чего изменялись и диаметры боуменовой капсулы и различных отделов нефрона, в связи с их разрушением изменялось их количество в поле зрения (Табл. 1). Достаточно сильному повреждению подверглась система кровеносных синусов органов. В селезенке полностью исчезли зародышевые центры, количество кровеносных синусов уменьшилось с 5 до 2 на поле зрения. Наблюдали набухание эндотелиоцитов в кровеносных синусах, вплоть до перекрывания ими просвета синуса. В то же время в органах обнаруживались локусы крупных округлых малодифференцированных клеток, окруженных общей мембраной. По всей видимости, это центры формирования новых кровеносных синусов и почечных канальцев. В селезенке через 14 суток отмечена деструктуризация и разрушение меланомакрофагальных центров, остатки их выглядели как конгломераты из нескольких макрофагов, находящихся на разных стадиях гибели (Табл. 2). Клетки, как правило, были заполнены фагоцитированным материалом. Вместе с тем, количество одиночных макрофагов, не объединенных в меланомакрофагальные центры, практически не изменилось. Данный факт позволяет предположить, что разрушение меланомакрофагальных центров связано с их преимущественным положением вокруг кровеносных синусов, и, следовательно, с важной ролью их в детоксикационных процессах и контактах с токсикантом. Появление соединительно-тканых перегородок, вероятно, обусловлено локализацией влияния токсиканта на структуру органа. В результате на срезах обнаруживалось разделение селезенки перегородками из мембран, коллагеновых волокон и соединительно-тканых образований на участки, где происходило формирование новых структурных элементов и участки, где были локализованы разрушенные клетки — очаги некроза. Через 3 недели в органах отмечено появление в очагах некроза большого количества нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов, что свидетельствует об активизации клеточного звена иммунитета, направленного на удаление разрушенных тканей.

В почках отмечали появление округлых гомогенных мембраноограниченных скоплений, по-видимому, белковой природы, что позволяет говорить о развитии в туловищной почке белковой дистрофии уже на начальных стадиях воздействия токсиканта. К 4 неделе отмечали отдельные очаги некроза, локализованные мембранами и соединительно-ткаными перегородками участки разрушенной ткани. Наблюдала также присутствие в строме почки и селезенки сеть заново сформированных кровеносных сосудов, а в туловищной почке, кроме того, наряду с остатками разрушенных канальцев, визуальнo подобные контрольным участки проксимальных и дистальных канальцев.

Нефротоксическое действие солей кадмия на туловищную почку отмечали также Гамбарян и Лаврова [2] на примере керчака, проводя опыты по исследованию влияния парентеральных инъекций сублетальных концентраций данного токсиканта. Они предположили, что одной из причин наблюдаемых изменений служит нарушение механизма секреции магния. Наиболее существенные повреждения, по мнению авторов, выявлялись в конечных участках проксимального канальца. Длительное (до 12 нед) воздействие различных концентраций кадмия вызвало мультифокальное вырождение эпителия трубок проксимальных сегментов, включая сильную вакуолизацию и пикноз и фрагментацию ядер, а также патологические изменения в клубочках. Степень патологии зависела от дозы и времени экспозиции [11]. Уи и Лоу [13] также отмечали повышенную чувствительность к действию кадмия проксимального отдела канальцев, в которых даже единичная инъекция хлорида кадмия (7.5 мг/кг веса) вызвала деформацию зубчатого края, постепенную атрофию базального участка цитоплазмы, очаговый некроз клеток канальцев, пикноз ядра и последующий некроз всего нефрона. Сингал и Джайн [15] отмечали появление первых признаков отравления через 1 нед, а через 2 — появление очагов некроза и также набухание стенок почечных канальцев. Через 4 нед авторы наблюдали дегенерацию канальцев, обширные очаги коагуляционного некроза и гнойное воспаление. Перенесение рыб в чистую воду вызвало дальнейший прогресс наблюдаемых изменений. В нашем исследовании, не смотря на иной способ представления токсиканта, под воздействием кадмия также отмечались повреждения боуменовой капсулы и проксимальных и дистальных канальцев. Наряду с описанными изменениями нами наблюдалась появление в эпителии канальцев лимфо-

цитов и макрофагов, повреждение кровеносных синусов. Разрушенные инкапсулированные канальцы присутствовали в ткани туловищной почки вплоть до 4 недели наблюдений. Отмечалась гибель клеток лимфомиелоидной ткани, прежде всего агранулоцитов, особенно лимфоцитов через 3 недели наблюдений. В селезенке у тилапии Степанова с соавторами отмечали изменение состава иммунокомпетентных клеток [8], а Л. В. Балабанова отмечала изменение тонкой структуры клеток при длительном действии сублетальных концентраций кадмия [1]. Нами установлены ранее не описываемые разрушение мелано-макрофагальных и зародышевых центров в селезенке и появление локусов малодифференцированных клеток с последующим формированием новых структурных элементов в туловищной почке и селезенке карпа при действии кадмия. Повреждение агранулоцитов, к которым относятся лимфоциты и моноциты (макрофаги) в интерстициальной ткани органов свидетельствует о нарушении клеточного звена как неспецифического, так и специфического иммунитета, ответственного за разрушение чужеродных и поврежденных элементов, представление антигена и синтез антител. Косвенно это может свидетельствовать об ослаблении сопротивляемости организма, в том числе инфекциям. Разрушение же элементов нефрона позволяет говорить о нарушении выделительной функции почек.

Таким образом, результаты исследования показали, что сублетальные концентрации ионов кадмия, не вызывающие гибели рыб или визуального изменения поведения, оказывают разрушительное воздействие на структуру иммунокомпетентных органов карпов. Наиболее сильное воздействие ионы кадмия оказали на туловищную почку. Во всех исследованных органах на начальных этапах воздействия токсиканта в первую очередь пострадали клетки гемопозитической и лимфомиелоидной ткани, оказалась повреждена система кровоснабжения органов. В туловищной почке существенно изменялась структура боуменовых капсул, проксимальных и дистальных канальцев.

Таблица 1

Изменения количества и размеров основных структурных элементов туловищной почки под действием кадмия

Структурные Эл-ты	Боуменова капсула		Дистальный канал		Проксимальный канал		Выводные протоки		
	К-во, Х±m	Размеры, мкм, Х±m	К-во, Х±m	Размеры, мкм, Х±m	К-во, Х±m	Размеры, мкм, Х±m	К-во, Х±m	Размеры, мкм, Х±m	
Сроки	К	0.7±0.3	57.6±5.9 X 37.6±4.0	4.7±2.5	23.7±4.3 X 18.2±3.7	6.2±2.3	28.2±5.4 X 20.6±2.9	2.3±1.0	49.6±7.7 X 20.0±6.1
		2 недели	1.0±0.3	52.8±6.6 X 38.5±4.3	3.5±1.0	31.4±7.2 X 19.8±6.1	5.2±2.1	38.9±3.2 X 26.8±2.2	1.7±1.2
3 недели	К	1.3±0.8	56.1±7.2 X 42.1±3.2	4.7±1.5	28.2±5.5 X 23.1±3.1	6.7±2.3	42.9±8.4 X 31.7±6.1	3.0±1.0	55.2±8.0 X 39.6±1.6
		3 недели	1.0±0.3	47.5±9.0 X 31.7±3.4	3.6±1.7	35.9±3.7 X 22.4±2.6	4.3±2.8	29.7±3.1 X 22.1±2.5	1.0±0.5
4 недели	К	1.0±0.5	58.0±6.8 X 44.2±6.1	4.3±1.0	26.9±1.7 X 24.2±4.4	6.6±1.4	44.1±6.3 X 30.5±4.9	2.8±1.5	52.8±6.9 X 41.4±2.7
		4 недели	1.0±1.0	69.3±7.9 X 56.1±6.5	4.5±2.8	38.5±4.3 X 31.9±4.4	6.0±1.0	34.1±4.2 X 30.8±3.3	2.0±0.5

Примечание: К – контроль; Cd – кадмий

Таблица 2
Изменения количества и размеров основных структурных элементов
селезенки под влиянием кадмия

Структурные Эл-ты	ММЦ		Отдельные макрофаги		Зародышевые центры		Синусы	
	Кол-во в поле зрения	Размер, X±m, мкм	Кол-во в поле зрения	Размер, X±m, мкм	Кол-во в поле зрения	Размер, X±m, мкм	Кол-во в поле зрения	Размер, d X±m, мкм
2 недели	К	1-2	75,5±10,6 x 64,9 ± 10,8	17,6±0,8 x 13,2±1,3	1-2	32,5±3,9X 25,2±2,2	5-6	27,1±2,1
	Сд	-	-	27,0± 1,0 x 22,8 ± 0,8	-	-	2-3	22,8±1,4
3 недели	К	2	89,1±8,8 x 67,7±4,1	18,1±0,9 x 15,7 ± 0,8	1-2	28,4±4,3x 24,6±2,7	5-6	28,5±0,9
	Сд	-	-	23,1±2,8 x 12,3±1,5	-	-	1-4	24,1±1,44
4 недели	К	1-2	79,1±10,8 x 60,7±9,0	16,9±3,3 x 14,2±2,8	3-5	28,1±5,7X 18,9±4,3	4-6	26,4±3,7
	Сд	-	-	14,8±5,2 x 11,9±3,9	-	-	1-2	18,2±1,6

Примечания: те же, что и в таблице 1, ММЦ – мелано-макрофагальный центр

ВЫВОДЫ

Ионы кадмия более токсичны для туловищной почки, чем для селезенки. В первую очередь разрушению подвергаются клетки гемопоэтической и лимфомиелоидной ткани, система кровоснабжения органов. В туловищной почке также оказались повреждены боуменова капсула, проксимальный и дистальный канальцы, в селезенке – мелано-макрофагальные центры и зародышевые центры. Очаги некроза в интерстициальной ткани к 4 неделе локализуются соединительно-ткаными перегородками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балабанова Л.В. Влияние кадмия на ультраструктуру иммунокомпетентных клеток мозамбикской тилапии *Oreochromis mossambicus*// Цитология. 1997. Т.39, N 8. С. 677-680.

2. Гамбарян С.П., Лаврова Е.А. Нефротоксическое действие соединений платины, хрома и кадмия на морских костистых рыб// Ж. Эволюц. Биохим. и физиол. 1989. Т. 25. № 6. С. 729-735.

3. Коновалов Ю.Д. Связывание кадмия и ртути белками и низкомолекулярными тиоловыми соединениями рыб (обзор)/ Гидробиологический журнал. 1993. Т.29, N 1. С. 42-51.

4. Линник П.Н., Искра И.В. Кадмий в поверхностных водах: содержание, формы нахождения, токсическое действие/ Гидробиологический журнал. 1997. Т. 33, № 6. С. 72-87.

5. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука. 2001. 126 с.

6. Миронов А.А. Комиссарчик Я.Ю. Методы электронно-микроскопии в биологии и медицине. СПб.: Наука. 1994. 400 с.

7. Рылина О.Н. Патоморфологические изменения в организме рыб под воздействием солей кадмия// I конгр.ихтиологов России. Астрахань, 1997. Тез.докл. С. 455-456.

8. Степанова В.М., Павлов Д.Ф., Чуйко Г.М. Хроническое действие кадмия на клетки ретикулолимфоидной ткани селезенки и периферической крови мозамбикской тилапии// Биология внутренних вод. 1998. № 3. С. 68-75.

9. Gill T.S., Epple A. Stress-related changes in gematological profile of the American eel (*Anguilla rostrata*). *Ecotox. Environ. Safety*. 1993. V. 25. P. 227-235.

10. Gill T.S., Pant J.C. Erythrocytic and leucocytic responses to cadmium poisoning in a freshwater fish, *Puntius conchonus* Ham// Environ.Res. 1985. Vol. 36, N 2. P.327-337.
11. Gill H.T., Pant S.C., Tewari H. Cadmium nephropathy in a freshwater fish *Puntius conchonus*// Ecotoxicol. And Environ. Safety. 1989. V. 18. № 2. P. 165-172.
12. Houston A.H., Keen J.E. Cadmium inhibition of erythropoiesis in goldfish, *Carassius auratus*//Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1984. V. 41. P. 1829-1833.
13. Ooi V.E.C., Low F.K. Changes induced by cadmium in the kidney of Black Sea bream, *Mulio macruchirus* (Teleostei)// Bull. Environ. Contam. And Toxicol. 1989. V. 43. № 5. P. 769-775.
14. Saxena M.P., Gopal K., Jones W., Ray P.K. Immune responses to *Aeromonas hydrophila* in cat fish (*Heteropneustis fossilis*) exposed to cadmium and hexachlorocyclohexane // Bull. Environ. Contam. and Toxicol. 1992. Vol.48, N 2. P.194-201.
15. Singhal R.N., Jain M. Cadmium induced changes in the histology of kidneys in common carp, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) // Bull. Environ. Contam. and Toxicol. 1997.Vol.58, N 3. P.456-462.

**EFFECT OF CADMIUM IONS SUBLETHAL
CONCENTRATION ON STRUCTURE OF CARP
IMMUNOCOMPETENCE ORGANS**

E.A.Zabotkina¹, E.V.Bubenkova², E.A.Nazarova²

*1-Papanin's institute for biology of inland waters of the
Russian Academy of Science, Borok, Yaroslavl area,*

E-mail: zabel@ibiw.yaroslavl.ru.

2-Demidov's Yaroslavl state university , Yaroslavl.

On an example of a carp influence of sublethal concentration of cadmium ions on structure of mesonephric kidney and spleen is investigated. The method of light microscopy appreciates a condition of the given organs in 2, 3 and 4 weeks after the beginning of an exposition. It is marked, that mesonephric kidney is more subject to influence of toxicant. In all investigated organs at the initial stages of influence of toxicant cells hemopoietic and lymphomieloid tissues first of all have suffered, appeared the system of organ blood supply is damaged. In two weeks after the beginning of an exposition observed the extensive centers of necrosis in interstitial tissues of kidney and spleen. Since 3 weeks of supervision it is marked localization of necrosis centers, congestions of neutrophils in places of destruction of tissues and formation of new elements of nephron and blood vessels.

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ФУНКЦИЮ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА РЫБ

Кузьмина В.В., Шишин М.М., Смирнова Е.С.

**Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина
РАН, Борок, Ярославской обл.**

Приведены данные, касающиеся защитного и энзиматического барьера пищеварительного тракта рыб, а также влияния тяжелых металлов на активность протеиназ, выполняющих триединую функцию - трофическую, защитную и трансформационную, первые две из которых непосредственно влияют на состояния иммунитета у рыб.

Хорошо известно о защитной функции пищеварительного тракта, а также зависимости иммунологического статуса животных от эффективности питания рыб [2, 15]. В частности, Г.Д. Гончаровым и В.Р. Микряковым было показано, что у голодающих карпов, отличающимися более низким коэффициентом упитанности и содержанием белка в сыворотке крови (1.7 и 2.1, а также 2.2 и 6.7г% в опыте и контроле соответственно) интенсивность антителогенеза снижается в 8.4 раза [5]. Следовательно, факторы, влияющие на структурно-функциональные характеристики пищеварительной системы, могут влиять не только на неспецифический, но и специфический иммунитет рыб. Особый интерес представляют сведения о влиянии на активность пищеварительных ферментов приоритетных загрязняющих веществ, в частности тяжелых металлов - кадмия, меди и цинка. Последние в малых дозах жизненно необходимы для нормального развития организма животных, в больших - токсичны. При этом фоновые концентрации кадмия, цинка и меди в природной воде обычно не превышают 0.01, 0.02 и 0.005 мг/л [8], а содержание меди и цинка в естественной пище рыб может достигать 10-20 и 40-50 мг/кг, в искусственной - 300, 480 и даже 600 мг/кг сухого веса [7].

Защитная функция пищеварительного тракта. В настоящее время не вызывает сомнения важная роль пищеварительной системы во взаимодействиях организма человека и животных с кишечными бактериями, вирусами, паразитами, различными ксенобиотиками и пищевыми антигенами, но также с белками и пептидами пищи, аутоантигенами

десквамированных кишечных клеток, антигенами микроорганизмов и вирусов. При этом у высших позвоночных животных содержится от 6 до 40 лимфоцитов на 100 эпителиальных клеток, а лимфатическая ткань тонкой кишки, составляющая около 25% всей кишечной слизистой, представлена в форме скоплений в Пейеровых бляшках и отдельных лимфатических узелков в lamina propria, а также популяцией рассеянных мигрирующих лимфоцитов. При этом слизистая оболочка тонкой кишки содержит макрофаги, Т-, В- и М-лимфоциты и другие. Эти данные свидетельствуют о существовании мощного лейкоцитарного слоя в кишечнике высших позвоночных животных [11].

У костистых рыб отсутствуют лимфатические узлы, в том числе Пейеровы или лимфоидные бляшки, реализующие специфическую иммунную защиту у высших позвоночных животных. Однако у этой группы животных в кишечнике присутствуют рассеянные лимфоциты и существует достаточно эффективная система защиты от токсической и аллергической агрессии. Ранее была описана многоуровневая система неспецифической защиты пищеварительного тракта рыб, механизмы которой несколько отличаются от описанной для млекопитающих [2]. При этом обращалось внимание на то, что вследствие меньшей структурно-функциональной дифференциации пищеварительного тракта рыб функции неспецифической защиты организма, по-видимому, могут выполнять не только медиальные участки, обычно рассматривающиеся как аналог тонкой кишки высших позвоночных животных, но и другие, особенно дистальные части кишечника.

Структурный барьер. Гастроэнтеральная и внутренняя среды отделены друг от друга стенкой, состоящей из нескольких (максимум четырех) слоев: слизистой, подслизистой, мышечной и серозной оболочек. У рыб некоторых таксономических групп, например, представителей сем. карповых Cyprinidae, подслизистая оболочка не обособлена. Строение и толщина различных оболочек у рыб разных видов значительно варьирует [1]. Как и у высших позвоночных животных, у рыб наиболее велика функция кишечного эпителия, 9/10 которого составляют энтероциты и являющегося основным звеном пассивной защиты, осуществляемой стенкой пищеварительного тракта. Форма и размер эпителиальных клеток, в частности щеточной каймы, образуемой микроворсинками, у рыб и других позвоночных животных достаточно близки [13].

Строение щеточной каймы определяет уникальную роль апикальной мембраны энтероцитов, функционирующих как молекулярное сито. Известно, что расстояние между микроворсинками апикальной (люминальной) мембраны энтероцитов обычно составляет 1-2 мкм, размер ячеек гликокаликса, как минимум, на два порядка ниже (обычно 0.01 - 0.02 мкм, реже до 0.1 мкм), а эффективный радиус пор апикальной мембраны неизмеримо ниже расстояния между нитями гликокаликса и составляет лишь 0.4-0.6 нм, в результате чего проницаемость слизистой оболочки кишечника для водорастворимых молекул составляет лишь 300-500 D и менее. Следовательно, апикальную мембрану энтероцитов не способны преодолеть не только бактерии, населяющие полость желудочно-кишечного тракта, и надмолекулярные агрегации, входящие в состав тканей объектов питания рыб, но и молекулы с большой молекулярной массой, такие, как белки, входящие в состав пищи и являющиеся не только питательными веществами, но и мощными аллергенами, а также некоторые токсические вещества. Кроме того, концевые фрагменты олигосахаридов, гликопротеидов и гликолипидов плазматической мембраны, образующих гликокаликс, при физиологических значениях pH отрицательно заряжены, что позволяет реализовать рецепторную функцию гликокаликса в отношении бактерий, токсинов, витаминов, гормонов, антител и т.д. Предполагается, что благодаря наличию рецепторов существует избирательность адсорбции различных молекул на структурах гликокаликса, определяющая доступ макромолекул к апикальной мембране энтероцитов [14].

Помимо структур пищеварительного тракта, защитными свойствами обладает слизь, выделяемая бокаловидными клетками. В состав слизи входят высокомолекулярные протеиды, отличающиеся высоким содержанием углеводов и низким содержанием белков и липидов. Присутствие гликопротеинов и мукополисахаридов обуславливает ионообменные свойства. Распределяясь в пристеночном слое, слизь формирует нитевидные и сетчатые структуры. Однако значительная часть молекул гликопротеида не включается в полимерную сеть, а находится в растворимой фракции [14, 2].

Энзиматический (трансформационный) барьер. Не менее важную роль играет энзиматический барьер, когда пищевые субстраты, в том числе сложноорганизованные белки, гликопротеиды и гликолипиды в процессе последовательной деградации до уровня мономеров, утрачивают спе-

цифичность. Предложено выделять девять основных и один дополнительный уровень энзиматического барьера, а также семь или восемь условно обозначаемых источников ферментов, выполняющих защитные функции пищеварительной системы рыб [2]. Выделение уровней энзиматического барьера в значительной мере основано на радиальной компартиментализации желудочно-кишечного тракта рыб (рис. 1). Как показывает рисунок, в полости желудочно-кишечного тракта за счет полостного пищеварения разрушаются преимущественно тканевые и клеточные структуры, а также надмолекулярные комплексы и различные макромолекулы. В зоне щеточной каймы энтероцитов завершается гидролиз поли- и олигомеров за счет ферментов, обеспечивающих мембранный гидролиз пищи.



Рис. 1. Схема уровней энзиматического барьера пищеварительного тракта рыб. 1 - ферменты пищеварительных желез; 2 - ферменты симбионтов; 3 - ферменты жертвы; 4 - ферменты мембраны энтероцитов; 5 - ферменты цитозоля энтероцитов; 6 - ферменты лизосом энтероцитов; 7 - «непищеварительные» ферменты постэпителиальных слоев [2].

Некоторая часть пищевых субстратов, не разрушенных гидролазами, обеспечивающими два вышеназванных основных типа пищеварения, гидролизуется внутри эпителиальных клеток за счет микро- или макромолекулярного механизма внутриклеточного пищеварения. Первый механизм реализуется при участии различных дипептидаз, функционирующих в цитоплазме, второй — при участии лизосомальных гидролаз, которые взаимодействуют с белками в фаголизосомах, образующихся в результате слияния фагосом, содержащих проникшие в клетку путем эндоцитоза белки, с лизосомами [10].

Если ферменты, обеспечивающие первые шесть уровней

энзиматической защиты, достаточно подробно описаны в связи с пищеварительной функцией желудочно-кишечного тракта рыб, то сведения о седьмом и последующих уровнях энзиматического барьера единичны (табл.1.). При этом в период интенсивного питания выявлены высокие значения дипептидазной активности в строме слизистой и мышечном слое, а также значительная активность щелочной фосфатазы в строме. Активность сахаразы связана исключительно с эпителием. Сопоставление активности одноименных гидролаз в указанных структурах свидетельствует о том, что у рыб, как и у млекопитающих, активность сахаразы связана исключительно с эпителием. Активность глицил-L-лейциндипептидазы и щелочной фосфатазы, преимущественно связанной с эпителием, значительна в строме и мышечном слое. При этом уровень щелочнофосфатазной активности при обоих значениях рН в мышечном слое в 2-2.5 раза ниже, чем в строме, активность дипептидаз, напротив, в мышечном слое может быть выше, чем в строме, а активность трипептидаз превышает таковую стромы и эпителия. Уровень удельной активности исследованных гидролаз в мышечном слое еще выше – активность трипептидаз составляет 242.3% от таковой эпителия и стромы [12].

Таблица 1.

Уровень активности ферментов в различных слоях кишки леца [12]

Ферменты	Активность ферментов, мкмоль/(г*мин)		
	Эпителий	Строма слизистой	Мышечно-серозный слой
Сахараза	$\frac{0.73 \pm 0.16}{6.1 \pm 1.33}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$
Глицил-L-лейциндипептидаза	$\frac{10.3 \pm 1.69}{85.5 \pm 15.6}$	$\frac{4.7 \pm 1.5}{34.6 \pm 11.2}$ (45.6)	$\frac{7.1 \pm 0.9}{42.7 \pm 5.6}$ (68.9)
Щелочная фосфатаза рН 7.4	$\frac{1.88 \pm 0.36}{15.7 \pm 3.0}$	$\frac{1.31 \pm 0.22}{9.6 \pm 1.6}$ (69.7)	$\frac{0.27 \pm 0.01}{1.6 \pm 0.1}$ (14.4)
Щелочная фосфатаза рН 9.9	$\frac{4.63 \pm 0.90}{38.6 \pm 7.5}$	$\frac{1.27 \pm 0.22}{9.3 \pm 1.6}$ (27.4)	$\frac{0.51 \pm 0.02}{3.1 \pm 0.1}$ (11.0)

Примечание. Числа над чертой – активность ферментов в расчете на 1г ткани, под чертой – на 1г белка. Цифры в скобках – относительная активность, процент от активности ферментов в эпителии.

Помимо указанных выше классических типов пищеварения, в последние годы большое внимание уделяется симбионтному, преимущественно микробальному, пищеварению и индуцированному аутолизу. Этот механизм особенно эф-

фективен у икhtiофагов, обладающих желудком с ярко выраженной кислотообразующей функцией, когда жертва проглатывается целиком [3]. В этом случае ферменты тканей жертвы являются дополнительным энзиматическим барьером. Действительно, в условиях выключенного аэробного дыхания усиливаются процессы гликолиза, способствующие закислению цитоплазмы и активизации лизосомальных гидролаз, «взрывающих» жертву изнутри. В этом процессе участвует до 70 различных ферментов, способных разрушить абсолютное большинство химических связей в субстрате. Однако в связи с тем, что в пище хищников преобладают высоко-молекулярные белки, особую роль в деградации структур жертвы, по-видимому, играют катепсины В, D, Н и L, функционирующие в ее тканях и участвующие в расщеплении белка до уровня пептидов [6], которые при транзите химуса по кишечнику вначале атакуются полостными ферментами, затем — щеточнокаемными гидролазами.

Ранее отмечалось последовательное уменьшение гетерогенности источников ферментов и условий их функционирования по мере приближения к апикальной мембране эпителиальных клеток. Так, в полости желудочно-кишечного тракта функционируют не только ферменты, продуцируемые различными железами и эпителиальными клетками рыб, но и экзогенные ферменты объектов питания, а также гидролазы, выделяемые микрофлорой и другими симбионтами. Этот же набор в том или ином соотношении может встречаться в пристеночном слое слизи. В отношении гликокаликса твердо установлено участие в гидролизе пищевых субстратов ферментов, продуцируемых энтероцитами и поджелудочной железой. В то же время не исключено, что некоторое время в этой зоне могут функционировать ферменты симбионтов и жертвы. Начиная с апикальной мембраны энтероцитов, ферментативный пул однороден по происхождению [2].

Из полости пищеварительного тракта, главным образом из кишечника, пищевые субстраты под действием потока воды и ионов, а также заряженных групп слизи, обуславливающих ее сорбционные свойства, попадают в толщу пристеночного слоя слизи, где гидролизуются адсорбированными ферментами различной природы. Сходство структуры «гликокаликса» и секретируемой слизи позволяет перенести многие закономерности, установленные для мембранного гидролиза в гликокаликсе, на процессы, происходящие в адгезированной слизи. Благодаря наличию в зоне апикаль-

ного гликокаликса эндо- и экзогидролаз – ферментов, способных последовательно осуществлять все этапы гидролиза биополимеров, нерасщепленным оказывается относительно небольшое количество молекул. В основном это белки и дипептиды, которые разрушаются в энтероцитах рыб, так же как и у других позвоночных животных, благодаря макро- и микромолекулярным механизмам внутриклеточного пищеварения.

Степень развития отдельных механизмов защиты у рыб разных видов различна и в значительной мере определяется характером их питания. У видов, потребляющих значительное количество белка (типичные и факультативные хищники), активность протеиназ значительно выше, чем у рыб, относящихся по типу питания к другим экологическим группам, пища которых содержит меньше высокомолекулярных белковых компонентов. При этом у хищников, не размельчающих жертву, увеличивается роль индуцированного аутолиза. Если активность протеиназ в 1 г тканей жертвы без учета индуцированного аутолиза составляет в зависимости от таксономической принадлежности трофических партнеров 1/5-1/50 активности протеиназ в 1 г слизистой пищеварительного тракта рыб [2], то за счет процессов аутодеградации в тканях жертвы разрушается от 50 до 90% пептидных связей от суммарной активности одноименных гидролаз трофических партнеров [9]. Это обстоятельство позволило прийти к заключению о том, что ферменты объектов питания компенсируют слабое развитие лимфоидной ткани у рыб.

Таким образом, пищеварительная система рыб обладает не только многоуровневым структурным барьером, но и многоуровневым энзиматическим барьером, препятствующим массивному поступлению во внутреннюю среду организма рыб чужеродных элементов, в частности белковых компонентов пищи.

Влияние тяжелых металлов на энзиматический барьер. Поскольку активность пищеварительных гидролаз зависит от физико-химических условий гастроэнтеральной среды, для выяснения вопроса о влиянии антропогенных факторов на функционирование энзиматического барьера наиболее важны сведения о влиянии загрязняющих веществ на разные звенья протеолиза. Особый интерес представляют тяжелые металлы. Как подчеркивалось выше, содержание меди и цинка в пресной воде незначительно. При этом чувствительность поведенческих реакций исключительно высока.

Так, скорость пищевой реакции достоверно замедляется уже в присутствии 0.28 мг/л в случае цинка и 0.25 мг/л в случае меди [4].

Вместе с тем, активность пищеварительных ферментов рыб не всегда снижается в присутствии этих и больших концентраций цинка и меди. Так, активность гемоглибнитических протеиназ (пре-имущественно пепсина) слизистой оболочки желудка щуки в присутствии цинка практически не изменяется, в присутствии меди уменьшается незначительно (на 10-20%), но достоверно (рис. 3). У окуня активность пепсиноподобных ферментов снижается значительно, чем у щуки, особенно в присутствии меди. Активность казеинлитических протеиназ при нейтральных значениях рН, в значительной мере отражающая активность панкреатических ферментов, попадающих в желудок в результате регургитации, снижается сильнее, чем гемоглибнитических протеиназ, причем у окуня в большей степени, чем у щуки. При этом наиболее сильное снижение (на 80-85%) наблюдается у окуня в присутствии цинка в концентрациях 10-50мг/л, встречающихся в пище. Активность тех же протеиназ слизистой оболочки кишечника, отражающая преимущественно активность химотрипсина и трипсина, у исследованных видов рыб в большинстве случаев последовательно снижается по мере увеличения концентрации тяжелых металлов (рис.4). Однако при концентрации металлов 0.1мг/л может наблюдаться тенденция к увеличению показателя. Важно отметить разную видовую чувствительность гемоглибнитических ферментов к цинку и казеинлитических – к меди. В первом случае наименее чувствительны ферменты щуки, во втором – леща. При концентрациях металла 10 - 50мг/л активность может снижаться на 60-85% от контроля. Кадмий практически не влияет на активность протеиназ. При этом концентрация цинка и меди, способная влиять на активность пищеварительных гидролаз, при поступлении их в форме неорганических соединений может быть существенно ниже получаемой с пищей. Тяжелые металлы могут значительно подавлять активность пищеварительных гидролаз лишь в случае, когда возможности организма синтезировать белки, способные образовывать внутри-комплексные (хелатные) соединения, недостаточны для связывания металлов, поступающих в форме неорганических соединений.

Таким образом, пищеварительная система рыб выполняет функцию неспецифической защиты от токсической и ал-

аллергической агрессии благодаря существованию многоуровневых структурного и энзиматического барьеров. При этом пищеварительные гидролазы играют двуединую роль – обеспечивают функционирование энзиматического барьера, а также участвуют в снабжении организма рыб веществами, необходимыми для успешной реализации различных звеньев специфического иммунитета. Тяжелые металлы, попавшие в желудочно-кишечный тракт с пищей, могут значительно снижать эффективность энзиматического барьера, обеспечивающую неспецифическую защиту рыб от аллергической агрессии.

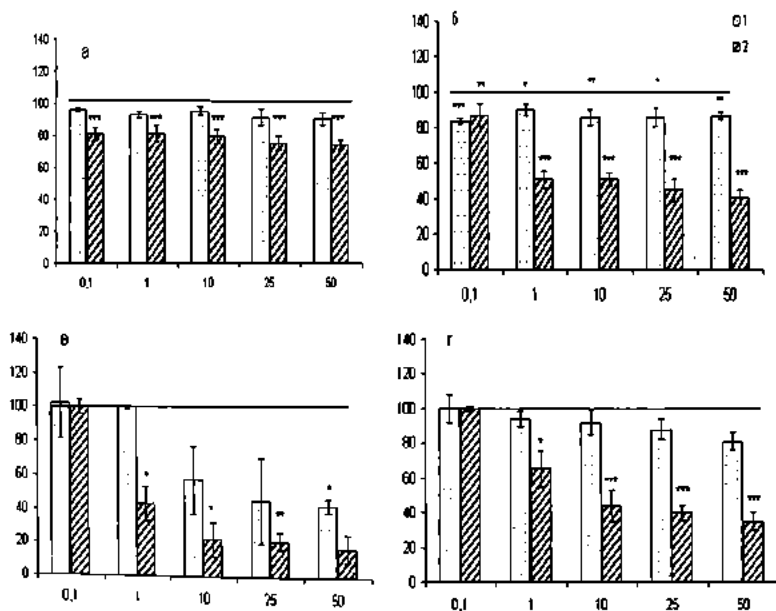


Рис 3. Влияние цинка (а, в) и меди (б, г) на уровень активности гемоглобинлитических (а, б), рН 2.3 и казеинлитических (в, г), рН 7.4 протеиназ слизистой оболочки желудка рыб. По оси абсцисс: концентрация тяжелых металлов, по оси ординат: активность протеиназ в процентах от контроля, принятого за 100. 1 - щука, 2 - окунь. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 01-04-49120).

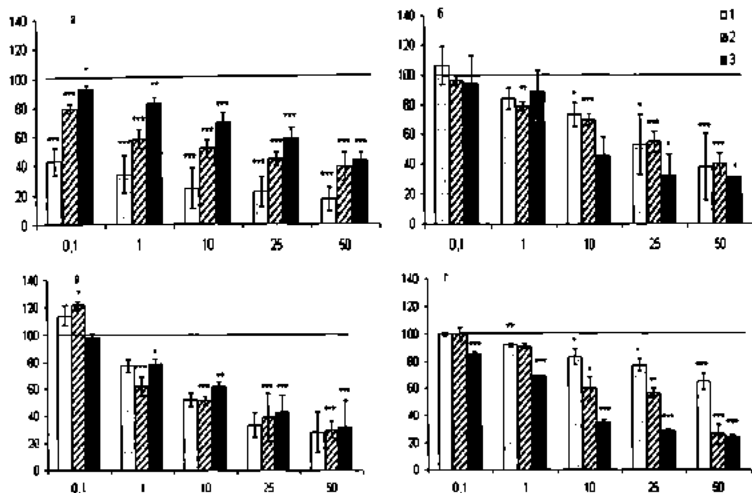


Рис 4. Влияние цинка (а, в) и меди (б, г) на уровень активности гемоглобинлитических (а, б) и казеинлитических (в, г) протеиназ слизистой оболочки кишечника рыб, pH 7.4. По оси абсцисс: концентрация тяжелых металлов, по оси ординат: активность протеиназ в процентах от контроля, принятого за 100. 1 - щука, 2 - окунь, 3 - лещ. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беригина И. А., Жолдасова И.М. Эколого-морфологические особенности пищеварительной системы костистых рыб. Ташкент: Фан, 1982.154 с.
2. Кузьмина В.В. Защитная функция пищеварительного тракта рыб // Вопр. ихтиологии. 1995. Т.35. №. 1. С.86-93.
3. Кузьмина В.В. Вклад индуцированного аутолиза в процессы пищеварения вторичных консументов на примере гидробионтов // Доклады РАН. 2000. Т. 339. №. 1. С.172-174.
4. Кузьмина В.В., Голованова И. Л., Ботяжова О.А., Шишин М. М., Смирнова Е. С. Влияние тяжелых металлов на пищевое поведение и пищеварение у пресноводных костистых рыб. // В кн.: Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. М.: Россельхозакадемия, 2003. С. 64-65.
5. Микряков В. Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск. Изд.: ИББ РАН. 1991.154с.

6. Немова Н.Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск: Кольский Науч. центр РАН, 1996. 104 с.

7. Остроумова И.Н. Биологические основы кормления рыб. СПб.: ГосНИОРХ, 2001. 372 с.

8. Перевозников М.А., Богданова Е.А. Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах. СПб.: ГосНИОРХ, 1999. 228с.

9. Скворцова Е. Г. Роль протеиназ объектов питания и энтеральной микробиоты в процессах пищеварения у рыб разных экологических групп // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Борок. 2002. 21 с.

10. Уголев А.М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л.: Наука. 1985. 544 с.

11. Уголев А.М. Теория адекватного питания и тофология. СПб.: Наука, 1991. 272 с.

12. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Распределение активности пищеварительных гидролаз в эпителиальном, субмукозном и мышечно-серозном слоях кишечника рыб.//ДАН СССР. 1992. Т. 326. №. 3. С. 566-569.

13. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеиздат, 1993. 238 с.

14. Уголев А.М. Иезуитова Н.Н., Тимофеева Н. М. Энзиматический барьер тонкой кишки//Физиол. журн. 1992. Т. 78. №. 8 С.1-2.

15. Buddington R.K., Krogdahl A., Bakke-Mckellep A.M. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet //Acta Physiol Scand. 1997. V. 161. (Suppl.) P. 67-80.

INFLUENCE of HEAVY METALS ON FUNCTION of NONSPECIFIC PROTECTION of the DIGESTIVE tract of FISHES

Kuz'mina V.V., Shishin M.M., Smirnova E.S.
*Institute for biology of inland waters RAS, Borok,
Yaroslavl region.*

The data concerning protective and enzymatic barrier of a digestive tract of fishes, and also influence heavy metals on activity proteinase, carrying out triune function - trophic, protective and transformational are given, first two of which directly influence conditions of immunity at fishes.

**ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАДМИЯ НА НЕКОТОРЫЕ
ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ
ОБЫКНОВЕННОГО КАРПА (*CYPRINUS CARPIO L.*)**

Т.Б. Лапирова, Л.В. Балабанова, В.Р. Микряков
*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-он*

Приводятся данные исследования влияния сублетальных концентраций кадмия на иммунофизиологический статус карпа. Показано, что рыбы на присутствие в воде ионов кадмия реагировали изменением индексов иммунокомпетентных органов, снижением содержания общего белка сыворотки крови, активизацией ее антимикробных свойств. Значительных сдвигов в составе лейкоцитов периферической крови карпа не выявлено.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее токсичных для гидробионтов тяжелых металлов признан кадмий, который легко поглощается рыбами из воды и концентрируется в их теле [21]. Литературные данные свидетельствуют, что долговременная экспозиция в сублетальных дозах Cd неблагоприятно воздействует на физиологический статус рыб, и что это действие частично проявляется через нарушения эндокринной функции [25]. По мнению С.М. Короткова и И.А. Скульского основное действие кадмия связано с его транспортом через биологические мембраны и блокированием дыхательных процессов в митохондриях [7]. Эти данные подтверждаются ультраструктурными исследованиями Л.В. Балабановой, обнаружившей при действии низких концентраций ионов кадмия в нейтрофилах тилапии набухание митохондрий и разрушение их крист в иммунокомпетентных клетках [1]. Кроме того, ионы тяжелых металлов инактивируют металлоферменты, нарушая при этом метаболические процессы, изменяя проницаемость клеточных мембран, соотношение форменных элементов крови, ингибируют окислительное фосфорилирование, синтез белков, нуклеиновых кислот и др. [9]. При этом, несмотря на многочисленные нарушения, вызываемые кадмием, гибели рыб не наблюдается даже при значительной аккумуляции его тканями организма. Причиной этого явления может быть связывание катионов

металла аминокислотами, пептидами и белками, особенно металлотионеинами [6].

Вследствие широкого распространения кадмия в природных водах, а также его разнообразного повреждающего действия на живые организмы, влияние данного токсиканта на гидробионтов и, в частности, на рыб, в настоящее время активно изучается, но имеющиеся данные о вызываемых кадмием сдвигах иммунофизиологических показателей разрозненны, а часто и противоречивы.

Целью настоящей работы было изучение влияния кадмия на иммунофизиологическое состояние карпа при хроническом воздействии. В задачу исследования входил анализ изменений наиболее общих морфофизиологических показателей, таких как индексы иммунокомпетентных органов и содержание общего белка сыворотки крови, а также некоторых параметров клеточного и гуморального звеньев неспецифического иммунитета - соотношения лейкоцитов периферической крови и уровня ее противомикробной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Опыт проводили на годовиках карпа средней массой 91 ± 8 г и длиной 17.6 ± 7 см. Все рыбы находились в аэрируемых 150-л пластиковых аквариумах. Подопытных рыб содержали в растворе соли $Cd(NO_3)_2$ с концентрацией 5 мг/л по иону металла, что составило 0.2 от установленной 96-час LC_{50} , контрольных - в речной воде. Пробы отбирали через 7, 14, 21 и 28 сут.

Индексы органов рассчитывали как отношение массы органа к массе тела без внутренностей, содержание общего белка определяли рефрактометрически. Принцип метода определения бактериостатической активности сыворотки крови (БАСК) основан на ее способности угнетать рост микроорганизмов, в качестве тест-бактерий использовали суточную культуру *Aeromonas hydrophila* [13]. Данные приводятся в процентах угнетения роста бактерий в исследуемых образцах сыворотки по отношению к контрольным, в которые вместо сыворотки добавляли физиологический раствор.

Мазки крови обрабатывали стандартным методом: фиксировали метиловым спиртом и окрашивали по Романовскому-Гимза. При подсчете лейкоцитарной формулы пользовались классификацией Н.Т. Ивановой [3; 4].

Полученные данные обработаны статистически в программе Excel при $P=0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Индексы органов. При исследовании действия кадмия на организм рыб было установлено, что в первую очередь происходит поражение почек, ингибирование активности обменных процессов в почечных клетках [16; 29]. Однако значимых отклонений морфометрических параметров органа, а именно относительной массы почек, от контроля в нашем опыте не было выявлено (Рис.1 а).

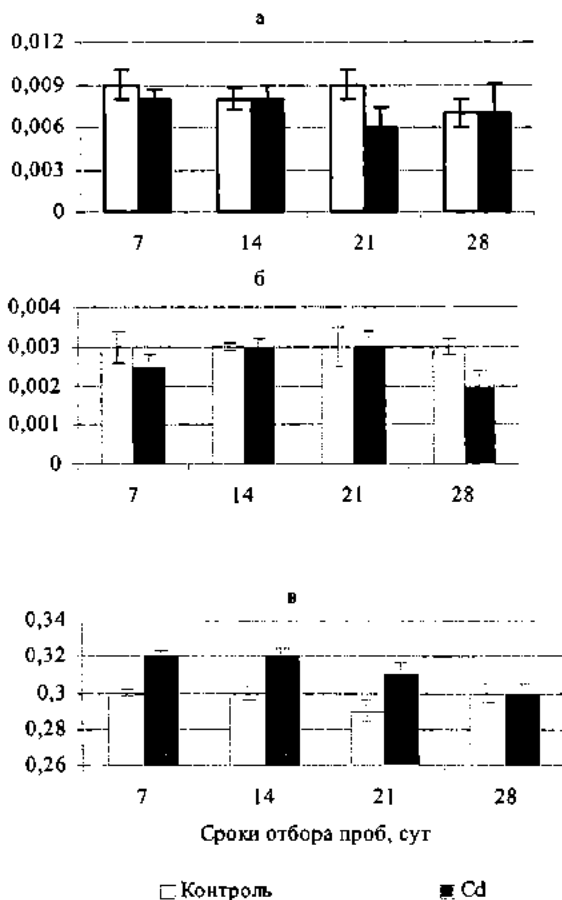


Рис. 1. Индексы почек (а); селезенки (б) и печени (в) карпа, относительные единицы

Индексы селезенки к концу срока наблюдений достоверно снизились относительно контроля, что может свидетельствовать о развитии дистрофических изменений в органе под действием кадмия (Рис. 1б). Следует отметить, что аналогичное явление отмечали при действии на карпа и фосфорсодержащего пестицида — карбофоса — в концентрации 0.1 от 96-час LC_{50} [2].

По гепатосоматическому индексу, напротив, в течение двух недель с начала эксперимента было установлено статистически достоверное увеличение исследуемого показателя, затем существенных различий от контроля не выявлено (Рис. 1в). Возрастание этого показателя является характерным при различного рода токсических воздействиях и является адаптивным ответом, отражающим усиление детоксикационной функции печени в отношении чужеродных веществ [20]. Учитывая возврат индексов печени к исходным величинам, можно заключить, что сила применяемого в данном опыте воздействия (концентрация токсиканта и время экспозиции) оказалась недостаточной, чтобы вызвать более стойкие изменения в органе, и после прохождения стрессорно-адаптационной фазы наступило приспособление организма рыб к изменившимся условиям и выход его на новый уровень гомеостаза. В то же время экспозиция молоди осетра в соли кадмия эквитоксической концентрации не вызвала значимых отклонений индексов селезенки и печени [10]. Это свидетельствует о том, что эти органы оказались более чувствительными к действию ионов кадмия у карпа, чем у осетра, то есть о наличии видовых особенностей реагирования иммунокомпетентных органов рыб на токсические факторы одинаковой природы.

Общий белок. Показано, что при действии различных химических факторов, как правило, происходит снижение уровня общего белка плазмы крови [12; 18] аналогичное явление отмечено также при инфекционных заболеваниях, повреждении почек, истощении [17]. Это связано с происходящими в процессе адаптации повышением удельной интенсивности энергетического обмена и гормональной деятельности, снижением удельной интенсивности белкового прироста и увеличением содержания воды в крови [5].

Данные, полученные в нашем эксперименте по динамике изменения содержания общего белка сыворотки крови при экспозиции рыб в соли кадмия, соответствуют описанной в литературе для других видов воздействия: к 21 сут проявилась тенденция к снижению показателя, к 28-м сут этот

сдвиг стал статистически достоверным (Рис. 2), что свидетельствует о серьезных нарушениях белкового обмена, вызванных воздействием используемого токсиканта.

Бактериостатическая активность сыворотки крови. Мнения исследователей о действии кадмия на гуморальное звено как специфического, так и врожденного иммунитета во многом не совпадают. Так, после экспонирования радужной форели в растворах соли кадмия О'Нейлом было отмечено снижение уровня активности лизоцима, интерферона, комплемента и антител в сыворотке крови [24]. Описано иммуносупрессивное действие сублетальной концентрации ионов кадмия на антителообразование у канального сомика [27], в то время как другими исследователями, напротив, установлено усиление гуморального ответа [28].

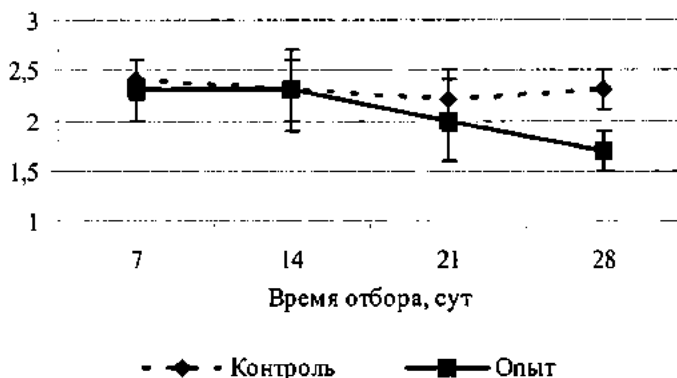


Рис. 2. Содержание общего белка сыворотки крови, мг%.

В экспериментах, проведенных нами ранее, по определению антибактериальных свойств гомогенатов тканей личинок плотвы было установлено, что в норме они не подавляют рост тест-бактерий. Экспозиция рыб в растворах соли Cd при концентрациях 2.5; 5.0 и 7.5 мг/л по иону металла вызвала активизацию гуморального звена неспецифического иммунитета, причем степень проявления этого эффекта находилась в обратной зависимости от концентрации токсиканта [11]. Эти результаты согласуются с данными В.Н. Крючкова и Ю.Б. Алиновской, показавшими, что действие ионов Cd в течение 30 сут вызвало повышение активности гуморальных факторов у карпа, таких, как БАСК и количество иммуноглобулинов [8].

Наши результаты продемонстрировали значительное сти-

мулирующее действие ионов кадмия на неспецифические защитные свойства сыворотки крови подопытных карпов: прирост бактериальной тест-культуры у них был на 40% меньше, чем у контрольных рыб (Рис. 3). Отмеченный на первых этапах пребывания рыб в растворе токсиканта стимулирующий эффект далее снижался, и к концу срока наблюдений показатель достиг контрольного уровня. Полученная кривая противомикробных свойств сыворотки крови отражает недостаточную силу действия раздражителя для того, чтобы вызвать развитие депрессивной фазы ответа белковых систем крови на этом этапе эксперимента.

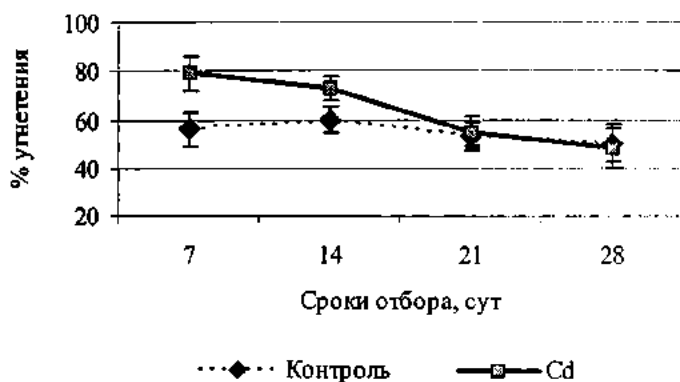


Рис. 3. Бактериостатическая активность сыворотки крови карпа

Установлено, что ионы Cd легко связываются и встраиваются в третичную структуру широкого ряда биологически активных молекул. Основные метаболические и ферментные процессы у рыб также подвержены воздействию тяжелых металлов [24]. Токсическое действие кадмия заключается в блокировании им биохимических реакций в тканях и органах рыб посредством связывания функциональных групп ферментов или вытеснения микроэлементов из их активных центров [6]. Поскольку противомикробные свойства сыворотки крови являются результатом взаимосвязанной и взаимообусловленной работы комплекса ферментных систем, перечисленные свойства кадмия не могут не оказывать выраженного влияния на гуморальный иммунитет, причем как на неспецифические, так и на специфические его составляющие.

Реакция лейкоцитов периферической крови. Имеющиеся данные о влиянии кадмия на показатели крови рыб весь-

ма противоречивы. Например, А. Тувандером не отмечено изменений лейкоцитарной формулы и соотношения клеток-фагоцитов у радужной форели после экспозиции рыб в растворе ионов кадмия различной концентрации [28]. И даже при значительном снижении жизнеспособности у карпа после кратковременной (3 час) экспозиции в растворе соли Cd также не было установлено явно выраженных сдвигов показателей крови [30]. В то же время большая часть исследователей отмечает падение относительного, а иногда и абсолютного числа лейкоцитов в периферической крови. Лейкопения под влиянием солей Cd выявлена у окуневых [22], карпа [8]. Как правило, снижение относительного числа лимфоцитов сопровождается увеличением доли нейтрофилов, это показано, в частности, в опыте на золотых рыбках [23], теляпиях [26]. Ионы кадмия в концентрации LC_{50} у анабаса (*Anabas scandens* Сув.) вызывали снижение относительного количества малых лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов и эозинофилов [19]. Ранее нами были выявлены значительные сдвиги в соотношении лейкоцитов периферической крови у молоди осетра под действием соли кадмия, по некоторым типам клеток довольно длительные, а также снижение интенсивности лейкопоза [14]. Помимо указанных изменений относительного содержания фагоцитов, было зафиксировано и снижение фагоцитарной активности *in vitro*: как числа активных фагоцитов, так и индекса фагоцитоза [15].

При подсчете лейкоцитарной формулы периферической крови карпа нами учитывались следующие типы лейкоцитов: лимфоциты, метамиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы и моноциты. Как в контрольной, так и в опытной группах рыб наблюдался высокий процент содержания лимфоцитов - не ниже 90% (Табл.). Изменений относительного количества этой основной группы лейкоцитов под действием ионов кадмия не выявлено. Частота встречаемости эозинофилов и моноцитов у карпа в норме не велика, что наблюдалось и в нашем опыте, размах колебаний процентного содержания этих клеток был относительно велик и не позволил выявить какой-либо закономерности в ходе эксперимента.

Не было обнаружено значимых изменений также в процентном содержании предшественников нейтрофилов - метамиелоцитов. Однако по обеим зрелым формам нейтрофилов - как палочко-, так и сегментоядерным, отмечено достоверное превышение над контролем. Начавшееся через 14

сут с начала опыта, по сегментоядерным нейтрофилам оно продолжалось в течение примерно 2-х недель, по палочко-ядерным – до конца наблюдений. Полученная картина изменений относительного содержания лейкоцитов может, скорее всего, свидетельствовать о вялотекущей воспалительной реакции.

Таблица
Состав лейкоцитов периферической крови карпа

Сроки отбора, сут	Типы клеток					
	Лимфоциты	Метамеллоциты	Нейтрофилы палочкоядерные	Нейтрофилы сегментоядерные	Эозинофилы	Моноциты
7	90.3 ± 8.2	1.2 ± 0.7	2.7 ± 0.4	2.8 ± 0.6	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.4
	90.5 ± 6.7	2.5 ± 0.6	2.9 ± 0.5	2.1 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3
14	91.2 ± 9.0	2.0 ± 0.4	$3.1 \pm 0.6^*$	$1.7 \pm 0.3^*$	1.5 ± 0.6	0.9 ± 0.3
	93.2 ± 10.2	2.0 ± 0.6	1.8 ± 0.5	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.4
21	91.1 ± 5.0	2.8 ± 0.4	$3.3 \pm 0.8^*$	$2.1 \pm 0.4^*$	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.3
	93.0 ± 6.3	2.5 ± 0.5	1.5 ± 0.4	0.5 ± 0.2	1.5 ± 0.6	1.0 ± 0.4
28	90.0 ± 11.3	3.0 ± 0.6	$3.3 \pm 0.4^*$	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.6	0.6 ± 0.4
	96.5 ± 7.8	2.7 ± 0.8	0.5 ± 0.3	1.0 ± 0.5	0	0

Примечание: в числителе – показатели рыб, экспонированных в растворе соли кадмия, в знаменателе – контрольных. * помечены данные, достоверно отличающиеся от контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты и литературные данные позволяют заключить, что ионы кадмия вызывают общую неспецифическую стрессовую реакцию, проявляющуюся в инициации патологических процессов в печени, последовавшее за этим нарушение протеосинтеза и, в конечном счете, снижение содержания сывороточного белка. Защитные свойства сыворотки крови на начальных этапах эксперимента напротив, значительно активизировались. При этом в лейкоцитарной формуле периферической крови у карпа значительных отклонений не было обнаружено, что позволяет сделать вывод о неоднозначности реагирования разных звеньев иммунной системы рыб на токсическое воздействие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балабанова Л.В. Влияние тяжелых металлов на ультраструктуру иммунокомпетентных клеток селезенки и почек осетра *Acipenser baeri* Brandt//Биология внутренних вод. 1998. № 2. С. 80-85.
2. Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Микряков В.Р. Влияние карбофоса и иммунизации бактериальным антигеном на некоторые показатели иммунной системы карпа *Cyprinus carpio* L. (Cyprinidae)//Вопр. ихт., 2003. Т. 43, №2. С. 262-271.
3. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 184 с.
4. Иванова Н.Т. Система крови. Материалы к сравнительной морфологии системы крови человека и животных. Ростов н/Д. 1995. 155 с.
5. Кирсинуу Ф.Й. Адаптационные изменения в белковой системе сыворотки крови рыб//V Всес. конференция по экологической физиологии и биохимии рыб. Тез. докл. Ч.1. Физиолого-биохимические аспекты адаптаций. Киев: Наукова думка, 1982. С. 68-69.
6. Коновалов Ю.Д. Связывание кадмия и ртути белками и низкомолекулярными тиоловыми соединениями рыб (обзор)//Гидроб. журнал. 1993. Т. 29. №1. С.42-51.
7. Коротков С.М., Скульский И.А. Изменение влияния Cd^{2+} на дыхание изолированных митохондрий печени крысы после их преинкубации с Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} и рутениевым красным //Цитология. 1996. Т. 38. № 4/5. С. 500-510.
8. Крючков В.Н., Алиновская С.Б. Обратимость некоторых иммунологических показателей карпа после интоксикации кадмием //Вопр. Рыбол. 2000. Т.1. № 2-3. С. 21-22.
9. Курант В.З. Динамика белков и нуклеиновых кислот в организме карпа под влиянием повышенных концентраций марганца, цинка и меди//Гидробиол. Ж. 2001. 37. № 4. С. 45-51.
10. Лапирова Т.Б. Влияние сублетальных концентраций ртути, меди и кадмия на иммунофизиологическое состояние молоди ленского осетра// Биол. Внутр. вод. №3. 2001. С. 80-84.
11. Лапирова Т.Б., Изюмов Ю.Г., Микряков В.Р. Влияние ионов кадмия на антибактериальные свойства тканей личинок плотвы (*Rutilus rutilus*, L.)// "Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре". Тез. науч.-практ. конф. М. Россельхозакадем. 2000. С. 80-81.

12. Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 320 с.
13. Методические указания по определению уровня естественной резистентности рыб к инфекционным болезням. М.: Госагропром РСФСР, 1987. 38с.
14. Микряков В.Р., Лапирова Т.Б. Влияние солей некоторых тяжелых металлов на картину белой крови молодого осетра *Acipenser baeri* Brandt // Вопр. ихт. 1997. Т. 37. № 4. С. 538—542.
15. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисленные среды. М.: Наука, 2001. 126 с.
16. Мирза Х.С. Морфологические и функциональные реакции органов и тканей карася на воздействие кадмия // Автореф. дис. Кандид. Биол. наук. Астрахань. АГТУ. 2000. 24 с.
17. Смит Л.С. Введение в физиологию рыб. М.: Агропромиздат, 1968. 168 с.
18. Сторожук И.А., Шеханова И.А. Физиолого-биохимические изменения в организме кеты под влиянием ртути // Тез. докл. IV Всес. конф. по экол. биох. рыб. Астрахань: ЦНИИОХ, 1979. С. 128-130.
19. Banerjee V., Verma G.K. Effect of heavy metal poisoning on leucocytes of *Anabas testudineus* (Bloch) // *Geobios* (India). 1987. V. 14. N 2-3. P. 129-131.
20. Goede R.W., Barton B.A. Organismic Indices and Autopsy-Based Assessment as Indicators of Health and Condition of Fish // *Amer. Fisher. Society Sympos.* 1990. V. 8. P. 93-108.
21. Houston A.H., Keen J.E. Cadmium inhibition of erythropoiesis in goldfish, *Carassius auratus* // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1984. V. 41. P. 1829-1833.
22. Mishra S., Strivastava A.K. The acute toxic effects of cooper on the blood of teleost // *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 1980. V. 4. P. 191-194.
23. Murad A., Houston A.H. Leucocytes and leycopoietic capacity in goldfish *Carassius auratus* exposed to sublethal levels of cadmium // *Aquat. Toxicol.* 1988. 13. 141. P. 141-147.
24. O'Neill J.C. The humoral immune response of *Salmo trutta* (L.) and *Cyprinus carpio* (L.) exposed heavy metals // *J. Fish Biol.* 1981. Vol. 19. N 3. P. 297-306.
25. Ricard A.C., Daniel C., Anderson P., Hontela A. Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) //

- Environ. Contam. and Toxicol. 1998. V. 34. N 4. P. 377-381.
26. *Ruparellia S.G., Verma Jogendra, Sayed S.R., Rawae U.M.* Effect of cadmium on blood of Tilapia, *Jreochromis mossambicus* (Peters), during prolonged exposure// Bull. Environ. Contam. and Toxicol. 1990. V. 45. N 2. P. 305-312.
27. *Saxena M.P., Gopal K., Jones W., Ray P.K.* Immune responses to *Aeromonas hydrophila* in cat fish (*Heteropneustis fossilis*) exposed to cadmium and hexachlorocyclohexane//Bull. Environ. Contam. and Toxicol. 1992. V. 48. N 2. P. 194-201.
28. *Thuvander A.* Cadmium exposure of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson: effects on immune functions// J. Fish Biol. 1989. V. 35. N 4. P. 521-529.
29. *Vilella S., Ingrosso L., Lionetto M.G., Schettino T.* Effect of cadmium and zinc on the Na⁺/H⁺ exchanger present on the brush border membrane vesicles isolated from eel kidney tubular cells//Aquat. Toxicol. 2000. V. 48. N 1. P.25-36.
30. *Witeska M.* Changes in selected blood indices of common carp after acute exposure to cadmium// Acta Vet. Brno. 1998. V. 67. P. 289-293.

**INFLUENCE OF CADMIUM IONS ON SOME
PARAMETERS OF IMMUNOREACTIVITY OF AN CARP
(CYPRINUS CARPIO L.)**

T.B.Lapirova, L.V.Balabanova, V.R.Mikrjakov
*Papanin's Institute for biology of inland waters of the
Russian Academy of Science*

The dates of cadmium sublethal concentration influence on immunophysiological status of a carp researches are presented. It is shown, that action of toxicant has caused fluctuations of indexes immunocompetent organs, decrease of the serum blood contents, activation of its antimicrobial properties. Significant shifts in the structure of a carp peripheral blood leukocyte it is not revealed.

**РЕАКЦИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ КАРАСЯ *CARASSIUS*
CARASSIUS. L. НА ВОЗДЕЙСТВИЕ
ДЕКСАМЕТАЗОН-ФОСФАТА**

Микряков Д.В., Микряков В.Р., Попов А.В.

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н,
E-mail: mvr@ibiw.yaroslavl.ru*

Изучено влияние дексаметазон-фосфата (аналога кортизона) на функциональное состояние и состав лейкоцитов карася (*Carassius carassius*, L). Рыбы на введение гормона реагировали де- и рестабилизацией состава белых клеток крови и изменением их функционального состояния. У рыб, получивших инъекцию дексаметазон-фосфата, отмечено уменьшение количества лимфоцитов на 25-60% и увеличение гранулоцитов на 30-50% по сравнению с контрольными. У опытных рыб также наблюдалось снижение спонтанной и стимулированной хемилюминесценции. Дестабилизационный эффект гормона на лейкоциты рыб выявлен в течение первых 7 суток. Установленные под влиянием гормона изменения в составе лейкоцитов аналогичны тем, которые наблюдаются при воздействии на рыб стресс факторов.

ВВЕДЕНИЕ

Дексаметазон-фосфат - синтетический аналог глюкокортико-стероидного гормона кортизона, который является производным кортизола [7] и вырабатываются корой надпочечников. Под влиянием глюкокортикоидных гормонов усиливаются процессы апоптоза лимфоцитов, подавляются иммунологические функции по распознаванию «своего» и «чужого», разрушению антигена и синтезу антител [2, 3, 5, 11, 13, 18, 22], тогда как число нейтрофильных лейкоцитов увеличивается [15]. Исследования зарубежных ученых [16, 23], проведенные на других видах рыб, указывают на снижение функциональной активности лейкоцитов под действием кортикостероидов. Воздействие стресс-факторов на организм животных приводит к увеличению секреции глюкокортикоидных гормонов, что обеспечивает адаптацию к колеблющимся факторам среды обитания [10].

Иммунорегуляторное свойство кортизона, как установлено на высших позвоночных, связано с лимфолитическим и тимолитическим действием на гормончувствительные лим-

фоциты [7, 11, 13], ответственных за распознавание и разрушение чужеродных тел. Это происходит благодаря наличию у лимфоцитов гормонсвязывающих рецепторов [8].

Ранее нами установлено, что под воздействием кортизола [5] подавляется функция антителообразования. На основе полученных результатов по изучению влияния глюкокортикоидных гормонов на синтез антител выдвинуто положение, что под влиянием гидрокортизона подавляется функция клеточного звена иммунитета за счет гибели гормончувствительных лимфоцитов или подавления функции лимфопоэза.

В целях проверки данного предположения нами проведено исследование характера влияния дексаметазон-фосфата на структурно-функциональное состояние лейкоцитов карася (*Carassius carassius*. L).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты ставились на карасях в возрасте 1+, средней массой 30-40 г. Рыб содержали в аэрируемых аквариумах при температуре воды 18-20°C. В качестве гормонального препарата использовали дексаметазон-фосфат (аналог кортизона), фирмы КРКА, Novo mesto, Slovenia. По эффективности 0.75 мг дексаметазона соответствует 25 мг кортизона. Данный препарат часто используют для изучения глюкокортикоидных рецепторов, определения содержания гормончувствительных лимфоцитов и исследования их роли в реализации иммунологических функций [11, 13, 15].

Обработку рыб гормоном проводили путем парентеральных инъекций в дозе 0.2 мл (0.8 мкг) на 1 особь. Сбор материала осуществляли через 1, 3, 7, 15 и 18 суток после внутрибрюшинной инъекции гормона. Опыт начали через две недели после пересадки рыб в аквариумы, для снятия стресса, который мог повлиять на полученные данные.

О влияние дексаметазон-фосфата на клетки иммунной системы рыб судили по данным анализа состава лейкоцитов. Кровь получали из хвостовой вены. Состав лейкоцитов определяли в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимза. В каждой мазке определяли относительное количество лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов, базофилов и тромбоцитов под световым микроскопом МБИ-15.

Функциональное состояние лейкоцитов определяли по спонтанной и зимозанстимулированной хемилюминесцентной активности. Измерение хемилюминесцентной активнос-

ти проводили с помощью автоматизированной системы «Люцифер-Б» А/О «Мир-Диалог», согласно методике [4, 6].

Результаты исследований подвергали статистической обработке при уровне достоверности $P=0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние дексаметазон-фосфата на количественный состав лейкоцитов. Главное отличие в количественном составе клеток белой крови рыб от высших позвоночных, состоит в том, что они представлены в основном лимфоцитами, тогда как у теплокровных - клетками нейтрофильного ряда [1]. У исследуемого вида на долю лимфоцитов приходится 80-90% клеток от общего числа лейкоцитов, а на долю гранулоцитов, представителями которых являются нейтро-, эозино- и базофилы, приходится гораздо меньшее число клеток (табл. 1).

Лимфоциты рыб, как и у представителей других классов позвоночных, играют главную роль в работе иммунной системы. Они по характеру выполняемых функций, содержанию мембранных иммуноглобулиновых рецепторов, продолжительности жизни, гистогенезу гетерогенны и подразделяются на две субпопуляции. Условно их обозначают как Т- и В- лимфоциты [3, 21].

Т-лимфоциты в организме рыб осуществляют распознавание «своего» и «чужого», участвуют в отторжении трансплантата, презентации антигена макрофагам, обладают цитотоксической активностью и т.д. Местом образования этих клеток является тимус, и они относятся к долгоживущим клеткам.

Популяция В-лимфоцитов выполняет функцию синтеза антител и образования предшественников антителообразующих клеток. Они относятся к короткоживущим клеткам.

Важную роль в реализации иммунологических функций выполняют и другие типы или популяции лейкоцитов: гранулоциты и моноциты. Они участвуют в фагоцитозе микроорганизмов, синтезе цитокинов, медиаторов иммунного ответа, неспецифических факторов иммунитета: лизоцима, интерферона, гемолизина, хитиназы и т.д.

В периферической крови карася нами обнаружены тромбоциты в пределах 2-4 %. Функция тромбоцитов в иммунном ответе у рыб не достаточно изучена, хотя показана их фагоцитарная и бактерицидная активность у карпов [24]. У млекопитающих в случае повреждения эндотелия они

прилипают к субэпителиальной поверхности поврежденной сосудистой стенки, образуя агрегаты. При этом из тромбоцитарных гранул двух типов высвобождается серотонин и фибриноген, что приводит к повышению проницаемости капилляров, активации комплемента и, вследствие этого, к привлечению лейкоцитов к местам скопления чужеродных тел.

Анализ полученных результатов показал, что караси на введение дексаметазона реагировали изменением количественных характеристик всех типов лейкоцитов и тромбоцитов (Табл.). У рыб, подвергнутых обработке гормональным препаратом, отмечено снижение количества лимфоцитов, тогда как других клеток, особенно нейтрофилов и моноцитов повышается. Максимальный размах изменений в составе лейкоцитов установлен через 1 сутки после начала опыта. Количество лимфоцитов по сравнению с контрольными снижается более чем в 2-3 раза и составляет 30-40 % от общего числа клеток. Содержание других типов клеток, напротив увеличивается, особенно нейтрофилов до 30 % и моноцитов до 5-7 %. Одновременно, с нейтрофилами в крови рыб установлен высокий уровень содержания тромбоцитов, количество которых в опыте превышало таковые у контроля более чем в 4 раза. Данные, полученные через 3 суток, указывают на постепенное снижение разбалансированности состава лейкоцитов между клетками опытных и контрольных рыб. Об этом свидетельствуют величины содержания отдельных типов клеток. Количественные характеристики лимфоцитов повышаются, а гранулоцитов и тромбоцитов снижаются. К концу недели показатели между опытом и контролем имеют небольшое различие, что указывает на возвращение к норме. Количество лимфоцитов составляет 70-80 %, нейтрофилов 10-15 %, моноцитов 5-6 % и тромбоцитов 6-7 %. В последующие сроки наблюдения различия между величинами отдельных типов клеток в опыте и контроле сглаживаются.

Таким образом, из материалов исследований следует, караси на воздействие дексаметазон-фосфата реагируют изменением уровня содержания отдельных типов лейкоцитов. Выявленные изменения в составе клеток крови связаны с лимфоцитопенией, грануло- и тромбоцитозом.

Влияние дексаметазон-фосфата на функциональную активность лейкоцитов. Фагоцитоз лейкоцитами частиц, активация их различными веществами вызывает в клетках повышение окислительного метаболизма, так называемый метаболический или «дыхательный взрыв», проявляющийся

ся в усилении потребления кислорода, активации ферментов и выделения из клеток активных кислородных радикалов. Усиленная генерация кислородных радикалов в фагоцитах при их активации и вызванная ими хемилюминесценция коррелирует с повышением киллинга поглощенных внутриклеточно микроорганизмов, и поэтому последняя может служить косвенным критерием их фагоцитарной и киллерной способности, тем более что образуемые кислородные метаболиты обладают выраженными бактерицидными свойствами.

Таблица

**Изменение количества лейкоцитов и тромбоцитов
под влиянием дексаметазона, %**

Форма клеток крови	Время, сут					
	1	3	7	15	18	
Лимфоциты	88.0 ± 2.02 $34.6 \pm 8.36^*$	88.2 ± 0.58 $52.6 \pm 7.67^*$	89.4 ± 1.07 $72.6 \pm 6.83^*$	89.2 ± 1.46 88.6 ± 2.50	89.8 ± 0.66 89.75 ± 1.43	
Базофилы	1.0 ± 0.31 $5.6 \pm 1.69^*$	1.2 ± 0.20 4.0 ± 1.30	1.0 ± 0.31 2.8 ± 0.86	1.0 ± 0.31 2.0 ± 0.44	1.0 ± 0.31 1.0 ± 0.40	
Эозинофилы	0.4 ± 0.24 1.6 ± 0.74	0.6 ± 0.40 $2.8 \pm 0.37^*$	0.6 ± 0.24 0.6 ± 0.40	0.4 ± 0.24 1.4 ± 0.97	0.4 ± 0.24 0.25 ± 0.25	
Моноциты	1.2 ± 0.73 6.8 ± 3.23	1.0 ± 0.44 7.8 ± 3.48	0.4 ± 0.24 6.2 ± 4.29	0.4 ± 0.24 1.6 ± 0.60	0.4 ± 0.24 $1.75 \pm 0.47^*$	
Тромбоциты	3.4 ± 0.74 $15.6 \pm 3.31^*$	3.6 ± 0.67 $11.6 \pm 2.50^*$	2.6 ± 0.24 6.4 ± 1.96	2.2 ± 0.20 3.0 ± 1.41	2.2 ± 0.20 1.75 ± 0.75	
Н Е Й Т Р О Ф И Л Ы	Юные	1.2 ± 0.58 $11.4 \pm 1.96^*$	2.2 ± 0.58 5.0 ± 1.30	1.8 ± 0.37 2.2 ± 0.73	1.8 ± 0.58 0.8 ± 0.20	1.8 ± 0.20 1.0 ± 0.57
	Палочко- ядерные	1.8 ± 0.37 $13.2 \pm 1.82^*$	1.8 ± 0.37 $6.4 \pm 1.20^*$	1.6 ± 0.40 $4.4 \pm 0.92^*$	2.2 ± 0.20 $0.8 \pm 0.37^*$	2.0 ± 0.44 1.75 ± 0.85
	Сегменто- ядерные	3.0 ± 1.37 $11.2 \pm 2.37^*$	1.4 ± 0.67 $9.8 \pm 2.24^*$	2.6 ± 0.24 $4.8 \pm 0.58^*$	2.8 ± 0.37 1.8 ± 0.73	2.4 ± 0.24 2.75 ± 0.85

Примечание: над чертой — контроль; под чертой — опыт, * - достоверные различия при $P \geq 0.05$.

Анализ хемилюминесценции фагоцитов выявляет образование клетками активных кислородных радикалов, включая супероксидный анион, синглетный кислородный гидроксильный радикал, участие в определенной степени миелопероксидазы фагоцитов, которая является показателем интенсивности дыхания клеток при фагоцитозе [14]. Хемилюминесценция фагоцитов возникает не только при фагоцитозе частиц, но и

при адгезии клеток на поверхность, что используют для изучения кислородного метаболизма фагоцитов.

Для определения влияния глюкокортикоидных гормонов на функциональную активность лейкоцитов к сыворотке крови карасей добавляли дексаметазон-фосфат. Об адгезивной и фагоцитарной активности лейкоцитов судили по результатам спонтанной и стимулированной хемилюминесценции. Полученные данные говорят о супрессивном влиянии аналога кортизона на функциональное состояние белых клеток крови (Рис.).

Анализ результатов спонтанной и стимулированной хемилюминесценции показал различие между опытом и контролем. Добавление к сыворотке крови гормона вызвало понижение у лейкоцитов как адгезивной, так и фагоцитарной активности. Средний уровень спонтанной хемилюминесценции составил в опыте 109.4, а в контроле - 118.8 и стимулированной в опыте - 155.8, а в контроле - 176.2.

Полученные нами результаты подтверждаются исследованиями зарубежных ученых [16, 23], проведенные на других видах рыб. Видимо, на снижение функциональной активности влияет гибель лимфоцитов и как следствие сокращение синтеза лимфокинов, отвечающих за активацию лейкоцитов.

Уменьшение количества лимфоцитов с одной стороны и увеличение гранулоцитов с другой свидетельствует также о том, что под влиянием аналога кортизона изменяется процесс дифференцировки стволовых кроветворных клеток в сторону гранулопоэза и миелопоэза, а процесс лимфопоэза подавляется. Это происходит, видимо, в результате прекращения синтеза кортизончувствительными клетками цитокинов или интерлейкинов, контролирующими образование предшественников лимфоидных клеток. Из этого следует, что под влиянием дексаметазон-фосфата прежде всего погибают клетки ответственные, не только за распознавание «своего» и «чужого», но и секрецию цитокинов. Вероятно у рыб, как и у высших позвоночных, основную часть гормончувствительных лимфоцитов составляют Т-лимфоциты, которые продуцируют интерлейкины, участвующие в активации, пролиферации клеток иммунной системы и регуляции лимфопоэза. В следствии сокращения количества лимфоцитов подавляется функция макрофагов по разрушению антигена и передаче иммуногена предшественникам антителообразующих клеток.

Полученные данные, подтверждают наши ранее выдвину-

тые предположения [5], что под влиянием глюкокортикоидных гормонов поражаются, прежде всего, лимфоциты, выполняющие разнообразные иммунологические функции. Они вероятно, как и у высших позвоночных, имеют на своей поверхности кортикостероидные рецепторы. По видимому, у рыб, как и у млекопитающих, под влиянием кортизона включается программа саморазрушения или апоптоза лимфоцитов. Основными этапами которого являются активация нелизосомальной эндонуклеазы вследствие повышения уровня внутриклеточного Ca^{2+} , конденсация хроматина, активация ядерной эндонуклеазы и фрагментация ДНК [9, 12, 13].

Вполне возможно, введение глюкокортикоидных гормонов вызывает в организме рыб реакции, аналогичные тем, которые происходят при стрессе [2, 10]. Первоначально происходит лимфоцитоллиз, вследствие которого изменяется соотношение между лимфоцитами и гранулоцитами, обусловленное подавлением лимфопоэза и усилением гранулопоэза. Ибо известно, что рыбы на стресс факторы, как правило, реагируют усилением секреции глюкокортикоидных гормонов, прежде всего кортизола [17, 19, 20].

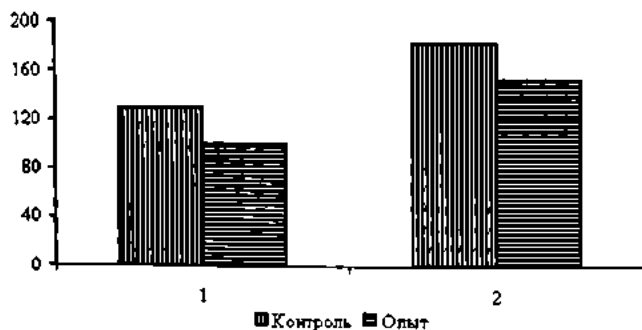


Рис. Влияние дексаметазон-фосфата на хемилюминесцентную активность лейкоцитов карася в условиях *in vitro*. По оси абсцисс - 1 - спонтанная, 2 - стимулированная активность, по оси ординат - импульс, сек.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кортизон в организме рыб вызывает де- и рестабилизационные процессы в составе лейкоцитов. Они связаны с изменением соотношения между лимфоцитами и гранулоцитами и изменением их функционального состояния. На первых

этапах отмечается явление лимфоцитопении и гранулоцитоза, а затем – процесс восстановления состава лейкоцитов. Установленные закономерности в изменении лейкоцитарной формулы отражают развитие общего адаптационного синдрома по Селье [10] на стресс. Выдвинуто положение, что лимфоциты по чувствительности к кортизону неоднородны и состоят из кортизончувствительных и кортизонрезистентных клеток. Чувствительность лимфоцитов к гормону обусловлена наличием у них кортизонсвязывающих рецепторов. Снижение содержания лимфоцитов происходит за счет цитолиза кортизончувствительных клеток, ответственных за реализацию функции распознавания «своего» и «чужого» и синтез цитокинов, контролирующих дифференцировку стволовых кроветворных клеток в сторону образования клеток лимфоидного ряда.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 03-04-49309).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Иванова Н.Т.* Система крови. Материалы к сравнительной морфологии системы крови человека и животных. Ростов н/Д: Изд-во РГПИ, 1995. 152 с.

2. *Лозовой В.П., Шергин С.М.* Структурно-функциональная организация иммунной системы. Новосибирск: Наука. 1981. 226 с.

3. *Микряков В.Р.* Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск. 1991. 153 с.

4. *Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. и др.* Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление воды. М.: Наука. 2001. 126 с.

5. *Микряков Д.В., Микряков В.Р.* Влияние гидрокортизона на антителообразовательную функцию иммунной системы карпа (*Cyprinus carpio*) // *Вопр. ихтиол.* 2002. Т. 42. № 6, С. 820-824.

6. *Попов А.В.* Хемилюминесценция лейкоцитов карпа в опыте с карбофосом: Тез. докл. международной конф. «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов европейского севера», Петрозаводск, 1995. С. 217-218.

7. *Розен В.Б.* Основы эндокринологии. М.: МГУ, 1994. 384 с.

8. *Розен В.Б., Смирнов А.Н.* Рецепторы и стероидные гормоны. М.: МГУ, 1981. 312 с.

9. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология. М.: Мир, 2000. 592 с.

10. *Селье Г.* Очерки об адаптационном синдроме. М.: Медгиз. 1960. 254 с.
11. *Утешев Б.С., Бабичев В.А.* Ингибиторы биосинтеза антител. М.: Медицина. 1974. 320 с.
12. *Фонталин Л.Н.* Молекулярно-клеточные механизмы иммуно-логической толерантности. М.: Наука. 1994. 104 с.
13. *Хаитов Р.М., Лесков В.П.* Иммунитет и стресс // Рос. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2001. Т. 87. № 8. С. 1060-1072.
14. *Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И.* Экологическая иммунология. М.: Издательство ВНИРО, 1995. 219 с.
15. *Шрейбер В.* Патофизиология желез внутренней секреции. Прага: Авиценум. 1987. 493 с.
16. *Junko Kurogi, Takaji Iida.* Cortisol directly inhibits neutrophil defense activities in tilapia; Book Abstr. 9th Int. Conf. "Diseases Fish and Shellfish", Rhodes, 19-24 Sept., 1999. P. P293.
17. *Mariola F.* Impact of transportation and environmental change on the levels ACTH and cortisol in blood of carp (*Cyprinus carpio* L.) // Acta. Ichthyol. et pisc. 1996. № 1. P. 49-53.
18. *Mikryakov V. R., Mikryakov D.V., Popov A.V.* The effect of dexamethason on crucian carp (*Carassius carassius*, L) leukocytes: Abstr. Fourth International Symposium on Aquatic Animal Health, New Orleans, Louisiana USA September 2-6, 2002. P. 227.
19. *Morgan John D., Balfry Shannon K., Vijayan Matt M.* Physiological responses to hyposaline exposure and handling and confinement stress in juvenile dolphin (mahimahi: *Coryphaena hippurus*) // Can. J. Fish. and Aquat. Sci. 1996. № 8. С. 1736-1740.
20. *Pickering A.D., Pottinger G.J.* Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta* L., to disease without reducing the white blood cell count. // J. Fish Biol., 1985. V. 27. № 5. P. 611-619.
21. *Scapigliati G., Romano N., Scalia D.* Markers for T and B lymphocytes in the seabass *Dicentrarchus labrax* (L.): Abstr. Free Commun. Present. 2 Meet. Ital. Assoc. Dev. and Comp. Immunol. (IADCI), Palermo, Juli 9-10, 1998 / Anim. Biol. 1998. № 3. P. 153.
22. *Schreck Carl B.* Immunomodulation: Endogenous Factors // The fish immune system. Academic Press. London. 1996. P. 311-327.
23. *Stave J.W., Roberson B.S.* Hydrocortisone suppresses

the chemiluminescent response of striped bass phagocytes. // Dev. and Comp. Immunol. 1985. № 1. P. 77-84.

24. Stosik M., Deptula W., Travnicek M., Baldy-Chudzik K. Phagocytic and bactericidal activity of blood thrombocytes in carps (*Cyprinus carpio*) // Vet. med. 2002. 47. № 1. C. 21-25.

REACTION OF LEUKOCYTES OF CRUCIAN CARASSIUS CARASSIUS. L. ON INFLUENCE OF DEXAMETASON-PHOSPHATE

Mikrjakov D.V., Mikrjakov V.R., Popov A.V.

*Papanin's Institute for biology of inland waters of the Russian Academy of Science, Borok, the Yaroslavl region,
E-mail: mvr@ibiw.yaroslavl.ru*

Influence of dexametason-phosphate (analogue of cortisol) on a functional condition and structure of leukocytes of a crucian (*Carassius carassius*, L) is investigated. Fishes reacted to introduction of a hormone de-and restabilization of structure of white blood cells and change of their functional condition. At the fishes who have received an injection of dexametason-phosphate, reduction of quantity of lymphocytes on 25-60 % and increase of granulocytes on 30-50 % is marked in comparison with control. At skilled fishes decrease of spontaneous and stimulated chemiluminescence also was observed. The destabilizative effect of a hormone on leukocytes of fishes is revealed during first 7 days Established under influence of a hormone of change in structure of leukocytes are similar to what are observed at influence on fishes stress of factors.

УДК 612.017:574.525

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ИММУННОЙ СИСТЕМЕ РЫБ ОЗЕРА НЕРО В СВЯЗИ С ЗАГРЯЗНЕНИЕМ ВОДЫ ПЕСТИЦИДАМИ

Микряков В.Р., Попов А.В., Половкова С.Н

*Институт биологии внутренних вод им.И.Д.Паванова РАН
E-mail: mvr@ibiw.yaroslavl.ru*

Исследовали структурно-функциональные показатели иммунной системы рыб оз. Неро в период интенсивного загрязнения различными веществами антропогенной природы, включая пестициды. Показана связь про-

исходящих изменений и исходного состояния организма рыб. Выявлено иммунотоксическое действие воды оз. Неро и входящих в нее компонентов.

ВВЕДЕНИЕ

Озеро Неро – мелководный и слабопроточный водоем - интенсивно загрязняется отходами промышленных и коммунальных предприятий г.Ростова Великого и стоками с сельскохозяйственных угодий [21], различающимися по содержанию биогенных элементов и величине первичной продукции, состоянию фитопланктона, и относится к высокоэвтрофным водоемам [2, 7, 26]. В озере Неро обитает 12 различных по экологии и промысловому значению видов рыб [5, 6, 22, 23, 28]. Состояние ихтиофауны за последние 70 лет претерпело существенные изменения. Они связаны с дестабилизацией структуры рыбного населения, снижением численности, темпов роста и биологической продуктивности [23].

Происходящие в состоянии ихтиоценоза дестабилизационные процессы свидетельствуют о сужении значений оптимальных границ экологических условий, необходимых для реализации биологических и адаптивных функций рыбного населения, в т.ч. и иммунологических, выполняющих важную роль в обеспечении индивидуальной целостности, оптимального роста и развития организма в онтогенезе при колеблющихся условиях среды обитания. Одним из важных факторов, повлекших ухудшение условий среды обитания, следует считать загрязнение оз. Неро пестицидами, биогенными элементами, поступающими в водоем с полей совхозов и колхозов, и сточными водами г. Ростова [23]. Так, по данным проверки Института Росгидрорыбпроект в озеро Неро ежегодно поступает 150,6 тыс. куб. м неочищенных коммунальных стоков из г.Ростова и пос. Львы, а также от сельхозпроизводителей, расположенных на акватории оз. Неро.[4]. Основным источником поступления пестицидов в озеро является смыв с полей колхозов и совхозов [25]. По данным Ростовского агропромкомбината за период 1986 и 1990 гг на поля сельскохозяйственных предприятий «Россия», «Киргизстан», «Овощевод» и «Вперед», которые расположены на берегах озера Неро, было внесено 20997 кг пестицидов, в том числе: прометрина – 4551 кг, рамрода – 10353 кг, семерона – 380 кг, тетрана – 3080 кг, тиурам-Д (ТМТД) – 305 кг и феназана – 2328 кг. Помимо

всего, озеро загрязняется органическими и минеральными веществами, вносимыми на поля в качестве удобрений.

Иными словами, озеро Неро подвергалось интенсивному загрязнению различными веществами антропогенного происхождения, в том числе и пестицидами, последние оказывают существенное негативное влияние на состояние лимитирующих факторов экосистемы и жизнедеятельность рыб.

Общезвестно, что рыбы на антропогенное загрязнение воды реагируют нарушением гомеостатических функций, в т.ч. и иммунологических, обеспечивающих выживаемость, оптимальный рост и развитие организма [23, 24, 29].

В целях понимания характера реагирования иммунной системы рыб на пестицидное загрязнение нами проведен анализ материала, собранного в период интенсивной обработки полей овощеводческих совхозов и колхозов Ростовского района хлорорганическими препаратами, для изучения реакции иммунной системы рыб.

Оценку состояния иммунной системы осуществляли по данным анализа киллерной функции сыворотки крови, содержания неспецифических иммунных комплексов, С-реактивного белка (СРБ), токсикантреагирующих антител (ТРА), индексов иммунокомпетентных органов (селезенки, почек и печени). В качестве основных объектов исследований использовали лещей (*Abgapis bgrapa L.*). Выбор леща обусловлен тем, что данный вид, за период с 1930 г. и по настоящее время, претерпел существенные изменения по темпу роста, жизнеспособности и выживаемости и является наиболее массовым видом, обитающим в данном водоеме. Сбор материала осуществляли летом (июль) и осенью (сентябрь).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Материалом для исследования послужили сыворотка крови, индексы иммунокомпетентных органов и данные биологического анализа. Исследованию подвергнуто 75 экз. рыб, массовыми из которых были лещ (62 экз.), в т.ч. 23 самца и 33 самки, 6 неполовозрелых особей, и единичные экземпляры густеры, синца, язя, карася, судака, окуня и щуки. Материал собирался весной, летом и осенью. Рыбы для исследования отбирались из траловых и сетных уловов. Отлов рыб осуществлялся из различных участков акватории оз. Неро.

Сбор крови осуществляли из хвостовой артерии после каудозектомии общепринятым способом [14].

Определение индексов иммунокомпетентных органов печени, селезенки и почек проводили путем взвешивания. Индексы органов вычисляли после биологического анализа рыб, полученные данные выражали в промиллях [24].

Для определения С-реактивного белка использовали специфическую преципитирующую сыворотку, получаемую от животных после их гипериммунизации С-реактивным белком. Постановку реакции преципитации осуществляли в микрокапиллярах [18].

Неспецифические иммунные комплексы (НИК) изучали в сыворотке крови по Ю. А. Гриневиц, А. Н. Алферову [3].

БАСК определяли с помощью фотонейфелометрического метода по схеме, предложенной О. В. Смирновой и Т. Ф. Кузьминой [27] для исследования защитных функций гуморального звена иммунной системы теплокровных животных и адаптированной нами для рыб [18].

Определение антипестицидных антител (АПА) исследовали в реакции пассивной гемагглютинации, где в качестве антигена использовали эритроциты барана, нагруженные соответствующими пестицидами. Конъюгацию эритроцитарного антигена с пестицидами проводили по С. Г. Барлоговой и Е. В. Васильевой [1]. В качестве антигенов нами были использованы 7 веществ (прометрин, семерон, тетрап, фундазол, феназон, рамрод, ТМТД), относящихся к группе пестицидов, преимущественно используемых в Ростовском районе, большинство из которых избирательно поражают вредителей агрокультур - лука, капусты, моркови.

Исходное состояние рыб оценивали по размеру, весу, коэффициенту упитанности, жирности, степени созревания половых продуктов, содержанию общего сывороточного белка и β -глобулинов [19, 24].

Результаты иммунологического анализа подвергали статистической обработке и методу парных корреляций, достоверность выявленных различий оценивали по критерию Стьюдента [20] с использованием прикладных программ на ПЭВМ типа IBM.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Проведенные исследования впервые позволили получить данные о характере и направлении структурно-функциональных изменений в иммунной системе рыб и установить пределы колебаний, характер сезонной изменчивости исследуемых показателей и их связь с исходным состоянием

организма рыб. Из материалов исследований следует, что исследуемые рыбы отличались величинами индексов иммунокомпетентных органов, содержанием неспецифических циркулирующих иммунных комплексов, С-реактивного белка, БАСК, токсикантреагирующих антител, размахом их изменчивости (Табл. 1, 2, Рис.).

Анализ БАСК леща показал, что этот признак, отражающий реакцию рыб на меняющиеся условия среды, зараженность их паразитами, жизнестойкость рыб, во время зимовки, как и степень устойчивости их к инфекционным болезням [9-12], сильно колеблется.

Максимальный размах изменчивости БАСК при средней значимости 242 ед. по степени нарастания тест-микробов (*Aeromonas punctata*, штамм 71) был выявлен среди лещей, выловленных в летний период (Табл.1).

Показатели индивидуальной разнокачественности среди рыб летних уловов колебались в пределах 201 - 715 ед.; тогда как осенью - 60 - 162 ед., при коэффициентах вариации соответственно 120. БАСК по степени подавления тест-микробов показало, что все 100% особей из летних уловов относились к разряду иммунодефицитных (ИМД), а из осенних - 76,7%. Только у 23,3% исследуемых рыб сыворотка крови подавляла развитие тест бактерий, тогда как биологические показатели леща Рыбинского водохранилища существенно отличались от таковых оз. Неро [16] как размахом изменчивости, так и средними значениями БАСК. Доля ИМД особей среди лещей летних уловов в зависимости от места вылова рыб колебалась в пределах 10-70%, тогда как осенью (в сентябре) - 20-40%. Максимальное число ИМД рыб в Рыбинском водохранилище как летом, так и осенью установлено среди рыб Шекснинского плеса в районе поступления сточных вод промышленных предприятий г. Череповца [13], а иммунореактивных - Волжского и Моложского плесов.

С-реактивный белок (СРБ) у млекопитающих в основном появляется во время острой фазы инфекционных болезней, вызываемых микроорганизмами [30]. СРБ вызывает агглютинацию бактерий, грибов и простейших паразитических организмов, преципитацию продуктов распада и водные экстракты паразитических организмов. Этот белок выявлен у камбалы, трески и акулы [30]. Однако, как указывает автор, этот белок у камбалы не связан с патологией. Он встречается у нормальных особей. На лещах подобные работы отсутствуют. Данные наших наблюдений свидетельствуют,

что СРБ у леща встречается. Но какова его роль из материалов этих исследований ответить не возможно. Вполне вероятно, что данный белок у леща в основном выявляется во время бактериальной или сильной степени обсемененности микрофлорой организма рыб, кроме того, возможны последствия токсикоза. Этот белок, как следует из таблицы 2, отрицательно коррелировал почти со всеми признаками исходного состояния организма рыб и положительно - с уровнем содержания общего сывороточного белка. СРБ в основном выявлен среди рыб, имеющих низкие показатели длины, веса, упитанности, и у особей со стадией созревания половых продуктов I и II и в июне месяце. Все это позволяет думать, что СРБ у леща появляется как результат ослабления организма, вызванного нерестом и обсемененностью микроорганизмами. Не исключено, что СРБ в основном встречается у рыб, пораженных токсикантами, индуцирующими воспалительные процессы в тканях рыб.

Таблица 1

Сезонные изменения иммунологических показателей рыб
о.Неро

Показатели		Лето	Осень
Печень	N	28	33
	$\bar{X} \pm m$	1.19±0.04	1.36±0.06
	V	17.6	26.9
Селезенка	N	28	33
	$\bar{X} \pm m$	0,31±0,01	0,33±0,01
	V	26,7	31,1
Почки	N	28	33
	$\bar{X} \pm m$	0,58±0,02	0,60±0,02
	V	23,6	24,7
НИК	N	16	25
	$\bar{X} \pm m$	51.6±5,8	26,2±2,4
	V	44,8	45,1
БАСК	N	16	27
	$\bar{X} \pm m$	460.8±36,8	119,6±5,7
	V	31,1	24,8

Нам представлялось интересным изучить содержание неспецифических иммунных комплексов в сыворотке крови рыб оз. Неро, этот неспецифический фактор иммунного ответа у леща как в плане понимания патологии иммунной системы и состояния здоровья рыб, так и оценки качества вод. Для леща о. Неро этот показатель за весь период наблюдения колебался в пределах 36 ед. при размахе максимальных и минимальных значений 9 - 85 ед. и коэффициенте вариации 58%. НИК, подобно БАСК рыб, подвержен сезонной изменчивости (Табл.1). Уровень содержания НИК, также как и интенсивность развития микробов в присутствии сыворотки крови рыб, к осени снижается. Сравнительный анализ содержания НИК в зависимости от пола не позволил выявить различий у рыб оз. Неро. Положительная корреляция между НИК и исходным состоянием организма нами установлена только с массой рыб (Табл.2), а также между БАСК (+0,127). Данные корреляционные связи свидетельствуют, что защитное свойство сыворотки крови у леща оз. Неро определяется содержанием иммунных комплексов. Иммунные комплексы, видимо, оказывают стимулирующее действие на развитие микроорганизмов, а супрессивное - на функциональную активность клеточных и гуморальных факторов иммунитета.

Таблица 2

Коэффициенты корреляции между иммунологическими показателями и исходным состоянием организма рыб оз. Неро.

Показатели	Длина	Вес	Стадия зрелости	Упитанность	Жирность	Общий белок
Индексы: печени	-		-	+0,277	-	-
селезенки	-		-	+0,317	-	-
почки	+0,1		-	+0,266	+0,128	-
СРБ	-0,324	-0,302	-0,25	-0,1	-	+0,345
НИК	-	+0,11	-	-	-	-
БАСК	-	-	+0,15	-	-	-0,25
Пестициды: семерон	-	-	-	-	-0,139	-
тетран	-	-	-	-	-	-
фундазол	-	-	-	-0,11	-0,1	-
рамрод	-	-	-	-	-	-
феназол	-	-	-	-	-	-0,143
прометрин	+0,142	+0,339	-	+0,142	+0,45	+0,247
ТМГД	-	-	-	-	-	-0,17

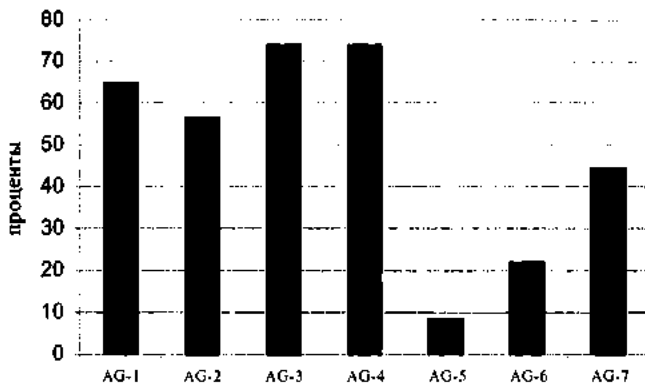


Рисунок. Количество положительно реагирующих рыб популяции оз. Неро к пестицидам. AG-1 – уровень антител к семерону; AG-2 – к тетрану; AG-3- к фундазолу; AG-4 – к рамроду; AG-5 – к феназону; AG-6 – к прометрину; AG-7

Сопоставление результатов анализа НИК, полученных летом у леща оз. Неро и Рыбинского водохранилища, существенных различий не выявило. Средние значения этих показателей равнялись 53 и 47 ед. соответственно.

Материалы исследований НИК так же, как и БАСК свидетельствуют, что рыбы о. Неро находятся под сильным антропогенным воздействием и отличаются от таковых Рыбинского водохранилища более слабым здоровьем, что вероятно обусловлено хронической интоксикацией организма рыб пестицидами и отходами промышленных и коммунальных предприятий г. Ростов и прилегающих районов. Последнее положение подтверждается данными исследований индексов иммунокомпетентных органов и характера сенсибилизации рыб к прометрину, семерону, тетрану, фундазолу, рамроду и ТМТД - т.е. хлорорганическим пестицидам, широко применяемым при обработке овощных культур в колхозах и совхозах, расположенных вокруг о. Неро. Индексы иммунокомпетентных органов, отражающие относительную емкость иммунной системы у леща о. Неро отличались более низкими значениями индекса печени и селезенки и сравнительно высокими - почек, по сравнению с таковыми у рыб Рыбинского водохранилища [13]. Индексы всех трех органов положительно коррелировали с коэффициентом упитанности (Табл.2). Кроме того, такая корреляция установлена для почек с длиной тела и жирностью рыб.

Из 7 пестицидов, тестируемых на содержание их в тка-

нях рыб, максимальное число положительно реагирующих особей установлено к фундазолу и рамроду, затем - семерону, тетрану, ТМТД, прометрину и феназону (Рис.). Фундазол- и прометринреагирующих из общего числа исследуемых рыб выявлено в 74%, семеронреагирующих - 65%, тетранреагирующих - 56%, ТМТД-реагирующих - 44,5%, прометринреагирующих - 21,7% и феназонреагирующих - 8,7%. Из 7 пестицидов коррелятивные связи выявлены с фундазолом и прометрином (Табл.2). Максимальное число связей с исходным состоянием организма установлено с прометрином (5 из 6 признаков), затем с фундазолом (2 из 6). Отрицательная связь степени сенсibilизации рыб к фундазолу установлена с содержанием общего сывороточного белка (Табл 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено количественное исследование особенностей структурно-функционального состояния иммунной системы рыб озера Неро в период интенсивной обработки полей сельскохозяйственных предприятий хлороорганическими пестицидами. Показана связь происходящих изменений с сезоном года, полом и исходным состоянием организма рыб. Большое число иммунодефицитных особей по БАСК и высокий уровень НИК и СРВ, по сравнению с таковыми рыб из Рыбинского водохранилища, свидетельствуют, что рыбы оз. Неро находились в состоянии глубокого токсического иммунодефицита и относились к категории высокочувствительных к инфекционным и инвазионным болезням и со слабой степенью жизнестойкости и сопротивляемости их к меняющимся условиям среды обитания. Если исходить из общего положения, что функциональное состояние систем жизнеобеспечения особи и популяции во многом определяется условиями среды обитания, то качество воды и входящие в нее компоненты оказывали сильное угнетающее или токсическое воздействие на рыб. Высокий уровень положительно реагирующих с хлороорганическими пестицидами особей, выявленный нами у леща оз. Неро, указывает на то, что имело место поступление данных веществ в водоем с окружающих оз. Неро сельскохозяйственных угодий. Иммунотоксическое действие условий среды на рыб, видимо, обусловлено не только пестицидами, но и возрастающим поступлением неочищенных (или слабо очищенных) сточных вод коммунально-бытовых и промышленных предприятий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Алексеева О.Г.* Аллергия к промышленным химическим соединениям. М.: Медицина, 1978. 271 с.
2. *Бабаназарова О.В., Зубишина А.А.* Современное состояние фитопланктона и микроальгобентоса открытой части озера Неро // Экологические проблемы озера Неро и городских водных объектов. Сб. трудов. Ростов Великий, 2002. С. 64 - 77.
3. *Гриневич Ю.А., Алферов А.Н.* Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лабор. Дело. 1981. N 8. С. 493 - 496.
4. *Житенева Т. С., Буторин Н.В.* Охрана водных ресурсов и природы оз. Неро // ТЭО строительства водохранилища в природной котловине оз. Неро для водоснабжения лукосящих хозяйств Ростовского района Ярославской области. Борок, 1977. 46 с.
5. *Кулемин А.А.* Исследование озера Неро в гидробиологическом и рыбохозяйственном отношении. Ч 3. Питание и рост леща. // Сб. трудов Ростов. науч. общества по изучению местного края. Ростов-Ярославский. Вып. 2. 1930.
6. *Кулемин А.А.* Исследование Ростовского озера в гидробиологическом и рыбохозяйственном отношении. Рыбное хозяйство Ивановской промышленной области и его перспективы. Вып. 2. 1934.
7. *Ляшенко О.Ф.* Фитопланктон озера Неро // Сб.тр. Современное состояние экосистемы оз. Неро. Рыбинск, 1991. С. 10-31.
8. *Микряков В. Р.* Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск, 1991. 153 с.
9. *Микряков В. Р., Баканов А.И.* О связи антимикробных свойств сыворотки крови леща с некоторыми условиями нагула // Информ. бюл. Биол. внутр. вод. 1982. N 56. С. 43-46.
10. *Микряков В. Р., Силкин Н. Ф.* О функционировании иммунологической системы рыб в различные периоды годового цикла // Экологическая физиология рыб. Киев: Наукова думка, 1976. С. 18-19.
11. *Микряков В.Р., Степанова В.М.* Зараженность синца (*Abramis ballerus L.*) дактилогиредами *Dactylogyrus chronilowi* в зависимости от антимикробных свойств сыворотки крови хозяина // Информ. бюл. Биол.внутр.вод. 1983. N 57. С. 34-36.
12. *Микряков В.Р., Зубкова Л.А., Степанова Г.А.* О неко-

торых особенностях заражения леща паразитами в период нереста // Бюл. Всес. ин-та эксп. Ветеринарии. 1975. вып.20. С. 40-45.

13. Микряков В. Р., Андреева А. М., Лапирова Т. Б., Силкина Н. И. Реакция иммунной системы рыб Шекснинского плеса после аварии на промышленных предприятиях г. Череповца // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск: Наука, 1990. С. 144-155.

14. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб на воздействие некоторых абиотических факторов среды. Рук. деп. в ВИНТИ, N 388-В00. 2000. 121 с.

15. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука, 2001. 126 с.

16. Микряков В. Р., Балабанова Л. В., Силкина Н. И., Лапирова Т. Б., Попов А. В., Андреева А. М., Гречанов И. Г., Лобунцов К. А. Функционирование иммунной системы рыб под воздействием биотических и абиотических факторов. Рук. деп. в ВИНТИ, N 809-В 91. 1991. 94 с.

17. Насонов Е. Л. Иммунные комплексы при ревматических заболеваниях // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Иммунология. 1984. Т. 12. С. 104-158.

18. Неменова Ю. М. Методы лабораторных клинических исследований. М.: Медицина, 1972. 424 с.

19. Никольский Г. В. Экология рыб. - М.: Высшая школа, 1974. 367с.

20. Плохинский Н. А. Биометрия. - М.: Изд-во МГУ, 1970. 368 с.

21. Половкова С.Н. Проблемы озера Неро //Сб. тр. сем. Экологические проблемы озера Неро и городских водных объектов. Ростов Великий, 2002. С.30-40.

22. Половкова С. Н., Краснопер Е. В., Маурин А. С. Современное состояние ихтиофауны озера Неро. Рыбинск, 1991.

23. Половкова С. Н., Терещенко В. Г., Терещенко Л. И. Многолетние изменения структуры рыбного населения озера Неро. //Биологические ресурсы, их состояние и использование в бассейне Верхней Волги. Ярославль, 1999. С. 168-176.

24. Правдин И. Ф. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных). - М.: Пищевая пром-сть, 1966. 376 с.

25. Сводный отчет по результатам обследования водосбо-

ров и контроля за охраной природных вод от истощения и загрязнения на объектах мелиорации Ярославской области и водоохранных зонах малых рек за 1988 год. Ярославль, 1989. 45 с.

26. Сигарева Л.Е., Ляшенко О.А. Пигментные характеристики фитопланктона оз. Неро. // Сб.тр. Современное состояние экосистемы оз. Неро. Рыбинск, 1991. С. 32-61.

27. Смирнова О. В., Кузьмина Т. Д. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом фотонейлометрии // Журн.микробиол., эпидемиол. и иммунолог. 1966. N 4. С. 8-11.

28. Fortunatov M.A., Moskovskiy B.D. Озера Ярославской области // Сб. Озера Ярославской обл. и перспективы их рыбохозяйственного использования. Ярославль, 1970.

29. Anderson D. P. Immunological indicators: Effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks // Amer. Fish. Soc. Symp. 1990. Vol. 8.

30. Rijkers G. T. Non-lymphoid defense mechanisms in fish // J. Develop. and Immunol. 1982. V. 6. № 1. P. 1-13.

STRUCTURALLY FUNCTIONAL CHANGES IN IMMUNE SYSTEM OF FISHES LAKE NERO IN CONNECTION WITH POLLUTION OF WATER BY PESTICIDES

Mikrjakov V.R., Popov A. V., Polovkova S.N.

Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok, Russia

E-mail: myr@ibiw.yaroslavl.ru

Investigated structurally functional parameters of immune system of fishes lake Nero during intensive pollution by various substances of an anthropogenous nature, including pesticides. Communication of occurring changes and an initial status of an organism of fishes is shown. It is revealed immunotokoxic action of water lake Nero and components included in it.

**БИОХИМИЧЕСКАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ**

**Л.П. Смирнов *, В.В. Богдан *, Н.Н. Немова *, Л.Н.
Юхименко ****

**Институт биологии Карельского научного центра
РАН, г. Петрозаводск, 185610*

***Всероссийский научно-исследовательский институт
прудового рыбного хозяйства,
п. Рыбное, Дмитровский р-н, Московская обл. 141821.
lsmirnov@krc.karelia.ru; leo46@onego.ru*

Методом гель-хроматографии на Сефадексе G-100 комплекс водо-растворимых белков микроорганизма *Aeromonas sobria*, возбудителя бактериальной геморрагической септицемии рыб, был разделен на 6 фракций. Обнаружено, что фракция II (56 кДа) при инъекции карпам вызывала аналогичные, но количественно более выраженные изменения некоторых биохимических показателей, чем при заражении живой культурой. В ходе экспериментальной проверки полученный препарат обеспечивал высокий уровень защиты от заболевания и был запатентован как вакцина.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из распространенных заболеваний карповых рыб является геморрагическая септицемия, возбудителем которой являются условно-патогенные бактерии рода *Aeromonas*. Аэромонады могут играть роль не только в качестве секундарной инфекции, но и как самостоятельный этиологический агент. Такие штаммы обладают высокой вирулентностью для рыбы, сохраняя ее в течение длительного времени. В рыбоводных хозяйствах острая форма аэромоноза вызывает эпизоотии и массовую гибель рыб.

Вакцинация является эффективным способом профилактики бактериальных заболеваний. Для получения большинства известных вакцин используются ослабленные или убитые бактерии и вирусы. В настоящее время такие вакцины - бактерины против ряда серьезных заболеваний рыб (стрептококкоза, вибриоза, фурункулеза, йерсиниоза) разрабатываются как у нас в стране, так и за рубежом (США, Канада, Скандинавские страны, Германия) [12, 21, 22]. В то же время все попытки получения бактеринов против подвиж-

ных аэромонад не увенчались успехом. Это связано с большим разнообразием биохимического состава наружной мембраны бактерий, что препятствует созданию защиты у рыб против гетерологичных штаммов аэромонад. Наиболее перспективными на сегодняшний день являются бесклеточные вакцины с химически определенным составом и регулируемой иммуногенностью.

Цель работы - изучение фракционного состава цитоплазматических белков у патогенного штамма аэромонад; исследование влияния целого микроорганизма и белковой фракции на липидный состав и активность некоторых протеолитических ферментов печени карпа с целью создания биохимической вакцины против бактериальной геморрагической септицемии карповых рыб.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использовали высоковирулентный штамм 77-18 вида *Aeromonas sobria* из коллекции лаборатории ихтиопатологии ВНИИПРХа [16]. Бактерии выращивали до стационарной фазы роста в изотермическом режиме при 25°C на эритритагаре («Difco», США). Клетки смывали с поверхности агара раствором 0,15 M NaCl и центрифугировали при 6000 g в течение 15 мин. Очистку взвеси микроорганизмов от примесей проводили трехкратной промывкой раствором 0,15 M NaCl с последующим центрифугированием. Бактериальный осадок подвергали 10-кратному замораживанию-оттаиванию для разрушения бактериальных стенок, затем центрифугировали 30 мин при 20000 g. Надосадочную жидкость использовали для изучения белкового состава.

Разделение бактериальных белков на фракции с помощью сефадекса G-100 [11] проводили на хроматографическом оборудовании шведской фирмы «Farmacia-LKB».

Для заражения карпам вводили внутримышечно культуру *A. sobria* в мясопептонном бульоне (МПБ) в дозе 1,44 млн/мл. Ткани на липидный анализ брали через 24 ч, активность ферментов определяли через 24, 72 и 120 ч после укола. Контролем служили особи, инъецированные МПБ.

Сборные пробы печени 10 рыб фиксировали смесью хлороформа с метанолом (2 : 1). Липиды экстрагировали по методу Фолча и фракционировали с помощью тонкослойной хроматографии в системе растворителей: петролейный эфир - серный эфир - уксусная кислота (90:10:1) [8]. Мети-

ловые эфиры жирных кислот фосфолипидов получали прямым метилированием в абсолютном метаноле, содержащем 8% хлористого ацетила [15], и анализировали на газофазном хроматографе «Хром-41» на полярной фазе -15% Reoplex-400 на Хроматоне N-AW-DMCS («Chemapol», Чехия). Идентификацию жирных кислот проводили сравнением со временами удерживания метчиков, а также по совпадению вычисленных эквивалентных длин цепей молекул с табличными данными [20]. Относительное содержание отдельных кислот рассчитывали по Бартлету и Айверсону [18].

Активность кислой карбоксилпротеиназы (катепсина D) определяли модифицированным методом Ансона, используя в качестве субстрата 1%-ный раствор гемоглобина в 0,1M ацетатном буфере, pH 3,6 [1]. Активность щелочной протеиназы (катепсин B) определяли по расщеплению 0,065 M раствора этилового эфира бензоиларгинина (БАЭЭ) при pH 5.0 [2]. Активность ферментов выражали в условных единицах изменения оптической плотности (E_{230} / г ткани/60 мин.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Работа по созданию вакцины состояла из последовательного ряда этапов.

1. Сравнительное биохимическое изучение разных по патогенности штаммов аэромонад. Проведение в отобранных штаммах аэромонад скрининга соединений, выступающих в качестве факторов патогенности.

2. Выделение из микроорганизмов факторов патогенности, обладающих высокими иммуногенными свойствами, обеспечивающими приобретение рыбами эффективного иммунитета.

3. Разработка серии биохимических методов для выделения отобранного фактора в препаративных масштабах.

4. Производственная апробация вакцинного препарата.

При сравнении различных по патогенности штаммов аэромонад в электрофоретических белковых спектрах аэромонад нами обнаружено до 40 индивидуальных полос [13]. Молекулярные массы (Мм) фракций находились в диапазоне 12-136 кДа. Количество белков с Мм ниже 40 и выше 60 кДа практически одинаково у исследованных штаммов. Специфические отличия у разных по вирулентности штаммов выражались в различной интенсивности окраски белковых зон в диапазоне Мм 47-55,6 кДа. У патогенного штамма концентрация этих белков была значительно выше, чем у

непатогенного. Сравнительный анализ цитоплазматической и мембранной фракций показал, что эти белки сосредоточены в цитоплазме. Следует отметить, что у атипичных штаммов неподвижных азромонад *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, вызывающих эритродерматит у карповых рыб и выделенных из золотой рыбки (*Carassius auratus*), обнаружен самый высокий по сравнению с другими штаммами этого вида уровень белков с Мм 54 кДа [19], причем доля этих белков снижалась при пассировании микроорганизмов только через те среды, в составе которых отсутствовали продукты животного происхождения, что косвенно указывает на их участие в патогенезе заболевания.

У патогенного штамма самая высокая концентрация белка отмечена во фракции 55,6 кДа. Эта фракция была выделена препаративно. При инъектировании белков этой фракции карпам наблюдали появление клинических симптомов, характерных для геморрагической септицемии. Это дало основание говорить об участии этих соединений в патогенезе заболевания.

Известно, что патогенные бактерии попадают в клетку путем интернализации или в результате процесса, напоминающего макропиноцитоз. Оба процесса, связанные с реорганизацией цитоскелета и полимеризацией актина, инициируются белками или белковыми комплексами бактерий [14]. Возможно, что обнаруженные у высокопатогенного штамма в большой концентрации белки с Мм 47-56 кДа могут приводить к необходимым конформационным и структурным перестройкам актиновых структур, обеспечивая быстрое проникновение патогенных бактерий в эукариотические клетки. Также весьма вероятно, что в наборе белков этой фракции присутствуют ферменты, используемые микроорганизмами в качестве инструментов пенетрации: различного типа протеиназы, фосфолипазы, гиалуронидаза, нейраминидаза. В частности, у высокопатогенного штамма уровень активности нейтральных протеиназ был в 3,5 раза выше, чем у непатогенного штамма [4]. Следовательно, белки с Мм 47-56 кДа, преобладающие у высоковирулентного штамма, могут быть факторами патогенности как при инцидации, так и при дальнейшем развитии инфекционного процесса.

Анализ белков высоковирулентного штамма *A. sobria* 77-18 методом гель-хроматографии на Сефадексе G-100 показал, что цитоплазматический экстракт разделялся на пять высокомолекулярных фракций (100 и выше, 67, 51, 32 и

18 + 5 кДа) и низкомолекулярную (10 кДа и ниже). Каждая из высокомолекулярных фракций была количественно собрана, сконцентрирована и инъецирована карпам как внутримышечно, так и внутривентриально в количестве 100 мкг белка на рыбу. Появление клинических симптомов в месте инъекции, характерных для данной инфекции (припухлость и гиперемия) наблюдали только после введения белков фракции II, что и послужило основанием для использования этой фракции в работе над препаратом вакцины.

Известно, что патогенность является основным свойством микроорганизма, определяющим биохимические изменения в тканях хозяина при их взаимодействии, которые при аэромоназе затрагивают липидный, белковый и ферментный статус [3]. Был проведен сравнительный анализ липидного и жирнокислотного состава, активности протеолитических ферментов (катепсин В и D) гепато-панкреаса карпов, инъецированных внутримышечно живой культурой и фракцией II, на стадии появления клинических признаков заболевания (рис. 1). В гепатопанкреасе экспериментальных карпов через 24 ч после заражения отмечалось снижение содержания запасных липидов - триацилглицеринов, наиболее существенное при инъекции фракции II, что является характерной неспецифической реакцией организма на стрессовое воздействие. При изучении состава мембранных липидов в обоих вариантах опыта наблюдали увеличение их содержания, сопровождавшееся значительным повышением в них доли полиненасыщенных жирных кислот по сравнению с контролем. Наибольшее увеличение содержания полиеновых кислот, в особенности докозагексаеновой, зарегистрировано при инъекции фракции II. Повышение степени ненасыщенности мембранных липидов печени на этой стадии инфекционного процесса можно рассматривать как мобилизацию защитных сил организма в ответ на токсическое воздействие. Ранее нами было выявлено, что повышение уровня полиненасыщенных жирных кислот, особенно докозагексаеновой, в фосфолипидах печени после заражения аэромонадами сопровождалось возрастанием их концентрации в цельной крови и, в частности, в мембранах лимфоцитов [5]. У теплокровных животных включение длинноцепочечных жирных кислот, главным образом арахидоновой, в фосфолипиды лимфоцитов приводило к их стимуляции [6]. Полиеновые жирные кислоты способствуют сдвигу физико-химического состояния мембран и, изменяя их микровязкость, модулируют активность многих мембраносвязанных ферментов [9] и тем самым усиливают иммунные свойства клеток крови.

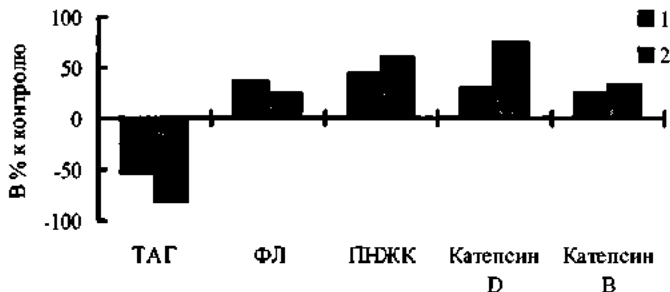


Рис. 1. Изменение некоторых биохимических показателей в гепатопанкреасе карпа при внутримышечной инъекции живой культуры *A. sobria* и фракции II. 1 – живая культура; 2 – фракция II; ТАГ – триацилглицерины; ФЛ – фосфолипиды; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

Важная роль в адаптивных реакциях у рыб при действии инфекционных агентов принадлежит системе внутриклеточного протеолиза. При сравнительном изучении влияния инъекции живой культурой *A. sobria* и выделенной из него белковой фракции II обнаружены изменения активности лизосомальных протеолитических ферментов в печени карпа (рис.). Направленность в изменении активности катепсинов B и D у опытных рыб относительно контроля оказалась одинаковой в обоих вариантах заражения, но более выражена для фракции II. Активация этих протеиназ при 24-ч экспозиции определяется активным участием лизосом в защите клетки от чужеродных агентов. Предполагается также функциональная связь катепсина D с трансформацией лимфоцитов в макрофаги, что отмечено для млекопитающих [10].

Таким образом, установлено, что ответные метаболические реакции организма на инъекцию белков и культуры аэромонад однотипны, но в первом случае количественно более выражены. Преимуществом применения фракции II может быть то, что при небольшом наборе компонентов достигается высокий уровень защиты организма без перенапряжения иммунной системы, как в случае инъекции цельных бактерий.

Исследование иммуногенных свойств фракции II показало, что она активизирует такие факторы иммунитета у рыб, как антителиобразование, синтез лизоцима, адгезию бактериальных патогенов к эпидермальной слизи, миграцию макрофагов в конечный отдел кишечника, фагоцитоз [7].

Для масштабного получения препарата использовали следующий набор методов: центрифугирование бактериальной массы, получение ацетоновых порошков, гель-хроматография на сефадексе G-100, ультрафильтрация, лиофильная сушка до порошкообразного состояния. Для создания иммунитета полученный препарат в количестве 70—100 мкг вводится рыбе внутримышечно или внутрив брюшинно.

В ходе экспериментальной проверки фракции II как вакцины обнаружено выраженное терапевтическое действие у заболевших рыб (полностью исчезали все язвы, восстанавливался товарный вид рыбы) и выявлена ее поливалентность. Белки этой фракции защищали карпов как от гомологичных, так и гетерологичных штаммов подвижных аэромонад (*A. sobria*, *A. hydrophila*), стимулировали высокий уровень напряженности иммунитета у лососевых рыб к фурункулезу (*A. salmonicida*) и вибриозу (*Vibrio anguillarum*), обеспечивая в последнем случае 70%-ную защиту при экспериментальном заражении. Защитное действие фракции II продемонстрировано также на канальных сомах при энтеросептической инфекции смешанной этиологии, вызванной представителями семейств *Vibrionaceae* и *Enterobacteriaceae*. И, наконец, выявлены ее антидотные свойства при отравлении радужной форели Т-2 микотоксином [7].

Испытание препарата в прудовых и садковых хозяйствах различных регионов России, в Молдове и Украине, показали его высокие протективные качества. Вакцинация карпов разной величины и возраста в 78 - 97% защищала рыбу от бактериальной геморрагической септицемии. Показано, что иммунитет создавался в течение 3 - 4 недель при температуре воды не ниже 15 - 20°C и сохранялся не менее двух лет.

По результатам проведенных исследований был сделан вывод о возможности использования белковой фракции II, содержащей в своем составе белки с молекулярными массами 45 - 65 кДа, в качестве вакцины. После производственной апробации полученный препарат запатентован как вакцина против бактериальной геморрагической септицемии рыб (ВЮС-2)[17].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев Л.П. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1968 а. Т.2. С. 112.
2. Алексеев Л.П. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1968 б. Т.2. С. 130.

3. *Афанасьев В.И.* Аэромоназ рыб и меры борьбы с ним // Автореф. дисс. на соиск. уч. степени докт. вет. наук. М. 1979. 37 с.
4. *Богдан В.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н., Крупнова М.Ю., Юхименко Л.Н.* Сравнительное изучение некоторых биохимических показателей у патогенного и непатогенного штаммов аэромонад // Известия АН. Серия биологическая. 2000. № 5. С. 533-537.
5. *Богдан В.В., Смирнов Л.П., Сидоров В.С.* Липидный состав лимфоцитов крови карпа при бактериальной инфекции // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т.38, №2. 190-193.
6. *Гурин В.Н.* Обмен липидов при гипотермии, гипертермии и лихорадке. Минск. 1986. 190 с.
7. *Гусева Н.В.* Иммуный ответ рыб – объектов аквакультуры на вакцинацию против бактериальных заболеваний // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М. 1998. 25 с.
8. *Кейтс М.* Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 322 с.
9. *Крепс Е.М.* Липиды клеточных мембран. Л.: Наука. 1981. 339 с.
10. *Орехович В.Н., Елисева Ю.Е., Павлихина Л.В., Локшина Л.А.* Роль протеиназ в регуляции физиологических процессов в организме // Тез. докл. IV Всесоюз. симпоз. по мед. энзимологии. Алма-Ата, 1982. С. 3.
11. *Остерман Л.П.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536 с.
12. *Сердюк А.В.* Проблема стрептококкоза лососевых рыб в хозяйствах Европейского Севера России // Заполярная марикультура: Сб. науч. тр. ВНИРО. Мурманск: ПИНРО, 1994. С. 132-140.
13. *Смирнов Л.П., Юхименко Л.Н.* Белковые спектры различных штаммов аэромонад в Биохимия экто- и эндотермных организмов в норме и при патологии. Петрозаводск: Карельский научный центр АН СССР. 1990. С. 111 - 115.
14. *Хайтлина С.Ю.* Ключевая роль цитоскелета при взаимодействии бактерий с эукариотическими клетками // Тез. докл. 111 съезда биох. общ-ва. Санкт-Петербург. 2002. С.122.
15. *Цыганов Э.П.* Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагеля // Лаб. дело. 1971, №8. С.490-493.
16. *Юхименко Л.Н., Смирнов Л.П., Викторова В.Ф., Богдан В.В., Немова Н.Н.* Штамм бактерии *Aeromonas sobria* - продуцент протективного антигена. Патент SU 1839458 A1 5С 12 N1/20, А61К 39/02. 23.01.1995.

17. Юхименко Л.Н., Смирнов Л.П. Вакцина для профилактики бактериально-геморрагической септицемии рыб // Патент RU 2080874 C1 6 A 61K39/02. Бюлл. № 16 от 10.06.97.

18. Bartlett J., Iverson J.L. Estimation of fatty acid composition by gas chromatography using peak heights and retention time // J. Assoc. Offic. Analytical Chem. 1966. V.49. N1. P. 21-27.

19. Evenberg D., van Boxtel, Lugtenberg B. et al. Cell surface of the fish pathogenic bacterium *Aeromonas salmonicida*. I. Relationship between autoagglutination and the presence of a major cell envelope protein // Biochim. Biophys. Acta. 1982. Vol. 684. P. 241-248.

20. Jamieson G.R. GLC-identification techniques for long-chain unsaturated fatty acids // J. Chromatogr. Sci. 1975. V. 13, № 10. 491-497.

21. Katsuhiko K., Takashi A., Tadatoshii K. Immersion vaccination water-borne challenge of ayu (*Plecoglossus altivelis*) against vibriosis // Гёбё кэнькю, Fish pathol. 1983. V. 18, N 3. P. 143-149.

22. Newman S.G. Immunization of salmonids against furunculosis // Гёбё кэнькю, Fish pathol. 1985. V. 20, N 2-3. P. 403-411.

BIOCHEMICAL VACCINE AGAINST BACTERIAL DISEASES OF FISHES

L.P.Smirnov *, V.V.Bogdan *, N.N.Nemova *,
L.N.Juhimenko **

*Institute for Biology of the Karelian centre of science of the Russian Academy of Science, Petrozavodsk, 185610

** The All-Russia scientific research institute of piscinic fish facilities, Rybnoye, Dmitrow, the Moscow region 141821.

lsmirnov@krc.karelia.ru; leo46@onego.ru

Method gel - chromatography on Sefadex G-100 the complex of water-soluble fibers of microorganism *Aeromonas sobria*, the activator of fish bacterial hemorrhagic septicemia, was divided into 6 fractions. It is revealed, that the fraction II (56 kDa) at an injection to carps caused similar, but quantitatively more expressed changes of some biochemical parameters, than at infection with alive culture. During experimental check the received preparation provided a high level of protection against disease and was patented as a vaccine.

ВЛИЯНИЕ ИЗБЫТКА АММОНИЯ И НЕДОСТАТКА КАЛЬЦИЯ НА СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ КАРПА (*Cyprinus carpio* L.)

В.М. Степанова, В.Р. Микряков

ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН, 152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н.

Исследовались субпопуляции лимфоцитов карпа, содержавшегося в воде с добавлением NH_4^+ (1.5 и 2.5 ммоль/л) в течение 46 сут и в бескальциевой среде (30 и 90 сут). Показано, что в обоих случаях при длительном содержании рыб в экспериментальных условиях снижалось относительное число Т-аналогов и D-лимфоцитов. Количество В-аналогов в некоторых случаях возрастало или не отличалось от контроля.

ВВЕДЕНИЕ

Соединения аммония поступают в водоемы с бытовыми, промышленными и сельскохозяйственными стоками и являются источником образования газообразной формы аммиака NH_3 [1, 12]. Установлено, что аммиак и соли аммония обладают нервно-гемолитическим действием [7, 8].

Выдерживание рыб в летальных и сублетальных концентрациях аммиака приводит к физиологическим и гистологическим изменениям в организме рыб [19], возникновению очагов воспаления, некроза жаберного эпителия [22 - 24], снижению устойчивости рыб к заболеваниям [16, 21]. Однако влияние хронического действия аммонийных соединений на иммунную систему рыб почти не исследовано. В литературе имеются лишь единичные работы, касающиеся этого вопроса [2, 17]. Отсутствуют сведения о влиянии соединений аммония на клеточное звено иммунной системы рыб. Между тем известно, что увеличение концентрации ионов NH_4^+ в окружающей среде угнетает поступление Ca^{2+} в организм рыб и приводит к изменению у них кальциевого обмена [4]. Ионы Ca^{2+} , согласно современным представлениям, играют весьма важную роль в реализации процессов распознавания антигена, киллерных функций и пролиферации лимфоцитов.

Установлено, что от присутствия Ca^{2+} зависит проницаемость плазматических мембран лимфоцитов, активность взаимодействия мембранных рецепторов, распознающих и разрушающих антиген [3, 6, 10, 11].

В настоящей работе проведено сравнение влияния хронического действия ионов аммония и декальцинации среды на субпопуляции лимфоцитов почек карпа, осуществляющие функции распознавания "чужого", хелпера, киллера и синтеза антител.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Опыты проводились на двухлетках карпа (67.5 ± 5.4 г). В первой серии экспериментов рыб содержали в течение 45 сут в воде ($t=16-18^\circ\text{C}$; $\text{pH}=7.7$) с добавлением NH_4Cl в концентрации 1.5 и 2.5 ммоль/л по NH_4^+ (соответственно 0.3 и 0.4 ЛК₅₀ за 48 час). Гибели рыб не наблюдалось.

Во второй серии экспериментов карпов помещали в дистиллированную воду ($t=20^\circ\text{C}$; $\text{pH}=6.5$) с добавлением KCl (2 мг/л) и NaCl (20 мг/л). Пробы отбирали через 30 и 90 сут.

Лимфоциты извлекали из ретикуло-лимфоидной ткани карпа по методу Тессенова [14] и выделяли в градиенте плотности фиколл-верографина методом Вейюма [15]. О жизнеспособности клеток судили в тесте с трипановым синим. Более 95% клеток были живыми. Субпопуляции лимфоцитов оценивали по характеру их взаимодействия с антигенами-маркерами Т- и В-клеток млекопитающих: эритроцитами барана и частицами зимозана в реакции розеткообразования, поставленной по методу Мендес [20] в модификации Гришиной и Мюллер [5], которая была адаптирована нами для рыб [13]. Полученные препараты окрашивали раствором азур-эозина 1:10.

Антигенреагирующие клетки (АГРК) идентифицировали в поле зрения светового микроскопа при увеличении $7 \times 1.5 \times 90$. Учитывали число лимфоцитов (розеткообразующих клеток), присоединивших 3 и более эритроцитов барана (Т-аналоги), частиц зимозана (В-аналоги). За смешанные розетки (D-клетки) принимали лимфоциты, присоединившие и эритроциты барана, и зимозан. Кроме того, определяли количество нулевых клеток - не вступающих во взаимодействие с данными антигенами (O-клетки) или имеющих 1-2 рецептора к эритроцитам барана и к комплексу зимозан-комплемент (соответственно Т' и В').

В каждом мазке подсчитывали 300 лимфоцитов и определяли процентное соотношение различных АГРК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хроническое действие солей аммония в течение 45 суток в концентрациях 1.5 и 2.5 ммоль/л вызывало достоверное снижение относительного числа АГРК, имеющих рецепторы к Т-маркеру (Т', Т-, D-клеток) и возрастание количества нулевых лимфоцитов. Число клеток, взаимодействующих с В-маркером, при концентрации 1.5 ммоль/л было выше контрольного уровня и не отличалось от него при 2.5 ммоль/л (рис. 1).

Похожие изменения наблюдались и при содержании рыб в бескальциевой среде. Через 30 сут эксперимента у опытных рыб наблюдали уменьшение количества иммуноцитов, имеющих рецепторы к Т-маркеру (Т', и Т-аналогов), увеличение числа нулевых клеток и лимфоцитов, взаимодействующих с В-маркером (В'- и В-аналогов), (рис. 2). Однако выявленные изменения не были достоверными.

Через 90 сут эксперимента различия между контрольной и опытной группами рыб усилились. В ретикуло-лимфоидной ткани почек число Т'-клеток снизилось в 1.9 раза, полностью исчезли Т-аналоги. Число D-лимфоцитов уменьшилось в 2.4 раза, и достоверно возросла доля нулевых клеток. Количество В-аналогов не отличалось от контрольного уровня (рис. 2).



Рис. 1. Изменение состава АГРК почек карпа при хроническом действии NH_4^+ (экспозиция 45 суток). 1 - Т', 2 - Т-аналоги, 3 - В', 4 - В-аналоги, 5 - D клетки, 6 - нулевые клетки, конт. - контроль. * - различия между контролем и опытом достоверны при $p=0.05$.

Полученные в обоих экспериментах результаты хорошо согласуются с высказанным ранее предположением, что избыток аммония в среде подавляет поступление кальция в организм рыб [4].

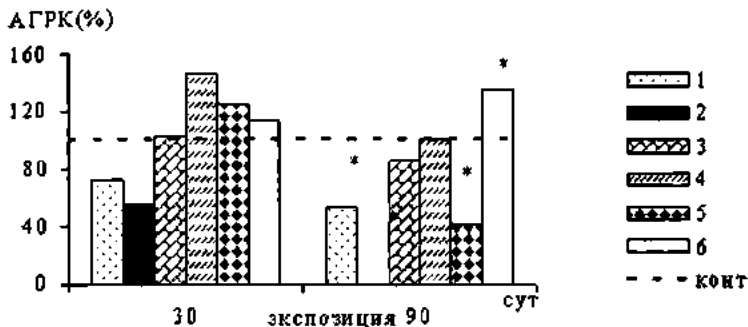


Рис.2. Изменение состава АГРК почек карпа в бескальциевой среде. Обозначения те же, что и на рис.1.

Недостаток кальция сначала восполняется организмом за счет его эндогенных запасов, так называемых кальциевых «депо» - костей и чешуи. Однако дефицит кальция в течение длительного периода времени (45 суток пребывания рыб в токсиканте и 90 суток содержания их в бескальциевой среде), очевидно, оказывает негативное действие на иммунную систему карпа.

Недостаточное поступление кальция из внешней среды, вызванное или отсутствием его в воде, или подавлением его поступления в организм избытком NH_4^+ , приводит к изменению соотношения отдельных субпопуляций лимфоцитов в почках карпа. Наиболее чувствительными к недостатку Ca^{2+} были клетки, имевшие рецепторы к Т-маркеру - Т-аналоги и D-лимфоциты. Известно, что активация клеток, выполняющих функции Т- лимфоцитов у рыб сопровождается увеличением концентрации внутриклеточного кальция, в то время как активация В-аналогов не всегда является кальциезависимым процессом [18].

Снижение в почках относительного количества клеток, выполняющих функции Т-лимфоцитов у рыб, подвергнутых хроническому действию солей аммония, возможно, связано и с воспалительными реакциями, имеющими место в эпителиальных тканях кишечника и жабр опытных рыб. При раздражении эпителия солями аммония нарушается целостность физиологического барьера, стоящего на пути внедрения микробов, в данных участках возникают очаги воспаления, куда устремляются в первую очередь Т-аналоги. Поэтому число их в кровотоке и органах кроветворения может снизиться. Не исключено, что при недостатке ионов

Ca^{2+} в организме рыб в результате изменения направления процессов дифференцировки стволовых клеток подавляется образование иммуноцитов, выполняющих функции распознавания «чужого». В тоже время возрастание доли В-аналогов объясняется тем, что в ретикуло-эндотелиальной ткани начинается активная пролиферация В-аналогов, их превращение в плазматические клетки, продуцирующие антитела к чужеродному антигену. Подобные изменения соотношения Т- и В-лимфоцитов отмечаются при воспалительном процессе у высших позвоночных [9].

Таким образом, хроническое действие NH_4^+ и содержание карпа в бескальциевой среде приводит к аналогичным изменениям в соотношении субпопуляций лимфоцитов почек: в обоих случаях снижается относительное число клеток, имеющих рецепторы к Т-маркеру (Т-аналогов и D лимфоцитов), в то время как количество В-аналогов в некоторых случаях возрастает или не отличается от контроля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алабастер Д., Ллойд Р. Критерии качества воды для пресноводных рыб // М. Легкая и пищевая промышленность. 1984. 344 с.

2. Балабанова Л.В. Влияние кадмия на ультраструктуру иммунокомпетентных клеток мозамбикской тилапии (*Oreochromis mossambicus*) // Цитология. 1997, т. 39, No.8, с. 677 - 680.

3. Брондз Б.Д. Т-лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании // М., Наука, 1987, 472 с.

4. Виноградов Г.А. Влияние ионов аммония на минеральный обмен у пресноводных рыб и ракообразных // Влияние загрязняющих веществ на водные организмы и экологические системы. Материалы советско-американского симпозиума. Харьков, 1988, с.146 - 159.

5. Гришина Т.И., Мюллер С. Одновременное выявление Т-, В- и D-розеткообразующих лимфоцитов и нулевых клеток человека // Бюлл. экп. биол. мед., 1978, No.4, с.503 - 506.

6. Гуковская А.С. Роль ионов в активации лимфоцитов // Усп. совр. биол., 1984, т.97, вып.2, с.179 - 192.

7. Гуреева З.П., Коваленко А.И., Гуреев Е.В. Исследование токсического действия аммиака на рыб // Тез. докл. I всес. конф. по рыбохозяйственной токсикологии. Рига, 1988, с. 89 - 90.

8. Зензеров В.С., Калюжная Ж.В., Полуэктова О.Г. Мор-

фологические аспекты действия аммиака на элементы эндокринной и пищеварительной систем молоди семги при аквариальном содержании // Тез. докл. I всес. конф. по рыбохозяйственной токсикологии. Рига, 1988, с.147-149.

9. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике // М.: Наука, 1990, 224 с.

10. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб // Рыбинск, 1991, 153 с.

11. Петров Р.В. Иммунология // М. Медицина, 1983, 368 с.

12. Рендалл Д., Руссо Р.К., Турстон Р.В. Распределение и экскреция аммиака у рыб // Влияние загрязняющих веществ на водные организмы и экологические системы. Материалы советско-американского симпозиума. Харьков, 1988, с.137 - 146.

13. Степанова В.М., Микряков В.Р. Использование метода Мендеса для изучения субпопуляций лимфоцитов карпа (*Cyprinus carpio* L.) // Биол. Внутр. Вод, 2002, No.3, с.84 - 87.

14. Тессенов В. Реакция бласт-трансформации лимфоцитов селезенки под влиянием антигенов // Иммунологические методы (под ред. Фримеля Х.). М.: Мир, 1979, с.159 - 163.

15. Boyum A. Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes // Tissue Antigens. 1974. Vol. 4. P. 269 - 273.

16. Burrows R.E. Effects of accumulated excretory products on hatcheryreared salmonids // Research report 66. Fish and Wildlife Service. U.S. Dept. Interior. Washington. 1964. 12 p.

17. Hurvitz A., Bercovier H, Van Rijn J. Effect of ammonia on the survival and immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) vaccinated against *Streptococcus iniae* // Fish & Shellfish immunology. 1997. Vol. 7. No.1. P. 45 - 53.

18. Kemenade B.M.L.V., Saey J.P.J., Flik G., Willems P.H.G.M. Calcium signaling in the carp lymphocytes. // Dev. Comp. Immun. 1997. Vol. 21. Issue 2. P. 94.

19. Lloyd R., Orr L.D. The diuretic response by rainbow trout to sub-lethal concentrations of ammonia // Wat. Res. 1969. Vol. 3. P. 335 - 344.

20. Mendes N. F., Miki S. S., Peixinho Z. F. Combined detection of human T and B lymphocytes by rosette formation with sheep erythrocytes and zymosan-C complexes // J. Immunology. 1974. Vol. 113. No.2. P.531 - 536.

21. Reichenbach-Klinke H. H. Untersuchungen uber die einwirkung des ammoniakgehalts auf den fischorganismus. (Investigations on the influence of the ammonia content on the

fish organism.) // Arch. Fischereiwiss. 1967. Vol.17(2). P. 122 - 132.

22. *Shaperclaus W.* Fishiorankheiten // Berlin: Akademie-Verlag, 1954. 708 s.

23. *Shaperclaus W.* Fishiorankheiten // Berlin: Akademie-Verlag, 1979. T.2. 1889 s.

24. *Schreckenbach K., Spangenberg R., Krug S.* Die Ursache der kiemennekrose // Z.Binnenfisherei DDR. 1975. H.9. S. 257 - 228.

**THE EFFECT OF AMMONIUM AND DEFICIENCY
OF CALCIUM ON LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS
OF CARP (CYPRINUS CARPIO L.)**

V.M.Stepanova, V.R.Mikryakov

**Papanin's institute for biology of inland waters RAS, Borok,
Yaroslavl region**

Studies were conducted on lymphocyte subpopulations of carp after 45 days exposure to NH_4^+ solutions (concentrations of 1.5 and 2.5 mmol/l) and after 30 and 90 days exposure to calcium free water. It was shown that a relative number of T-analogues and D-lymphocytes decreased in the both experiments. The number of B-analogues didn't differ from the control in the most cases while in sometimes it was increased.

УДК 597.5:612.017

**УРОВЕНЬ ЛИЗОЦИМА У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ
ХИЩНЫХ РЫБ**

Т. А. Субботкина, М. Ф. Субботкин

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанова РАН
152742, Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н*

Определяли содержание лизоцима в печени, почках, селезенке и сыворотке крови у 11 видов хищных рыб: белуги *Huso huso*, кижуча *Oncorhynchus kisutch*, кеты *O. keta*, белорыбца *Stenodus leucichthys*, щуки *Esox lucius*, судака *Stizostedion lucioperca*, берша *S. volgense*, речного окуня *Perca fluviatilis*, жереха *Aspius aspius*, сома *Silurus glanis*, налима *Lota lota*. Наиболее высоким уровнем фермента среди всех рыб выделяются белуга и белорыбца, которые сходны и характером его распределения в органах. Значительно меньше лизоцима у судака и берша, у которых

также одинаковое распределения фермента в организме. Щука, кета и кижуч сходны между собой по распределению фермента, но еще на более низком уровне. Другие объекты характеризуются наиболее низким уровнем значений изучаемого показателя неспецифического иммунитета и видовыми особенностями его распределения. Сопоставление хищных и мирных родственных видов показало их сходство по содержанию и распределению лизоцима в организме. Представленные материалы не подтверждают зависимость уровня лизоцима у рыб от типа питания. Определяющее значение в этом принадлежит филогенетическим связям сравниваемых объектов.

ВВЕДЕНИЕ

Лизоцим, фермент (Н.Ф. 3.2.1.17) из группы гликозидаз, является одним из древнейших и широко распространенных факторов неспецифической защиты живых организмов [1]. Исследованиями разных авторов показан широкий диапазон видовой изменчивости его содержания во внутренних органах и тканях рыб [6, 7, 10, 11, 13, 14]. Тем не менее, пока не существует единой и устоявшейся точки зрения на природу связи уровня лизоцима с какими-либо определенными особенностями рыб. Высказывается предположение, что хищные рыбы содержат фермента в организме больше, чем мирные [6, 7], хотя само деление на «хищных» и «мирных» относительно некоторых видов может быть признано условным [9, 12]. Серьезным препятствием для сопоставления данных разных авторов является отсутствие унифицированных методов анализа, вследствие чего значения показателя, полученные на одних и тех же объектах, могут существенно отличаться. Кроме того, в зависимости от поставленных задач различается набор анализируемых органов и тканей. По этой причине расширение списка изучаемых нами видов рыб сопровождается привлечением объектов, ранее уже исследованных другими авторами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание лизоцима определяли методом «диффузии в агар» [5], основанном на способности фермента лизировать убитую тест-культуру *Micrococcus lysodeikticus*. Использовали 1% агаровый гель, приготовленный на цитратно-солянокислом буфере с рН 6,2; и диспергированной в нем культурой. Зоны просветления измеряли через 24 часа ин-

кубации в термостате при 36,6°C. Количество лизоцима у рыб определяли по калибровочной кривой, построенной на стандартном препарате лизоцима из белка куриных яиц.

Лизоцим определяли в почках, печени, селезенке и сыворотке крови. Навеску образца исследуемой ткани гомогенизировали в 0,5% растворе NaCl в объемно-весовом соотношении 1:1. Полученные гомогенаты замораживали, оттаивали и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. Для определения лизоцима использовали надосадочную жидкость. Образцы сыворотки крови перед исследованием также разводились 0,5% раствором NaCl в соотношении 1:1. Подробно методика описана нами ранее [10, 11].

Исследовали хищные виды рыб [9, 12]: белугу *Huso huso*, кижуча *Oncorhynchus kisutch*, кеты *O. keta*, белорыбицу *Stenodus leucichthys*, щуку *Esox lucius*, судака *Stizostedion lucioperca*, берша *S. volgense*, речного окуня *Perca fluviatilis*, жереха *Aspius aspius*, сома *Siluris glanis*, налима *Lota lota* [2-4, 8]. Материал был собран на протяжении ряда лет в районе волжского плеса Рыбинского водохранилища, под плотиной Волжской ГЭС, в дельте р. Волги, в Северном Каспии и у западного побережья Камчатки в Охотском море. Большинство видов представлены выборками августа-сентября месяцев, и только белуга, белорыбица, жерех и речной окунь были отловлены в марте-апреле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее высокое содержание лизоцима в исследованных органах обнаружено у белуги и белорыбицы: в почках 727.1 ± 52.2 мкг/г и 475.5 ± 46.5 мкг/г, в селезенке 255.8 ± 10.0 мкг/г и 119.6 ± 12.9 мкг/г, в печени 63.8 ± 5.9 мкг/г и 50.7 ± 4.5 мкг/г ткани соответственно. Однако уровень фермента в сыворотке этих рыб невелик - 4.5 ± 0.7 мкг/мл у белуги и 7.7 ± 0.9 мкг/мл у белорыбицы. Эти два вида рыб сопоставимы между собой не только по количеству лизоцима в исследованных органах и тканях, но и сходны по характеру его распределения в организме: почки > селезенка > печень > сыворотка крови.

Остальные виды характеризуются значительно более низким общим уровнем лизоцима. Среди них пару видов, являющихся ближайшими родственниками, составляют судак и берш. По содержанию фермента в почках (83-94 мкг/г), селезенке (7-9 мкг/г) и печени (17-22 мкг/г) они не различаются между собой. Однако его количество в сыворотке

крови берша оказалось почти вдвое выше, чем у судака, 72.2 ± 31.2 мкг/мл и 41.2 ± 4.4 мкг/мл соответственно ($p > 0.05$). От белуги и белорыбицы эти два вида отличаются не только пониженным уровнем лизоцима, но и иным характером его распределения в организме: почки $>$ сыворотка крови $>$ печень $>$ селезенка.

Следующую группу видов со сходным содержанием лизоцима составляют щука, кета и кижуч. У этих рыб, как и у других рассматриваемых видов, самый высокий уровень фермента наблюдался в почках: от 64.4 ± 11.6 мкг/г у кижуча до 83.2 ± 8.1 мкг/г у щуки. Далее следуют селезенка, сыворотка крови и печень. При этом кижуч и щука не различаются между собой по содержанию лизоцима в селезенке и печени. Кета, хотя и выделяется повышенными средними уровнями лизоцима в селезенке (67.3 ± 6.7 мкг/г) и печени (12.6 ± 5.8 мкг/г), но эти различия незначительны ($p > 0.05$). И только по сыворотке крови, содержащей 12.5 ± 1.6 мкг/мл фермента, кижуч отличается от щуки (22.2 ± 2.6 мкг/мл) ($p < 0.05$) и кеты (30.2 ± 12.0 мкг/мл) ($p > 0.05$) более низким уровнем. Распределение лизоцима в организме этих рыб иное по сравнению с двумя первыми группами: почки $>$ селезенка $>$ сыворотка крови $>$ печень.

Речной окунь и жерех характеризуются относительно невысоким и сходным содержанием лизоцима в почках 25.6 ± 2.2 мкг/г и 35.5 ± 13.4 мкг/г и в печени 14.0 ± 1.5 мкг/г и 11.0 ± 5.4 мкг/г соответственно. Однако по уровню фермента в селезенке между видами обнаружены глубокие различия. У окуня в тканях этого органа лизоцим присутствует в очень больших количествах - 104.4 ± 14.6 мкг/г, что существенно отличает его не только от жереха ($p < 0.01$), но и от большинства других исследованных видов рыб. Межвидовые особенности проявляются и по сыворотке крови, где у окуня обнаружено незначительное содержание фермента по сравнению с рыбами других групп - 4.0 ± 1.7 мкг/мл, тогда как у жереха сыворотка лизоцимной активности не проявляла вовсе. Различия по лизоциму в селезенке и сыворотке крови обуславливают специфичный характер распределения этого фактора защиты в организме окуня: селезенка $>$ почки $>$ печень $>$ сыворотка крови, и жереха: почки $>$ селезенка $>$ печень ($>$ сыворотка крови).

Двум другим видам хищных рыб - сому и налиму - свойственно очень низкое содержание фермента во всех рассматриваемых органах и тканях. Средние уровни лизоцима у сома составляют диапазон от 2.4 ± 0.2 мкг/г в печени до

8.8±0.6 мкг/г в почках, распределяясь следующим образом: почки > сыворотка крови, селезенка > печень. Среди исследованных объектов уникальным является налима, в органах и сыворотке которого обнаружены самые низкие значения изучаемого показателя неспецифического иммунитета. Это обусловлено не только пониженным содержанием лизоцима в тех случаях, когда он обнаруживался, но и большой долей рыб, у которых лизоцимная активность не проявлялась в изучаемых органах. Более того, среди 10 полностью проанализированных особей не было рыб, содержащих лизоцим одновременно в почках, печени, селезенке и сыворотке крови. При этом 3 рыбы не имели лизоцимной активности ни в одном органе. Распределяется лизоцим у налима следующим образом: печень, селезенка > почки > сыворотка крови.

Результаты исследований свидетельствуют о чрезвычайно широком диапазоне межвидовой изменчивости содержания лизоцима в органах и тканях хищных рыб. Самый высокий уровень этого фактора неспецифической защиты обнаружен у белуги, а самый низкий - у налима. В одних и тех же органах у разных видов различия по абсолютным значениям могут достигать нескольких порядков (рис. 1). Кроме этого, исследованные рыбы демонстрируют также разнообразное распределение лизоцима в организме (рис. 2).

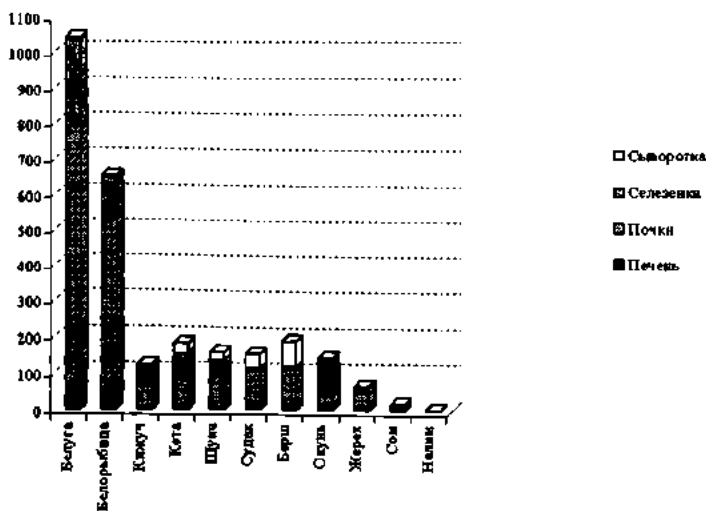


Рис. 1. Абсолютное содержание лизоцима у хищных видов рыб

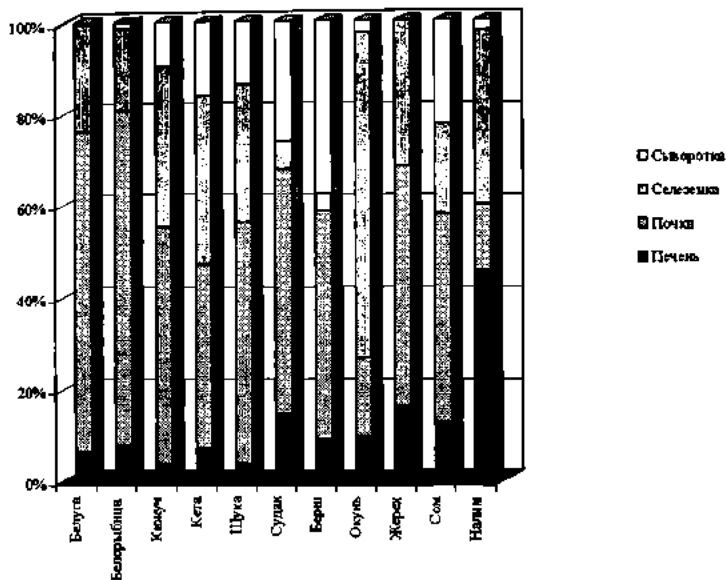


Рис. 2. Распределение лизоцима у хищных видов рыб.

Одной из особенностей объединяющего характера для многих видов может служить то обстоятельство, что наиболее высокая концентрация фермента сосредоточена в почках, хотя этот факт нельзя рассматривать как определенную закономерность для всех рыб. Таким образом, анализ содержания и распределения лизоцима у хищных рыб показал отсутствие какого-либо сходства во всей проанализированной группе видов.

Полученные данные, отражающие широкий диапазон вариации средних уровней лизоцима от близких к нулевым значений у налима до нескольких сотен мкг/г ткани у белуги, относительно равномерное распределение других видов рыб в этом интервале, а также различный характер распределения фермента в органах исследованных рыб, не дают оснований связывать содержание лизоцима в организме с типом питания. Поэтому на следующем этапе возникает необходимость сопоставить между собой хищных и мирных рыб.

Для решения подобной задачи требуется корректный подбор объектов. По нашему мнению сравниваемые виды должны отвечать ряду требований, включающих близкое род-

ство, сходство экологии, физиологического состояния, сроков и мест сбора материала. В реальности выполнение всех условий невозможно даже по объективным причинам таким как, например, несовпадение ареалов обитания.

Близким родственником белуги, но из рода *Acipenser*, относящимся к мирным рыбам, можно рассматривать русского осетра *Acipenser gueldenstaedti* Волго-Каспийского бассейна.

Этот вид, используемый в настоящей статье в синхронных выборках с белугой, уступает ей по уровню лизоцима в селезенке и не отличается по другим органам (рис. 3).

Вместе с тем материалы многолетних наблюдений свидетельствуют о том, что у белуги содержится больше фермента не только в селезенке, но и в печени. Однако у другого бентофага стерляди *A. ruthenus*, не относящегося к проходным видам, лизоцима во всех органах и тканях больше, чем у белуги. Более подробно видовые особенности осетровых рассматривались нами ранее [10]. Для других объектов, таких как белорыбица, родственникам жереха, в рамках одного подсемейства *Leuciscinae* и сходного по местам и срокам сбора материала, можно отнести красноперку *Scardinius erythrophthalmus*. По уровню лизоцима в почках и селезенке эти виды не различаются между собой. Однако у жереха содержание фермента в печени выше ($p > 0.05$), но у красноперки в небольших количествах он присутствует в крови. Таким образом, эти виды карповых рыб, несмотря на различный характер питания, оказываются сходными по содержанию и распределению лизоцима в органах (рис. 3, 4).

К родственному мирному виду для налима р. Волги можно отнести навагу *Eleginus gracilis* Охотского моря, также относящуюся к отр. *Gadiformes*, но к другому семейству. Органом, наиболее богатым лизоцимом, у наваги является печень - 3.53 ± 1.8 мкг/г. В селезенке и почках обнаружен сходный уровень фермента, но ниже, чем в печени ($p > 0.05$). Сыворотка крови наваги лизоцимной активности не проявляла. Таким образом, хищный налим и мирная навага оказались сопоставимыми между собой не только по содержанию лизоцима, но и по характеру его распределения в органах (рис. 3, 4). При этом у мирного вида фермента было несколько больше, чем у хищного ($p > 0.05$).

Представленные материалы не подтверждают зависимость уровня лизоцима у рыб от типа питания. Определяющее значение в этом принадлежит филогенетическим связям сравниваемых объектов.

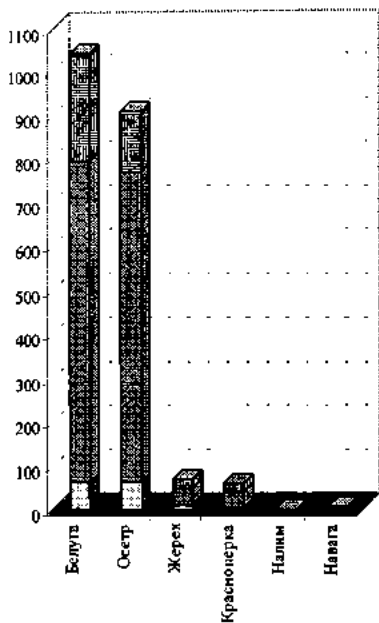


Рис. 3. Абсолютное содержание лизоцима у хищных и мирных рыб.

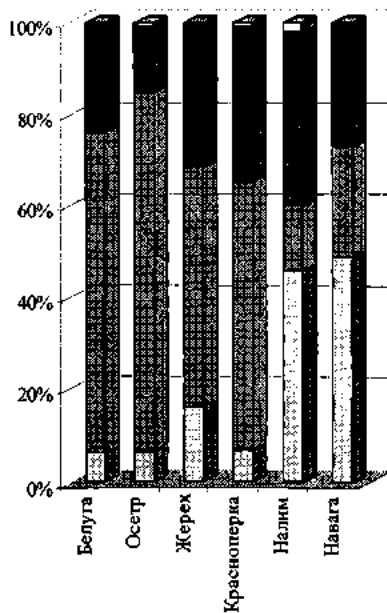


Рис. 4. Распределение лизоцима у хищных и мирных рыб.

1. Бухарин О.В., Васильев Н.В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. Томск: Изд-во Томского ун-та. 1974. 209 с.
2. Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран // М.-Л.: Изд-во АН СССР. Ч.1. 1948. 467 с.
3. Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран // М.-Л.: Изд-во АН СССР. Ч.2. 1949. С. 468-926.
4. Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран // М.-Л.: Изд-во АН СССР. Ч.3. 1949. С. 927-1382.
5. Ермольева З. В., Каграманова К. А. Сравнительная характеристика методов определения активности лизоцима // Антибиотики. 1966. N 10. С. 917-919.
6. Лукьяненко В. И. Иммунобиология рыб // М.: Пищевая промышленность. 1971. 364 с.
7. Лукьяненко В. И. Иммунобиология рыб. Врожденный иммунитет // М.: Агропромиздат. 1989. 272 с.
8. Никольский Г.В. Частная ихтиология // М.: Высшая школа. 1971. 471 с.
9. Никольский Г.В. Экология рыб // М.: Высшая школа. 1974. 367 с.
10. Субботкина Т.А., Субботкин М.Ф. Лизоцим четырех видов осетровых рыб сем. Acipenseridae р. Волги // Биология внутр. вод. 2002. №2. С. 88-93.
11. Субботкина Т.А., Субботкин М.Ф. Особенности активности лизоцима некоторых видов костистых рыб р. Волги // Биология внутр. вод. 2003. №. 1. С.102-107.
12. Суворов Е.К. Основы ихтиологии // Л.: Советская наука. 1948. 580 с.
13. Хорошко А. И. Лизоцим тканей и сыворотки крови у осетровых и поперечноротых // Тезисы отчетной сессии ЦНИОРХ. Астрахань, 1974. С. 160-161.
14. Fänge R., Lundblad G., Lind I. Lisozyme and chitinase in blood and lympho-myeloid tissues of marine fish // Marine Biology. 1976. V. 36. N 3. P. 277-282.

**A LEVEL OF THE LYSOZYME IN SOME SPECIES OF
THE PREDATORY FISH SUBBOTKINA T.A. &
SUBBOTKIN M.F.**

*Papanin's Institute for biology of inland waters RAS,
Borok, Russia*

The lysozyme content in liver, kidneys, spleen and blood serum was determined in 11 species of predatory fish: beluga

Huso huso, coho salmon *Oncorhynchus kisutch*, keta *O. keta*, inconnu *Stenodus leucichthys*, pike *Esox lucius*, zander *Stizostedion lucioperca*, Volga zander *S. volgense*, river perch *Perca fluviatilis*, asp *Aspius aspius*, wels *Silurus glanis*, burbot *Lota lota*. Beluga and inconnu are distinguished among all the fishes by the highest level of the enzyme and has a similar pattern of its distribution among organs. Zander and Volga zander have a significantly smaller content of lysozyme which also has a similar pattern of its distribution. Pike, keta and coho salmon are similar by pattern of distribution of the enzyme, but its level is even lower. The other species are characterized by the lowest values of this investigated factor of nonspecific immunity and specific pattern of its distribution. The comparison between predatory and nonpredatory relative species has shown similarity in the content and distribution of lysozyme in organism. These results suggest that the level of lysozyme in fish does not depend on type of feeding, but is determined by phylogenetic relation of the compared objects.

УДК 574.64 + 597:612.017

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ИНДЕКСА ШЕННОНА ДЛЯ ОЦЕНКИ ДЕСТАБИЛИЗАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В СОСТАВЕ ЛЕЙКОЦИТОВ РЫБ

Терещенко В.Г., Микряков Д.В., Микряков В.Р.

*Институт биологии внутренних вод РАН, Россия, Борок,
E-mail: tervlad@ibiw.yaroslavl.ru; mvr@ibiw.yaroslavl.ru*

Излагаются данные анализа опыта применения индекса Шеннона для оценки дестабилизационных процессов, происходящих в структуре лейкоцитов у рыб под влиянием различных стресс-факторов: солей тяжелых металлов (кадмия, меди и ртути), фенола, нафталина и кортикостероидного гормона – кортизона. Используя индексы «разнообразия» и «относительной организации», дана интегральная характеристика динамики изменения состава лейкоцитов при воздействии на рыб разных по природе возмущающих факторов. Показана возможность применения индекса Шеннона при изучении характера влияния возмущающих факторов на состояние стабильности структуры лейкоцитов и специфику вызываемых стрессорами нарушений в иммунопозитивных тканях рыб.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее было установлено, что при различных инфекцион-

ных, инвазионных и токсических воздействиях в составе лейкоцитов крови рыб отмечаются различные дестабилизационные процессы [3, 11, 12, 14]. При этом в первую очередь происходят нарушения в соотношении различных форм лейкоцитов, выполняющих разнообразные физиологические и иммунологические функции [6, 8, 9, 11, 21, 23, 29], т.е. изменения в лейкоцитарной формуле. Поэтому величина изменения в соотношении различных форм лейкоцитов может быть индикатором степени дестабилизационных процессов [14, 17, 25], происходящих в иммунной системе рыб в ответ на воздействие стрессоров, и основой прогноза последствий действия возмущающих (агрессивных) факторов на структурно-функциональное состояние клеточных факторов иммунитета.

При описании изменений в лейкоцитарной формуле приходится анализировать большой объем информации. Это создает трудности при оценке последствий воздействия стресс-факторов на иммунную систему рыб. Задача усложняется тем, что при сравнительном изучении динамики ответа лейкоцитов на действие нескольких нарушающих воздействий невозможно оценить специфику вызываемых в иммунокомпетентных тканях отклонений под влиянием разных по природе стресс-факторов. Основная идея данной работы заключается в предложении и апробации интегральных индексов для описания отмеченных выше изменений. Использование показателей позволяет сконцентрировать информацию об изменении соотношения различных форм лейкоцитов при воздействии на рыб разных по природе возмущающих факторов и получить наглядный способ представления характера реагирования иммунной системы на дестабилизационные факторы.

Таким образом, цель данной работы состоит в предложении интегральных индексов для описания изменения содержания отдельных форм лейкоцитов и проверке возможности оценки реакции иммунной системы рыб на различные нарушающие воздействия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования послужили табличные данные имеющихся в литературе результатов экспериментов по изучению влияния фенола, дихлофоса, нафталина и солей тяжелых металлов на состав лейкоцитов периферической крови рыб [3, 4, 12, 13].

Изучение влияния инъекции гормона дексаметазон-фосфата (аналог кортизона) проводили на карасях *Carassius carassius*. L. в возрасте 1+, средней массой 30-40 г. Рыб содержали в аэрируемых аквариумах при температуре воды 18-20°C. Обработку рыб гормоном проводили путем парентеральных инъекций в дозе 0.2 мл (0.8 мг) на 1 особь. Сбор материала осуществляли через 1, 3, 7, 15 и 18 суток после внутривентриальной инъекции гормона. Опыт начали через две недели после пересадки рыб в аквариумы; для снятия стресса, который мог повлиять на полученные данные.

Эксперименты по действию на иммунную систему фенола и нафталина проводили на годовиках карася массой 43.0 ± 0.4 г [3, 13]. Концентрация фенола равнялась 3 мг/л, нафталина - 10 мг/л, что составляло 1/10 LC₅₀ за 96 час.

Изучение влияния солей тяжелых металлов проводили на сеголетках (2 мес.) сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt, 1869), а в качестве токсических факторов использовали CuSO₄*5H₂O, HgCl₂ и Cd(NO₃)₂*4 H₂O в концентрации: медь - 0.015, ртуть - 0.003, кадмий - 0.03 мг/л [12]. На основании работ, проведенных рядом исследователей, такие концентрации солей тяжелых металлов можно считать сублетальными [10, 20-22, 27, 28].

Во всех экспериментах контролем служили особи, находившиеся в воде без добавления токсиканта.

Изменения в лейкоцитарной формуле крови могут затрагивать как изменение числа форм лейкоцитов, так и перераспределение их относительного обилия. В качестве показателя при описании сходных процессов в экологии, широко используют индекс биологического разнообразия, основанный на функции Шеннона [7, 15, 18, 26]. Концентрируя информацию о видовой структуре сообщества, он позволяет выявить общую тенденцию развития системы. Таким образом, для описания изменений как числа форм лейкоцитов, так и их относительного обилия предлагается индекс биологического разнообразия или формула Шеннона:

$$H = - \sum (n/N) \text{Log}_2 (n/N)$$

где n - численность i-й формы лейкоцитов,
N - суммарная численность лейкоцитов всех форм.

Иногда при сравнительном анализе удобнее использовать относительный показатель, изменяющийся от 0 до 1. Г. Ферстер [2] предложил использовать показатель R, который основан функции Шеннона и называется «относительная организации». В смысловом отношении данный показа-

тель является индексом доминирования. Относительная организация структуры лейкоцитов определяется по формуле:

$$R = 1 - H/(\text{Log}_2 K),$$

где K - число форм лейкоцитов.

Для детерминированной системы, состоящей из одной доминирующей формы лейкоцитов, а остальных представленных единичными клетками, этот показатель приближается к 1. Для полностью дезорганизованной при равном вкладе всех форм лейкоцитов показатель равен 0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Действие фенола и нафталина. Ранее при исследовании влияния фенола на состав лейкоцитов крови карася были выявлены изменения в соотношении отдельных типов клеток [3, 13]. Установлено, что на четвертые сутки после начала воздействия фенола наблюдались достоверные ($p = 0,05$) различия в доле лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов по сравнению с контролем, а на седьмые сутки - достоверно отличалось соотношение только лимфоцитов и нейтрофилов. Анализ графиков относительной численности различных форм лейкоцитов при действии фенола (рис. 1) позволяет только констатировать различие в лейкоцитарной формуле контрольных и опытных рыб на четвертые сутки эксперимента. Динамика интегральных характеристик структуры лейкоцитов крови карася - как разнообразия, так и относительной организации - наглядно демонстрирует то, что состояние иммунной системы рыб при воздействии фенола во время всего опыта отличалась от таковой контрольных рыб (рис. 2).

Однако, к концу эксперимента (на 28 сутки) показатели разнообразия и относительной организации структуры лейкоцитов опытных рыб приближаются к состоянию контрольных рыб. Причем, оба интегральных показателя дают сходные результаты. При воздействии же нафталина (рис. 2) интегральные характеристики структуры лейкоцитов к концу эксперимента не приближаются к таковым контрольных рыб. Ранее же проведенный анализ не позволил выявить достоверных отличий относительной численности различных форм лейкоцитов между опытными и контрольными рыбами по истечении четырех суток пребывания рыб в растворе токсиканта [3].

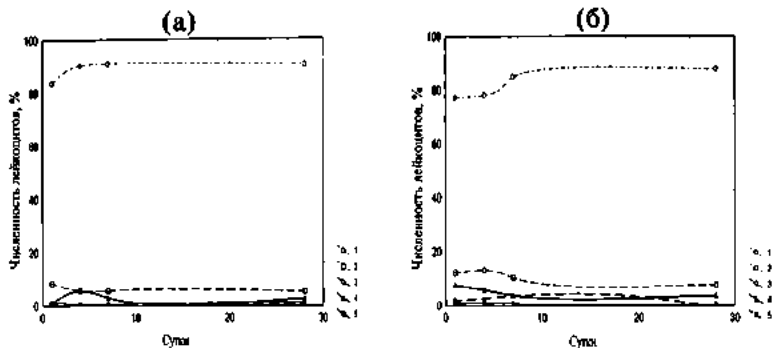


Рис. 1. Динамика различных форм лейкоцитов крови карпа в контроле (а) и при воздействии фенола (б). 1 – лимфоциты, 2 – нейтрофилы, 3 – эозинофилы, 4 – моноциты, 5 – blastные формы. По оси ординат – относительное обилие формы лейкоцитов, по оси абсцисс – время опыта, сутки.

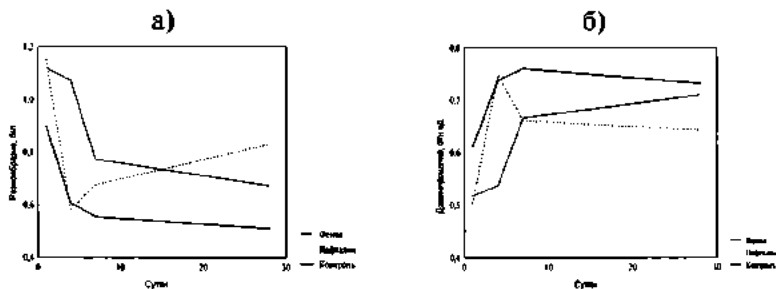


Рис. 2. Динамика индексов разнообразия (а) и относительной организации (б) состава лейкоцитов крови караса при воздействии фенола и нафталина.

Действие солей тяжелых металлов. При изучении влияния солей тяжелых металлов ранее установлено, что при действии ионов ртути у молоди ленского осетра в начале опытов содержание лимфоцитов достоверно снижается, а по истечению двух недель доля лимфоцитов достигает близких к контрольному уровню значений [12]. Кроме того, почти во все сроки наблюдения отмечено увеличение содержания нейтрофилов и эозинофилов у опытных рыб по сравнению с контрольными. При изучении влияния ионов кадмия выявлены сходные по характеру и направленности клеточные перестройки. Однако интенсивность отклонения палочко- и сегментоядерных клеток опытных рыб по сравнению с контрольными была менее выраженной. В присутствии же ионов меди лейкоциты молоди ленского осетра

реагируют уменьшением доли содержания лимфоцитов на первых двух этапах эксперимента и увеличением - нейтрофилов и эозинофилов [12].

Использование интегральных показателей подтвердило ранее сделанные выводы. Индексы разнообразия и относительной организации структуры лейкоцитов опытных рыб к концу эксперимента приближаются к состоянию контрольных рыб (рис. 3). Кроме того, обнаружены периоды уменьшения и увеличения различий в состоянии иммунной системы контрольных и опытных рыб, т.е., как было отмечено ранее [12], в динамике изменения доли содержания отдельных форм лейкоцитов опытных рыб обнаружены чередующиеся периоды «дестабилизации» — «нормализации» — «дестабилизации». Однако нами получены и новые выводы. Установлено, что при действии ионов меди структура лейкоцитов опытных рыб и в конце эксперимента, т.е. через 60 суток, не приближается к структуре лейкоцитов контрольных рыб, тогда как при действии солей ртути и кадмия к концу эксперимента отмечено уменьшения различий в состоянии лейкоцитов контрольных и опытных рыб (рис. 3).

Действие инъекции гормона. Анализ полученных результатов показал, что караси на введение дексаметазона реагировали изменением количественных характеристик всех типов лейкоцитов и тромбоцитов (табл. 1). У рыб, подвергнутых обработке гормональным препаратом, отмечено снижение количества лимфоцитов, тогда как других клеток, особенно нейтрофилов и моноцитов, повышается. Максимальный размах изменений в составе лейкоцитов установлен через 1 сутки после начала опыта. Количество лимфоцитов у опытных рыб по сравнению с контрольными особями снижается более чем в 2-3 раза и составляет 30-40 % от общего числа клеток. Содержание других типов клеток, напротив, увеличивается, особенно нейтрофилов - до 30 % и моноцитов - до 5-7 %. Одновременно с нейтрофилами в крови рыб установлен высокий уровень содержания тромбоцитов, количество которых в опыте превышало таковые в контроле более чем в 4 раза. Данные, полученные через 3 суток, указывают на постепенное снижение разбалансированности состава лейкоцитов между клетками опытных и контрольных рыб. Об этом свидетельствуют величины содержания отдельных типов клеток. Количественные характеристики лимфоцитов повышаются, а гранулоцитов и тромбоцитов снижаются. К концу недели показатели между опытом и контролем имеют небольшое различие, что указывает на возвращение к норме.

Количество лимфоцитов составляет 70-80 %, нейтрофилов 10-15 %, моноцитов 5-6 % и тромбоцитов 6-7 %. В последующие сроки наблюдения различия между величинами отдельных типов клеток в опыте и контроле сглаживаются.

Динамика информационных показателей отражает описанные выше перестройки в структуре лейкоцитов крови карася при действии инъекции гормона (рис. 4). Однако, изменения, происходящие в составе лейкоцитов карася после введения гормона, носили более выраженный характер, чем у рыб, обитающих в присутствии токсикантов, особенно в начале опыта. В начале эксперимента отмечена максимальная дестабилизация в составе клеток иммунной системы рыб. В течение двух недель иммунная система рыб приходит в норму.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ответ иммунной системы как целостного образования на воздействие неблагоприятных факторов среды многогранен. Сосредоточив при анализе ответа иммунной системы рыб основное внимание на двух важных структурных показателях иммунитета, а именно на числе форм лейкоцитов и их относительном обилии, мы идеализируем свойства анализируемой системы. Характер идеализации, допустимой при рассмотрении той или иной задачи, определяется свойствами самой системы и того, на какие именно вопросы мы хотим получить ответ. На наш взгляд, если мы хотим получить ответы на вопросы о том, когда иммунная система рыб приходит в стабильное состояние (в норму), как быстро она реагирует на те или иные изменения среды, и есть ли изменения в функционировании иммунной системы, то такая идеализация вполне приемлема. Вместе с тем, эта информация представляет существенный интерес для понимания функционирования гомеостатических механизмов, приводящих к адаптации иммунной системы рыб к неблагоприятным факторам среды, и разработки системы биотестов для мониторинга за состоянием здоровья рыб в условиях возрастающего загрязнения вод различными токсикантами.

На примере изучения влияния фенола, нафталина, инъекции гормона и солей тяжелых металлов на состав лейкоцитов периферической крови рыб показана принципиальная возможность использования интегральных показателей структуры лейкоцитов для исследования динамики дестабилизационных процессов, происходящих в иммунной системе рыб. Какую же новую информацию дало использова-

ние структурных индексов по сравнению с ранее полученными выводами?

Таблица 1
Изменение количества лейкоцитов и тромбоцитов под влиянием дексаметазона, %

Форма клеток крови		Время, сут				
		1	3	7	15	18
Лимфоциты		$\frac{88.0 \pm 2.02}{34.6 \pm 8.36}$	$\frac{88.2 \pm 0.58}{52.6 \pm 7.67^*}$	$\frac{89.4 \pm 1.07}{72.6 \pm 6.83^*}$	$\frac{89.2 \pm 1.46}{88.6 \pm 2.50}$	$\frac{89.8 \pm 0.66}{89.75 \pm 1.43}$
Базофилы		$\frac{1.0 \pm 0.31}{5.6 \pm 1.69^*}$	$\frac{1.2 \pm 0.20}{4.0 \pm 1.30}$	$\frac{1.0 \pm 0.31}{2.8 \pm 0.86}$	$\frac{1.0 \pm 0.31}{2.0 \pm 0.44}$	$\frac{1.0 \pm 0.31}{1.0 \pm 0.40}$
Эозинофилы		$\frac{0.4 \pm 0.24}{1.6 \pm 0.74}$	$\frac{0.6 \pm 0.40}{2.8 \pm 0.37^*}$	$\frac{0.6 \pm 0.24}{0.6 \pm 0.40}$	$\frac{0.4 \pm 0.24}{1.4 \pm 0.97}$	$\frac{0.4 \pm 0.24}{0.25 \pm 0.25}$
Моноциты		$\frac{1.2 \pm 0.73}{6.8 \pm 3.23}$	$\frac{1.0 \pm 0.44}{7.8 \pm 3.48}$	$\frac{0.4 \pm 0.24}{6.2 \pm 4.29}$	$\frac{0.4 \pm 0.24}{1.6 \pm 0.60}$	$\frac{0.4 \pm 0.24}{1.75 \pm 0.47^*}$
Тромбоциты		$\frac{3.4 \pm 0.74}{15.6 \pm 3.31^*}$	$\frac{3.6 \pm 0.67}{11.6 \pm 2.50^*}$	$\frac{2.6 \pm 0.24}{6.4 \pm 1.96}$	$\frac{2.2 \pm 0.20}{3.0 \pm 1.41}$	$\frac{2.2 \pm 0.20}{1.75 \pm 0.75}$
Н с й т р о ф и л ы	Юные	$\frac{1.2 \pm 0.58}{11.4 \pm 1.96^*}$	$\frac{2.2 \pm 0.58}{5.0 \pm 1.30}$	$\frac{1.8 \pm 0.37}{2.2 \pm 0.73}$	$\frac{1.8 \pm 0.58}{0.8 \pm 0.20}$	$\frac{1.8 \pm 0.20}{1.0 \pm 0.57}$
	Палочкоядерные	$\frac{1.8 \pm 0.37}{13.2 \pm 1.82^*}$	$\frac{1.8 \pm 0.37}{6.4 \pm 1.20^*}$	$\frac{1.6 \pm 0.40}{4.4 \pm 0.92^*}$	$\frac{2.2 \pm 0.20}{0.8 \pm 0.37^*}$	$\frac{2.0 \pm 0.44}{1.75 \pm 0.85}$
	Сегментно-ядерные	$\frac{3.0 \pm 1.37}{11.2 \pm 2.37^*}$	$\frac{1.4 \pm 0.67}{9.8 \pm 2.24^*}$	$\frac{2.6 \pm 0.24}{4.8 \pm 0.58^*}$	$\frac{2.8 \pm 0.37}{1.8 \pm 0.73}$	$\frac{2.4 \pm 0.24}{2.75 \pm 0.85}$

Примечание: над чертой — контроль; под чертой — опыт. Звездочкой отмечены данные, достоверно отличающиеся от контроля.

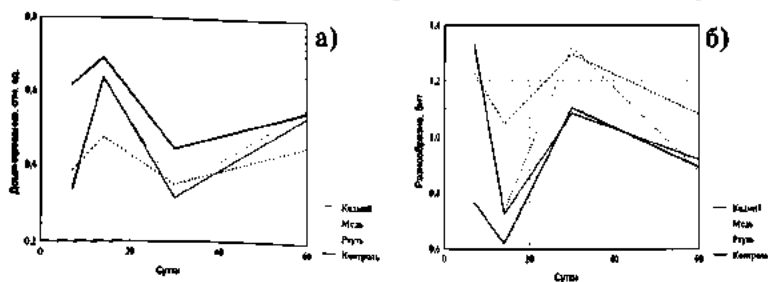


Рис. 3. Динамика индексов разнообразия (а) и относительной организации (б) состава лейкоцитов крови ленского осетра при воздействии солей тяжелых металлов.

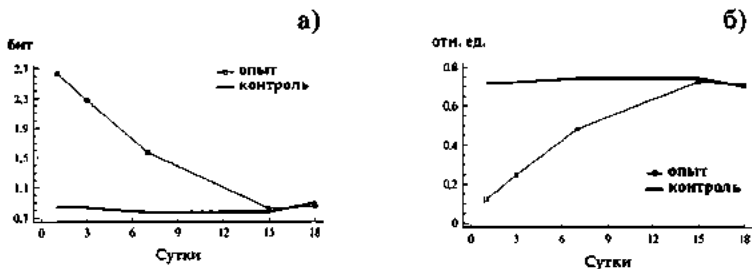


Рис. 4. Динамика индексов разнообразия (а) и относительной организации (б) состава лейкоцитов крови караса при инъекции гормона дексаметазон-фосфата (аналог кортизона).

Обычно результаты экспериментов по изучению изменений в структуре лейкоцитов крови при действии различных факторов среды представляют в виде таблицы, например таблица 1. Поскольку опыты проводят на нескольких рыбах, то есть возможность сравнения по критерию Стьюдента доли различных форм лейкоцитов в эксперименте и контроле. Что исследователи и делают, отметив в таблице звездочкой достоверные различия в соотношении форм лейкоцитов. Однако при длительных экспериментах, в которых изучается влияние разных токсикантов, оперирование большим массивом информации становится затруднительным. Свернутая же информация в виде интегральных индексов структуры лейкоцитов позволяет наглядно представить ответ иммунной системы в виде графиков. Таким образом, использование количественных показателей, основанных на лейкоцитарной формуле крови, упрощает оперирование большим объемом информации, полученной в результате длительных экспериментов, и позволяет проводить сравнение реакции клеточного звена иммунной системы рыб при действии нескольких факторов.

Если анализировать только динамику относительной численности различных форм лейкоцитов при воздействии фенола (рис. 1), то можно сказать, что наблюдаются определенные изменения на 4 сутки эксперимента в соотношении форм лейкоцитов у опытных рыб по сравнению с контролем. Свернутая информация об их относительной численности показала, что на протяжении всего периода исследования наблюдались различия в структуре лейкоцитов опытных и контрольных рыб, причем со временем происходило монотонное уменьшение этого различия при действии фенола, а при действии нафталина уменьшения различия не

произошло. Таким образом, с одной стороны применение интегральных характеристик дает более наглядный и чувствительный метод оценки различия в состоянии клеток иммунной системы рыб, а с другой стороны позволяет получить дополнительную информацию об относительной силе воздействия и характере реагирования клеток иммунной системы на нарушающие воздействия. Кроме того, видно (рис 2), что даже у контрольных рыб в течение эксперимента в составе клеток иммунной системы проходили определенные изменения. Первую неделю наблюдался рост индекса относительной организации и уменьшение индекса разнообразия, а в дальнейшем отмечалась стабилизация обоих индексов структуры лейкоцитов. Возможно, это связано со стрессорной реакцией, обусловленной пересадкой рыб в аквариумы, или с изменением условий их содержания. Если верно первое утверждение, то можно заключить, что время адаптации рыб к условиям их содержания в первом приближении может быть оценено в 7 суток. Интересно отметить, что и по результатам исследований В.В. Хлебовича [19] время адаптации рыб к солености укладывается в срок 1-3 недели. Более того, существует множество примеров, показывающих, что вспышки инфекционных болезней в прудах отмечаются через неделю после проведения различных рыбоводных работ в них.

Использование интегральных показателей структурных перестроек в лейкоцитах белой крови рыб при действии солей тяжелых металлов подтвердило ранее сделанные выводы [12]. Однако кроме этого получены и новые выводы. Установлено, что при действии ионов меди состояние опытных рыб и в конце эксперимента, т.е. через 60 суток, не приближается к уровню значений, соответствующему состоянию иммунной системы контрольных рыб.

Следует отметить, что оба предложенных индекса дают сходную информацию, поэтому в исследованиях можно ограничиться только одним. В случаях, когда количество форм лейкоцитов не изменяется, достаточно использовать только индекс "относительная организация" структуры лейкоцитов. В случаях, когда идет изменение и в количестве форм лейкоцитов, индекс "разнообразие" структуры лейкоцитов даст дополнительную информацию о состоянии иммунной системы по сравнению с индексом "относительная организация" и зависимости происходящих в составе клеток от природы возмущающего токсиканта.

Наибольший интерес на наш взгляд представляет неочи-

данный вывод о том, что наибольшая разбалансировка в структуре клеток иммунной системы рыб вызвана действием нафталина и меди по сравнению с действием фенола. Ранее на основании проведенных экспериментов нами был сделан противоположный вывод [3, 12]. Однако анализ динамики разнообразия форм лейкоцитов показывает, что к концу эксперимента наблюдается увеличение различия в ответе клеточного звена иммунной системы рыб на действие нафталина и меди - по сравнению со структурой лейкоцитов контрольных рыб. Это, вероятно, связано с особенностями механизма их иммунотоксического эффекта. Известно, что токсичность нафталина вызвана главным образом действием на компоненты крови и нейросекреторные органы [24], тогда как фенол оказывает опосредованное влияние на иммунную систему рыб [5, 11]. Сходное с нафталином действие на кроветворную функцию и нервную систему рыб, видимо, оказывают и ионы меди. Известно, что на избыточное накопление меди в организме животные реагируют гемолизом, развитием анемии и нарушением функции нервной системы [1]. В качестве гипотезы, объясняющей полученные результаты, можно предположить, что полиароматические углеводороды вызывают необратимые изменения в гемопоэтической ткани рыб.

Кроме того, полученные результаты позволяют более обоснованно подойти к планированию последующих экспериментов. Из анализа интегральных характеристик соотношения форм лейкоцитов видно, что первую неделю в составе клеток иммунной системы даже у контрольных рыб идут переходные процессы. Поэтому в дальнейшем при решении многих задач, связанных с оценкой последствий иммунотоксического эффекта неблагоприятных факторов на рыб, следует начинать отбор проб по истечении этого срока.

Уже имеющиеся данные позволяют сделать предварительный вывод об изменении равновесного состояния (нормы) соотношения форм лейкоцитов крови рыб в связи с их систематическим положением. Для молоди карася «норма» индекса «относительная организация» структуры лейкоцитов соответствует значениям 0,7 - 0,75, а для сибирского осетра - 0,5 - 0,6. Для человека, судя по имеющимся данным [16], «норма» индекса «относительная организация» структуры лейкоцитов соответствует значению 0,4.

ВЫВОДЫ

1. Предложены и апробированы интегральные индексы описания структуры лейкоцитов крови рыб (разнообразие и относительная организация), позволяющие визуализировать изменения, происходящие в функционировании их иммунной системы в ответ на воздействие токсических факторов, и оперировать при анализе произошедших изменений большим массивом информации.

2. Получена новая информация о характере ответа клеточного звена иммунной системы карася на воздействие фенола и нафталина. В первом случае установлено, что при воздействии фенола к 28 суткам состояние клеток иммунной системы опытных рыб приближается к состоянию контрольных рыб, а при воздействии нафталина – нет.

3. Получена новая информация о степени отклонения клеток иммунной системы молоди сибирского осетра в ответ на действие солей тяжелых металлов. Установлено, что ионы меди вызывают большие изменения в структуре лейкоцитов белой крови осетра по сравнению с действием ионов ртути и кадмия.

4. Установлено, что кортикостероидные гормоны в организме рыб вызывают сходные с таковыми на токсиканты дестабилизационные процессы в составе лейкоцитов с той лишь разницей, что амплитуда колебаний между клетками после обработки гормонами была выражена сильнее, чем на токсические факторы, а изменения в картине крови наступали быстрее.

5. Предложенные индексы позволяют подойти к решению вопроса о стабильности структуры лейкоцитов в норме и о характере дестабилизационных процессов, происходящих в иммунной системе при нарушающих воздействиях, и прогнозировать последствия влияния возмущающих факторов на состояние клеточного звена иммунитета.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 03-04-49309).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альберт А. Избирательная токсичность. Физико-химические основы терапии. М.: Медицина. Т.2. 1989. 432 с.
2. Антомонов Ю.Г. Системы, сложность, динамика. Киев: Наукова думка, 1969.- 124 с. Моделирование биологических систем. - Киев: Наукова думка. 1977. 248 с.
3. Балабанова Л.В., Микряков В.Р. Сравнительная характеристика действия нафталина и фенола на показатели белой крови карася // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре. Тезисы научно-практической конференции. М. 2000. С 39-40.
4. Балабанова Л.В., Степанова В.М. Хроническое действие нафталина и дихлофоса на иммунокомпетентные клетки мозамбикской тилляпии (*Oreochromis mossambicus* (Peters)) // Биол. Внутр. Вод. № 4. 2000. С. 146 – 155.
5. Гончаров Г.Д., Микряков В.Р. Влияние малых концентраций фенола на антителообразование у карпа (*Cyprinus carpio* L). В кн.: Вопросы водной токсикологии. М., Наука. 1970. С. 171-175.
6. Головина Н.А., Тромбицкий И.Д. Гематология прудовых рыб. Кишинев: Штиинца. 1989. 156 с.
7. Джиллер П. Структура сообществ и экологическая ниша. М.: Мир. 1988. 188 с.
8. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. М.: Лег. и пищ. пром-сть. 1983. 184 с.
9. Иванова Н.Т. Система крови. Материалы к сравнительной морфологии системы крови человека и животных. Ростов на Дону: Изд-во РГПИ, 1995. 155 с.
10. Латыпова В.З., Перевозчиков М.А. К разработке принципов ихтиологического мониторинга: степень ртутного загрязнения Куйбышевского водохранилища // Влияние антропогенного фактора на экосистему озер. Сб. ГосНИОРХ Вып. 313. 1990. С. 214 – 221.
11. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск. 1991. 153 с.
12. Микряков В.Р., Лапирова Т.Б. Влияние солей некоторых тяжелых металлов на состав белой крови молоди ленского осетра *Acipenser baeri* // Вопр. ихтиологии. Т.37 №4. 1997. С. 538-542.
13. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. и др. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление воды. М.: Наука. 2001. 126 с.
14. Микряков В.Р., Терещенко В.Г., Микряков Д.В., Ба-

лабанова Л.В. Применение интегральных показателей структуры лейкоцитов для изучения реакции иммунной системы рыб на токсиканты // Биол. Внутр. Вод. № 4. 2002. С. 84 – 88.

15. Сметанин М.М., Стрельников А.С., Терещенко В.Г. О применении теории информации для анализа динамики уловов рыб в формирующихся экосистемах // Вопр. ихтиологии. Т.23, вып.4. 1983. С. 531-537.

16. Сороко Е.М. Структурная гармония систем. Минск. Наука и техника. 1984. 264 с.

17. Степанова В.М., Терещенко В.Г. Динамика индекса разнообразия лейкоцитов мозамбикской тилляпии (*Oreochromis mossambicus* (Peters)) при хроническом действии нафталина, дихлофоса и кадмия // Современные проблемы биологии, химии, экологии и экологического образования. Ярославль. 2001. С. 216-219.

18. Терещенко В.Г., Терещенко Л.И., Сметанин М.М. Оценка различных индексов для выражения биологического разнообразия сообщества // Биоразнообразие: Степень таксономической изученности. М. 1994. С. 86-98.

19. Хлебович В.В. Акклимация животных организмов. Л. Наука. 1981. 136 с.

20. Шлейфер Г.С., Дохолян В.К. Физиологические и иммунологические особенности реакции рыб на изменение среды обитания // Экологическая физиология и биохимия рыб Т. 1. Тез. докл. IV Всесоюз. конфер. Астрахань. 1979. С 220 – 221.

21. Anderson P. Immunological indicators: effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks // Amer. Fish. Soc. Symp., 1990. P. 38-50.

22. Dunier M. Effects des pesticides et des metaux lourds sur le systeme immunitaire de la carpe *Cyprinus carpio* // Ichthyophysiol. Acta. 1991. P. 1 – 22.

23. Fish Pathology. London, Philadelphia, Sydney, Tokio, Toronto, 1989. 348 p.

24. Di Michele Z., Taylor M.Y. Histopathological and physiological responses of *Fundulus heteroclitus* to naphthalene exposure // J. Fish. Res. Board Can., 1978, V.35 №8. P. 1060-1066.

25. Mikryakov V.R., Tereshchenko V.G., Mikryakov D.V. Using the information indexes of frame of leucocytes to analysis of dynamics of a response of fishes on an operation toxicants, in Book abstracts EAFF Tenth International Conference on «Diseases of Fish and Shellfish», 10-14 September, Dublin, Ireland, 2001. p. 242.

26. Pielou E.C. *Mathematical Ecology*. 1977. New York. 385 p.
27. Ruparellia S.G., Verma J., Sayed S. R., Rawae U.M. Effect of cadmium on blood of tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters)// *Arch. Environ. Contam. and Toxicol.* V. 45. № 2. 1990. P. 305 – 312.
28. Thuvander A. Cadmium exposure of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: effect of immune function // *J. Fish. Biol.* V. 35. № 4. 1989. P. 521 – 529.
29. Wester P.W., Vethaak A. D., Van Muiswinkel W.B. Fish as biomarkers in immunotoxicology// *Toxicology*. V. 86. № 3. 1994. P. 213-232.

**EXPERIENCE OF APPLICATION OF SHENNON“S
INDEX FOR AN ESTIMATION OF DESTABILIZATORIC
PROCESSES IN STRUCTURE OF LEUKOCYTES
OF FISHES.**

Tereshchenko V.G., Mikrjakov D.V., Mikrjakov V.R.
Institute for biology of inland waters RAS, Russia, Borok,
E-mail: terulad@ibiw.yaroslavl.ru; mvr@ibiw.yaroslavl.ru

The data of the analysis of experience of application of Shannon“s index for an estimation of the destabilizatoric processes occurring in structure of leukocytes at fishes under influence of various stresses - factors are stated: salts of heavy metals (cadmium, copper and mercury), phenol, naphthalene and a corticosteroid hormone - cortisone. Using indexes «variety» and «relative organization», the integrated characteristic of dynamics of change of structure of leukocytes is given at influence on fishes different on a nature of revolting factors. The opportunity of application of Shannon“s index is shown at studying character of influence of revolting factors on a condition of stability of structure of leukocytes and specificity caused stressors infringements in immunopoietic tissues of fishes.

ЧАСТЬ II. ВОПРОСЫ ОБЩЕЙ И ЧАСТНОЙ ПАТОЛОГИИ

УДК 616+592-152.4+575.8

ПРИРОДА РАЗРУШЕНИЙ В ОРГАНИЗМЕ, НАБЛЮДАЕМЫХ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ, НЕОПЛАЗИИ И СТАРЧЕСКОЙ ИНВОЛЮЦИИ

А.В. Макрушин

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанова РАН;
п. Борок Ярославской обл., 152742.*

E-mail: makru@ibiw.yaroslavl.ru

Для обсуждения природы деструктивных явлений, наблюдаемых при воспалении, неоплазии и старческой инволюции, эти общепатологические процессы сравниваются с реакциями живых систем надорганизменного уровня и реакциями нормального онтогенеза самых примитивных беспозвоночных. Поведение живых систем разного уровня в условиях энергетической недостаточности, вызванной вмешательством в их метаболизм враждебных сил, сходно. Особенности протекания воспаления, неоплазии и старческой инволюции, отличающая эти процессы от регрессивного развития других живых систем, обусловлена очень высоким уровнем целостности организма большинства Metazoa.

ВВЕДЕНИЕ

Закономерности, которым следуют частные патологические процессы, это закономерности общебиологические. Только изучение общих закономерностей может приблизить нас к пониманию частных явлений, только таким образом мир патологических явлений предстанет перед нами как проявление взаимосвязи вещей, а не как хаос, беспорядок или игра случайностей [2]. В основе функционирования живых систем разного уровня лежат одни и те же принципы. Общим для всех живых систем является наличие сохранятельных свойств и интегративных внутрисистемных связей, принцип разделения функций системы между ее элементами, способность систем к прогрессивному и регрессивному развитию и сходство этих путей развития у живых систем разного уровня [1, 8, 13, 14, 21]. Закономерности, наблюдаемые у живых систем разного уровня, - частные проявления общесистемных закономерностей [15]. Цель статьи - обсудить, частными случаями какого более общего

процесса следует считать воспаление, неоплазию и старческую инволюцию. Эволюционным предшественником воспаления [9], неоплазии [12] и старческой инволюции [10, 11] была, вероятно, редукция первых на Земле Metazoa. Поэтому для того, чтобы понять частным проявлением какого более общего процесса являются перечисленные общепатологические процессы, нужно ответить на вопрос – частным проявлением какого более общего процесса является редукция. Редукция – реакция нормального онтогенеза губок, стрекающих, турбеллярий, немертин, мшанок, внутриврошителей, крыложаберных и асцидий. Она обеспечивает приспособление организма к ухудшению среды обитания и бесполое размножение. При редукции специализированные клетки, в некоторых случаях все, разрушаются (и/или деспециализируются), а малоспециализированные (и/или деспециализированные) размножаются. В результате редукции организм может превратиться в структуру, напоминающую ранний зародыш – морулу, бластулу или гастралу [4, 16, 19]. Чтобы понять природу деструктивных явлений, наблюдаемых при воспалении, неоплазии и старческой инволюции высших Metazoa, нужно ответить на вопрос – почему деструктивные явления происходят при редукции Metazoa низших.

ПРИСПОСОБИТЕЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ РЕГРЕССИВНОГО РАЗВИТИЯ

Редукция – это обратное развитие организма, его эмбрионизация, возвращение на пройденный этап онтогенеза [16], т. е. частный случай регрессивного развития. При регрессивном развитии живой системы наблюдается гибель ее специализированных элементов и/или их деспециализация и размножение менее специализированных и/или деспециализированных элементов, т. е. имеет место частичный или полный отказ живой системы от разделения функций между ее элементами. Живая система в экстремальных условиях, чтобы выжить, упрощается [21], т. е. Возвращается на пройденный этап своего развития. Регрессивное развитие живых систем в жизни биосферы играет не меньшее значение, чем поддержание их гомеостаза. Ресурсы Земли ограничены. Поэтому регрессивное развитие живых систем, - необходимое условие прогрессивного развития других живых систем. Регрессивное развитие может привести живую систему к гибели. Но оно может сыграть и приспособитель-

ную роль. Программа регрессивного развития, как и программа развития прогрессивного и сохранения структурной целостности и функциональной активности, заложена в организации живых систем разного уровня.

Регрессивное развитие обусловлено термодинамически. Сила, противостоящая внешним силам, стремящимся разрушить систему, - это совокупность интегративных связей между ее элементами [13]. Эти связи представляют собой взаимодействия элементов друг с другом, т. е. Воздействие элементов системы на другие. Любые взаимодействия вне зависимости от их сущности - это трата энергии. Пока метаболизм системы действием сил, направленных ей во вред, не нарушен и энергии для осуществления регуляторных процессов ей хватает, работа ее регуляторных механизмов обеспечивает сохранение всех ее элементов и всех связей между ними. При повреждении системы интенсивность ее метаболизма снижается и может оказаться недостаточной для осуществления всех интегративных связей. Возникает несоответствие между энергетическими нуждами системы и ее энергетическими возможностями. С.З. Ефуни и В.А. Шпектор [3] это состояние называют гипозергозом, или энергетической недостаточностью. Превышение энергетических потребностей над энергетическими возможностями грозит системе гибелью. Чтобы уцелеть, она использует или стресс-реакцию, повышая этим свои энергетические возможности, либо встает на путь регрессивного развития, снижая энергетические потребности.

Регрессивное развитие - это адаптивная реакция живой системы, ее структурная перестройка, направленная на сохранение жизнеспособности в ухудшившейся среде. Встав на путь регрессивного развития, живая система не противодействует ослаблению потока энергии, идущего через нее, а приспосабливается к существованию в условиях, когда этот поток ослаблен или отсутствует вовсе. Гибель специализированных элементов и размножение менее специализированных, наблюдаемые при регрессивном развитии, - это, вероятно, результат не прямого действия на них внешних неблагоприятных факторов, а реакция самой системы, которая для поддержания баланса энергии отторгает «специалистов» и способствует увеличению численности «универсалов». «Универсалы» меньше нуждаются во взаимоотношениях друг с другом, чем «специалисты», или совсем не нуждаются в них. Экономя энергию на взаимодействиях элементов, живая система ликвидирует энергетическую не-

достаточность, возникшую из-за ослабления ее метаболизма, нарушенного внешними враждебными силами.

ПРИСПОСОБИТЕЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАЗРЫВА ИНТЕГРАТИВНЫХ СВЯЗЕЙ

Приспособительный смысл деструктивных процессов, наблюдаемых при регрессивном развитии живых систем разного уровня, т. е. Гибели специализированных элементов и размножения неспециализированных, - в сокращении трат энергии на интегративные связи. Разрыв этих связей, обеспечивающий поддержание энергетического баланса живой системы в ухудшившейся среде, - широко распространенная реакция низкоинтегрированных живых систем разного уровня на действие повреждающих факторов. Так, у примитивных беспозвоночных при резком изменении солености воды, температуры, смене воды в аквариуме, нападении врага или при других повреждающих воздействиях наблюдается разделение организма на фрагменты (автотомия) или выбрасывание внутренностей (эвисцерация). Колонии сифонофор распадаются на части [17]. Гидроидные полипы сбрасывают гидранты [23]. Форониды автотомируют передний конец. У немертин, олигохет и полихет тело разрывается на куски. Морские звезды отламывают лучи. Голотурии распадаются на отдельные куски и выбрасывают внутренности [4]. Прекращение взаимодействий между разделяющимися частями организма при автотомии и эвисцерации - это реакция, обусловленная связанной с нарушением обмена веществ энергетической недостаточностью и направленная на ее ликвидацию или предотвращение. Снижением энергозатрат путем уменьшения числа элементов в системе, а, следовательно, и числа интегративных связей в ней, можно объяснить отмирание осенью надземной части у травянистых растений, листопад у деревьев, разрушение органелл у инцистирующихся при ухудшении среды обитания Protozoa.

Интегративные связи в популяциях, системах надорганизменного уровня, представляют собой взаимоотношения между ее элементами - особями. В экстремальных условиях эти связи разрываются, что ведет к возрастанию общей агрессии, нарушению отношений между полами, между родителями и потомством. Эта реакция наблюдается у популяций животных и людей [18]. Она сокращает число особей, приводя его в соответствие с уменьшившимися ресурсами, т. е. устраняет возникший из-за ухудшения среды

типоэргоз. В биоценозе интегративные связи – взаимодействия (трофические, информационные и др.) между видами. Их прекращение при сезонном ухудшении среды происходит, когда виды впадают в состояние покоя. Это уменьшает число интегративных связей биоценоза и экономит ставшую дефицитной в ухудшившейся среде энергию.

Сокращению энергозатрат организма примитивного беспозвоночного служит пролиферация, происходящая при редукции. Необходимость ее обусловлена тем, что в ходе ее происходит, как отмечают Г.П. Короткова и Б.П. Токин [5], утрата черт специализации, унаследованных от исходных соматических клеток. В результате этой утраты число интегративных связей в организме, подвергшемся редукции, уменьшается, и энергетические потребности его снижаются. Надежность существования живых систем, степень целостности которых низкая, обеспечивается их способностью при ухудшении среды подвергаться обратимому регрессивному развитию.

ПРИСПОСОБИТЕЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ДЕСТРУКТИВНЫХ ЯВЛЕНИЙ, НАБЛЮДАЕМЫХ В НОРМАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ ПРИМИТИВНЫХ МЕТАЗОА

Разрушение жизненно важных органов, происходящее при редукции, и сопровождающее это разрушение размножение малоспециализированных клеток на начальных этапах эволюции Метазоа были составной частью нормального онтогенеза. Гибель специализированных клеток и их дифференциация, наблюдаемые при редукции, у примитивных беспозвоночных вызываются несоответствием между потребностью организма в энергии и тем ограниченным количеством макроэргов (АТФ), которое он сможет противопоставить внешним повреждающим силам для сохранения своей структурной целостности и функциональной активности. Сокращая посредством инволюции и дифференциации количество типов клеток, беспозвоночное уменьшает число внутриорганизменных интегративных взаимодействий. Это позволяет ему обходиться меньшим количеством энергии и пережить время, когда его метаболизм нарушен и мощность его недостаточна для поддержания структур тела.

Из перечисления групп видов, у которых описана редукция, видно, что этот процесс наблюдается лишь у организмов, степень целостности которых очень низкая. Представление о целостности живых систем разного уровня возник-

ло на основе изучения организма высокоорганизованных Metazoa. Переноса результаты этого изучения на другие живые системы, гораздо менее целостные, большинство исследователей основное внимание сосредоточивали на сохранении ими в изменчивой среде структурной целостности и функциональной активности, оставляя в стороне механизмы регрессивного развития. Некоторые исследователи регрессивное развитие, по-видимому, не считали приспособительным. Так, например, по В.К. Лабутину [7] адаптация – это автоматические изменение характеристик или способа функционирования системы, *направленное на повышение ее эффективности*. По Б.П. Ушакову [20] адаптация – сформировавшаяся в филогенезе целенаправленная совокупность молекулярных реакций, *обеспечивающих целостность живых систем*. По Г.Л. Шкорбатову [22] адаптация – совокупность реакций живой системы, *поддерживающих ее функциональную устойчивость* при изменении условий окружающей среды. Таких высказываний, свидетельствующих о непризнании за регрессивным развитием приспособленного значения, в литературе много.

У живой системы могут быть две стратегии адаптации – резистентная и толерантная. Резистентная – это развитие стресс – реакций, активное противодействие внешней среде, максимизация функций. Эта стратегия позволяет системе в трудных условиях на пределе возможностей решать важные жизненные задачи. Толерантная стратегия характеризуется подчинением среде, минимизацией функций [6]. К какой стратегии прибегнет живая система, зависит от степени ее целостности и от силы внешнего воздействия. Степень целостности системы измеряется ее способностью удерживать свои специфические особенности наперекор повреждающим внешним воздействиям [1]. Она характеризуется большей или меньшей взаимозависимостью или, наоборот, автономией частей, большее или меньшее подчинение частей целому [19]. Степень целостности перечисленных выше беспозвоночных очень низкая. Поэтому они используют для приспособления к ухудшившейся среде главным образом толерантную стратегию. Особенность ее у них в том, что она осуществляется путем редукции, т.е. разрушения жизненно важных органов. На ранних этапах эволюции их разрушение обеспечивало поддержание энергетического баланса организма в ухудшившейся среде.

СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЕ РЕГРЕССИВНОГО РАЗВИТИЯ И ОБЩЕПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Редукция – это утрата специализированных элементов системы (дифференцированных клеток) и размножение менее специализированных. Утрата специализированных элементов системы и размножение менее специализированных – общая черта регрессивного развития и общепатологических процессов. При регрессивном развитии биоценоза, происходящем при его повреждении, погибают в первую очередь К-виды, т.е. специализированные элементы этой живой системы. На смену им приходят менее специализированные г-виды. Разрушение специализированных клеток и размножение менее специализированных наблюдается при общепатологических процессах. Специализированные клетки погибают при воспалении, неоплазии, старческой инволюции. Опережая эту гибель или следуя за ней, в ходе общепатологических процессов происходит размножение менее специализированных клеток. При старческой инволюции пролиферируют соединительнотканые клетки, т.е. клетки менее специализированные, чем погибающие. При воспалении обычно пролиферируют тоже соединительнотканые клетки. Рост опухоли осуществляется путем размножения малигнизированных клеток, а малигнизация – это снижение специализированности клеток. Между регрессивным развитием и общепатологическими процессами имеется и различие. При регрессивном развитии происходит возвращение на пройденный этап развития. Общепатологические процессы не омолаживают. Тем не менее, есть основание думать, что они тоже представляют собой частные случаи регрессивного развития, своеобразии протекания которого у большинства Metazoa обусловлено очень высоким уровнем их целостности.

ИЗМЕНЕНИЕ В ХОДЕ ПРОГРЕССИВНОЙ ЭВОЛЮЦИИ РОЛИ МЕХАНИЗМА РЕДУКЦИИ

Живая система, как говорилось выше, в экстремальных условиях, чтобы уцелеть упрощается [21]. Однако упрощаться в ответ на повреждение может не любая живая система, а лишь низко интегрированная. Большинство Metazoa, систем очень высоко интегрированных, упрощаться, т. е. уменьшать количество клеток в организме не могут. Надежность их существования обеспечивается не способнос-

тью к редукции, как у менее интегрированных живых систем, а другими более совершенными регуляторными физиологическими механизмами. Но способность к редукции у высокоорганизованных Metazoa не исчезла. Она лишь подавлена. В экстремальных ситуациях, когда вновь возникшие механизмы со своей работой не справляются, включается механизм редукции. Воспаление, неоплазия, старческая инволюция – это, вероятно, включение механизма редукции [9-12]. Из-за высокой целостности организма редукция у большинства Metazoa не может дойти до своего конца, т. е. до превращения особей в ранний зародыш. Прекращение существования особи прерывает этот процесс в его начале. Редукция у большинства Metazoa больше не может служить для поддержания баланса энергии организма. Роль этого древнего регуляторного механизма стала иной. Обеспечивая путем общепатологических процессов устранение из популяций особей, редукция при воспалении, неоплазии и старческой инволюции ускоряет эволюцию, т. е. способствует более быстрому приспособлению популяции к постоянно меняющимся условиям среды обитания.

Работа выполнена при финансовом содействии РФФИ, грант 98-04-48043.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беклемишев В.Н. Об общих принципах организации жизни // Бюлл. МОИП. Отд. Биол. 1964. Т. 69, № 2. С. 22-38.
2. Давыдовский И.В. Общая патология человека. М.: Медицина, 1969. 610 с.
3. Ефуни С.Н., Шпектор В.А. Гипоксические состояния: механизмы развития и пути коррекции. // Руководство по гипербарической оксигенации (теория и практика клинического применения). / Ефуни С.Н. (рек). М.: Медицина, 1986. С. 5-28.
4. Иванова-Казас О.М. Бесполое размножение животных. Л. Изд. ЛГУ, 1977. 240 с.
5. Короткова Г.П., Токин Б.П. Явление дифференциации в ходе полового и соматического эмбриогенеза // Дифференцирование в процессе регенерации (материалы совещания). М.: МОИП, МГУ, 1973. С. 14-33.
6. Кулинский В.И., Ольховский И.А. Две адаптационные стратегии в неблагоприятных условиях – резистентная и

толерантная. // Успехи совр. Биологии. 1992. Т. 112, № 5-6. С. 697-714.

7. *Лабутин В.К.* Очерк адаптаций в биологии и технике. Л. Энергия. 1970. 160 с.

8. *Левченко В.Ф.* Модели и теории биологической эволюции. 1993. СПб. Наука. 389 с.

9. *Макрушин А.В.* Рассмотрение некоторых адаптаций беспозвоночных в связи со сравнительной патологией воспаления // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. 1997. Т 33. № 4, 5. С. 570-574.

10. *Макрушин А.В.* Как мог возникнуть механизм старческой инволюции // Успехи геронтологии. 2001. № 7. С. 50-51.

11. *Макрушин А.В.* Обратное развитие и старческая инволюция // Успехи геронтологии. 2003. № 11. С. 47-48.

12. *Макрушин А.В., Худoley В.В.* Опухоль как атавистическая адаптивная реакция на условия окружающей среды. // Журн. общ. Биологии. 1991. Т. 52, №25. – С.717-722.

13. *Новосельцев В.Н.* Теория управления и биосистемы: анализ сохранительных свойств. М.: Наука, 1978. 320 с.

14. *Новосельцев В.Н.* Системные аспекты гомеостаза. // Гомеостаз на различных уровнях организации биосистем / Новосельцев В.Н. (рек. Новосибирск: Наука, 1991. С.3-17.

15. *Рапопорт А.* Различные подходы к общей теории систем // Системные исследования. Ежегодник. 1969. М.: Наука. С. 55-79.

16. *Светлов П.Г.* Физиология (механика) развития (в 2-х т.). Л.: наука, 1978. 279 с. и 263 с.

17. *Степаньянц С.Д.* Сифонофоры морей СССР и северной части Тихого океана. Л.: Наука, 1967. 216 с.

18. *Судаков К.В.* Стресс и эволюции сообществ: пути выживания. // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. 1995. Т. 31. № 4. С. 489-499.

19. *Токин Б.П.* Регенерация и соматический эмбриогенез. Л.: Изд. ЛГУ, 1959. 268 с.

20. *Ушаков Б.П.* О классификации приспособлений животных и растений и о роли цитологии в разработке проблемы адаптации // Проблемы цитозологии животных. М.-Л.: Институт цитологии АН СССР. Сб. работ №6. 1963. С.5-20.

21. *Шакин В.В.* Биосистемы в экстремальных условиях / Журн. общей биологии. 1991. Т. 52. №6. С. 784-792.

22. *Шкорбатов Г.Л.* К построению общей теории адаптации // Журн. общей биологии. 1982. Т. 43. №6. С. 775-783.

**NATURE OF DESTRUCTIONS IN AN ORGANISM,
OBSERVABLY(NOTICE) AT AN INFLAMMATION,
NEOPLASIA AND SENILE INVOLUTION**

A. V. Makrushin

*Institute of biology of internal waters him(it). I.D.Papanina
of the Russian Academy of Science;
Item Борок Yaroslavl обл, 152742.
E-mail: makru@ibiw.yaroslavl.ru*

For discussion of a nature of the destructive phenomena observably at an inflammation, neoplasia and senile involution, these pathonomic processes are compared to reactions of alive systems of a superorganismic level and reactions of normal ontogeny of the most primitive invertebrate. The behaviour of alive systems of a different level in conditions of the power insufficiency caused by intervention in their metabolism of hostile forces, is similar. Feature of course of an inflammation, neoplasia and senile involution, distinguishing these processes from regressive development of other alive systems, is caused very much by a high level of integrity of an organism of majority Metazoa.

УДК: 574.522:597.08(28)

**СТРЕСС И БОЛЕЗНИ: ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ
ВОДНО-СОЛЕВОГО РАВНОВЕСИЯ
У ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ**

Р. А. Запруднова

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН
152742 п. Борок Ярославской обл. Некоузского р-на

По собственным и литературным данным исследованы общие закономерности динамики концентрации ионов натрия в плазме крови и калия в мышцах у разных видов рыб при патогенезе различных заболеваний и выявлена зависимость ответной реакции от степени развития болезни (или количества неблагоприятного воздействия). По динамике концентрации ионов натрия, калия и кальция в плазме крови, эритроцитах, мышцах, мозге, а также обмену ионов между организмом и водой изучено состояние системы водно-солевого

равновесия у рыб при стрессе с летальным исходом (остром, подостром и хроническом), проанализированы возможные причины гибели рыб, связанные с изменением ионных показателей. Обсуждается роль ионов в механизмах фенотипа, предложен гипотетический механизм развития склероза с участием ионов натрия. Описаны способы сохранения жизни рыб в различных стрессовых условиях с использованием ионных препаратов. Предложен метод прижизненной диагностики стрессоустойчивости рыб по ионному обмену.

ВВЕДЕНИЕ

При любой болезни помимо специфических изменений, характерных для каждого конкретного заболевания, в организме наблюдаются общие, неспецифические. Известны также болезни адаптации или плюрокаузальные (многопричинные), где стресс выступает в качестве главного этиологического фактора [14, 17]. Болезни адаптации, в свою очередь, составляют значительную часть незаразных болезней рыб. Однако на настоящий момент разрозненная и немногочисленная литературная информация не позволяет составить представление об общих механизмах адаптации в системе водно-солевого равновесия у рыб при заболеваниях разной природы и интенсивности, а публикации по стрессу касаются в основном острых, обратимых его форм, практически не изучены предгибельные фазы стресса. Поэтому задачами настоящей работы стали: 1) исследование общих закономерностей динамики концентрации катионов в тканях пресноводных рыб при различных болезнях в ходе нарастания патологии; 2) изучение состояния системы водно-солевого равновесия (по изменению содержания ионов в тканях и ионному обмену между организмом и водой) у рыб при различных формах патологического стресса: остром, подостром, хроническом с летальным исходом; 3) проведение по ионному обмену прижизненной диагностики стрессоустойчивости рыб.

ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ В ТКАНЯХ БОЛЬНЫХ РЫБ

На рис. 1 показаны изменения концентрации ионов натрия в плазме крови и калия - в мышечной ткани у разных видов пресноводных рыб в ходе патогенеза миопатии, а также некоторых заразных болезней (аэромоноза, ихтиофтириоза, лигуллоидоза, сапролегниоза). В работе использовались

собственные и литературные данные. Собственные исследования проводили на половозрелом и близком к половозрелости леще (*Abramis brama*) Рыбинского и Куйбышевского водохранилищ и половозрелой плотве (*Rutilus rutilus*) Рыбинского водохранилища. В состоянии предболезни, или в самую начальную фазу заболеваний разной этиологии концентрация натрия в плазме крови и калия в мышцах повышалась. Примерно в середине патогенеза содержание ионов в тканях больных рыб практически не отличалось от такового у здоровых, за исключением ряда случаев, когда наблюдался более низкий уровень калия в мышцах. На последних стадиях заболеваний регистрировали устойчивую гипонатриемию и снижение содержания калия в мышцах.



Рис. 1. Концентрация натрия в плазме крови (А) и калия в мышцах (Б) у больных рыб. 0-IV - стадии развития болезней. 1 - ихтиофтириоз (лещ, собственные данные; карп, [10,21]), 2 - аэромоноз (лещ, собственные данные; карп, [19]), 3 - сарролегиноз (лещ, плотва, собственные данные; карп, [2]), 4 - лигуллоидоз (лещ, собственные данные), 5 - миопатия (русский осетр, [7-9]). горизонтальная линия - норма.

В клетке доминирующим ионом является калий, а снаружи клетки ... натрий. Поэтому можно заключить, что в начальный период болезни (не зависимо от ее этиологии) изменения ионных показателей направлены в сторону повышения концентрационных градиентов на мембране клеток (гиперкомпенсация), а на поздних стадиях заболевания ... в сторону снижения (редукция). Такие же закономерности в отклонении ионных параметров наблюдали при нарастании силы и/или продолжительности стрессоров различной природы [3-5], т.е. характер ответной реакции на болезнь в системе водно-солевого равновесия определялся количеством (силой, продолжительностью) действия ее как неблагоприятного фактора. Содержание натрия во внутренней среде организма является показателем уровня энергетики организма, т.к. натриевый потенциал является основ-

ной энергетической валютой на наружной мембране животных клеток, а по содержанию калия в мышцах можно судить об уровне анаболических и катаболических процессов в клетках. Таким образом, в начальный период болезни (т.е. в ответ на несильный непродолжительный стрессор) включается активная защитная реакция организма: происходит повышение энергетики организма, усиливаются анаболические процессы, и увеличивается общая, неспецифическая устойчивость организма, а в конце болезни (т.е. под действием сильного и/или продолжительного стрессора) преобладает пассивная защитная реакция, которая сопровождается снижением энергетики, усилением катаболических процессов и уменьшением устойчивости организма. Активная защитная реакция обеспечивает прогрессивное развитие организма, а пассивная - сохранение жизни в экстремальных условиях [3-5]. Эти две реакции (или стратегии адаптации) могут быть обозначены также, соответственно, как физиологический и патологический стресс или эустресс и дистресс. Состояние организма высших позвоночных (главным образом, человека), возникающее под влиянием несильных непродолжительных раздражителей наиболее подробно изучено ростовскими физиологами [1]: ими выделены реакции тренировки (в ответ на слабые воздействия) и спокойной и повышенной активации (на раздражители средней силы). Однако авторы не исследовали динамику ионных показателей.

Изменение активности иммунной системы в ходе развития заболеваний разной этиологии подчиняется выше описанной зависимости ответной реакции от дозы воздействия, т.е. происходит от стимуляции - к депрессии. Общеизвестно также, что иммунизация (введение небольших доз патогена) повышает общую, неспецифическую устойчивость организма. Таким образом, существует положительная корреляция между динамикой активности ионных и иммунных показателей, что может быть проиллюстрировано многими примерами, но не приводится из-за ограниченного места в настоящей работе.

Переход от активной защитной реакции к пассивной (от гиперкомпенсации к редукции) осуществляется через промежуточную фазу - ареактивности. Для того чтобы выделить больных рыб, которые по содержанию ионов в тканях не отличаются от здоровых, предлагается применять разного рода дополнительную острострессорную нагрузку. Как правило, в одинаковых стрессовых условиях ионный дисба-

ланс во внутренней среде организма и потери ионов в воду у больных рыб выше, чем у здоровых (Рис. 2, [5]).

ДИАГНОСТИКА СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ РЫБ ПО ИОННОМУ ОБМЕНУ

Опыты проводили на леще (Рис. 2) и карасе (*Carassius auratus*) [5]. Рыб помещали в ограниченный объем воды (соотношение массы тела и воды 1:20) меньшей или такой же минерализацией, в которой они содержались ранее. По величине диффузии ионов натрия в воду рыб разделили на неустойчивых (№№ 10-17) и устойчивых к стрессу (№№ 1-9). Потери натрия у неустойчивых и устойчивых к стрессу рыб различались в среднем на порядок. При определении жизнеспособности особей в достаточно разнородной группе стрессоустойчивых рыб предлагается основное внимание уделять скорости диффузии ионов калия. Общее количество потерянных организмом ионов калия при температуре воды 17-19°C составляло 7-10 ммоль/кг, однако это количество рыбы теряли за период от нескольких дней до нескольких месяцев. По скорости диффузии калия выделены среднеустойчивые (№№ 3-9) и высокоустойчивые (№ 1 и отчасти № 2) к стрессу особи.

Рыбы, находящиеся на III-IV стадиях развития заболеваний разной этиологии, всегда в описанных условиях реагировали по типу стрессонеустойчивых особей, а на II-III стадиях — по типу как неустойчивых, так и среднеустойчивых, пограничных с неустойчивыми. Рыбы с заболеваниями на стадиях 0-I и I-II относились к среднеустойчивым к стрессу. По типу высокоустойчивых к стрессу в описанных условиях реагировали только совершенно здоровые и сильные (не истощенные) особи.

Таким образом, у рыб, находящихся в одинаковых стрессовых условиях, в зависимости от исходного состояния (стрессоустойчивости) ответная реакция в системе водно-солевого равновесия будет разной: или по типу острого стресса с летальным исходом (стрессонеустойчивые рыбы), или подострого (среднеустойчивые к стрессу), или хронического (высокоустойчивые).

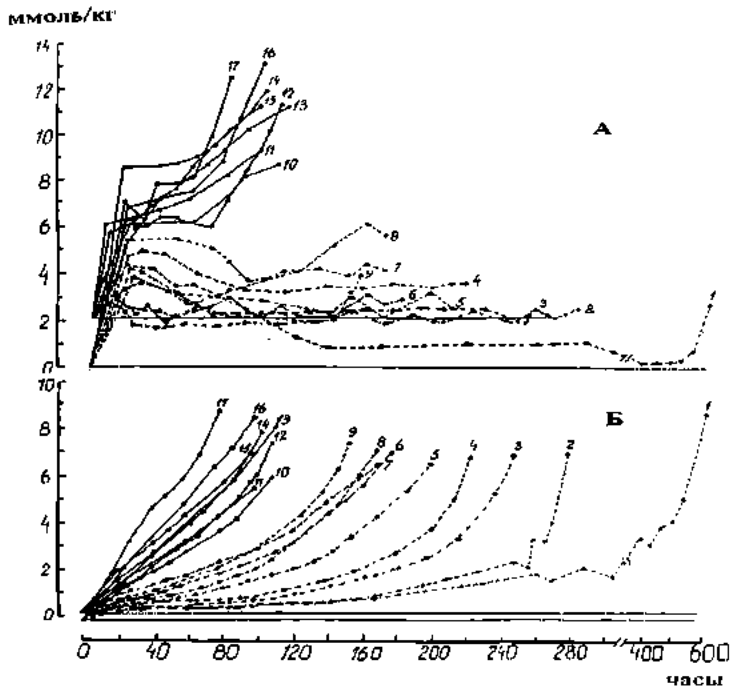


Рис.2. Диагностика стрессоустойчивости леща по обмену натрия (А) и калия (Б) между организмом и водой. По оси ординат - потери ионов в воду, по оси абсцисс - время жизни рыб. 1-17 - номера рыб; сплошной линией - неустойчивые к стрессу, пунктирной - устойчивые; горизонтальные прямые - уровень минерализации до опыта.

ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ ВОДНО-СОЛЕВОГО РАВНОВЕСИЯ У РЫБ ПРИ СТРЕССЕ С ЛЕТАЛЬНЫМ ИСХОДОМ

В работе представлен новый оригинальный материал в сочетании с анализом и обобщением результатов прежних исследований. В качестве основного объекта для опытов выбран взрослый лещ (*Abramis brama*) Рыбинского водохранилища, изучали также щуку (*Esox lucius*), плотву (*Rutilus rutilus*) Рыбинского водохранилища и искусственно разводимого на экспериментальной прудовой базе карася серебряного (*Carassius auratus*). Острый стресс с летальным исходом (продолжительностью 5-96 ч) вызывали стрессорами чрезмерной силы (абиотическими факторами в летальных дозах): содержанием рыб в ограниченном объеме

грунтовой (крановой) воды со снижающимся содержанием кислорода до 2.5-3 мг/л (Рис. 3, столбики 1), переносом рыб за пределы температурной толерантности, комплексным действием нескольких факторов в предлетальных дозах: температуры, кислорода, адреналина, солености, ограниченного объема воды, приводящего к иммобилизации, механических раздражителей [3 - 5]. Состояние рыб №№ 10-17 (Рис. 2), диагностируемое нами по ионному обмену, как не устойчивое к стрессу, относится также к острому стрессу с летальным исходом. Подострый стресс с летальным исходом продолжительностью от 5 до 20 дней (главным образом, до 2 недель) вызывали достаточно сильными стрессорами, к которым рыба не могла приспособиться: содержанием рыб в маленьких аквариумах (соотношение массы тела и воды 1:10, грунтовая вода), с концентрацией кислорода в воде 5 мг/л и повышающимся содержанием ионов аммония до 80 мг/л (Рис. 3, столбики 2), содержанием рыб в садках, посттравматическими эффектами продолжительного траления и длительного пребывания в сетях, а также жестких условий транспортировки в лабораторию [3 - 5]. Состояние рыб №№ 3-9 (Рис. 2), диагностируемое нами по ионному обмену как среднеустойчивое к стрессу, относится также к подострому стрессу с летальным исходом. Хронический стресс с летальным исходом (продолжительностью 1-4 месяца) вызывался содержанием рыб в лабораторных аквариумах, бассейнах и прудах экспериментальной базы в условиях значительного варьирования температурного, кислородного, солевого, светового режимов [3 - 5], в частности, в аквариумах с повышенным фоном световых и шумовых раздражителей (соотношение массы тела и воды 1:150, 100% насыщение воды кислородом, вода грунтовая) (Рис. 3, столбики 3). Состояние рыб № 1 и отчасти № 2 (Рис. 2), диагностируемое нами по ионному обмену как высокоустойчивое к стрессу, относится также к хроническому стрессу с летальным исходом. В работе анализировали концентрацию ионов натрия, калия и кальция в плазме крови, эритроцитах, скелетных мышцах, переднем мозге и величину поглощения и потерь ионов в воду.

Максимальный ионный дисбаланс по натрию, калию и кальцию наблюдался при остром стрессе с летальным исходом. Отмечены наибольшая гипонатриемия (до 50%) и наибольшая диффузия этих ионов в воду. Потери ионов натрия, калия и кальция из клеток тела, включая мозговые, также достигали самых высоких значений. Гиперкалиемия

была максимальной в первые часы опыта, однако диффузия калия в воду через сутки возрастала в 2-3 раза. Из результатов проведенных исследований очевидно, что гибель рыб при остром стрессе происходит из-за нарушения осмолярности (при осморегуляторном коллапсе) и, как следствие, гибели клеток в жизненно важных органах, например, в мозге. В диагностике состояния острого стресса по ионному обмену основное внимание необходимо уделять величине потерь ионов натрия.

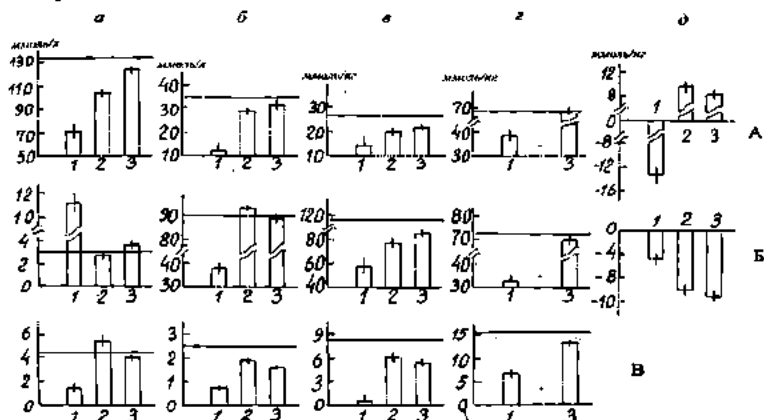


Рис. 3. Концентрация ионов в тканях (а - г) и обмен ионов (д) между организмом и водой у леща при стрессе с легальным исходом. 1 - острый стресс, продолжительность жизни 5-8 ч, 2 - подострый, 10-15 дн., 3 - хронический, 3 мес.; А - натрий, В - калий, В - кальций; а - концентрация ионов перед гибелью в плазме крови, б - в эритроцитах, в - в скелетных мышцах, г - в переднем мозге, д - общее количество потерянных (под чертой) или поглощенных (над чертой) ионов из воды до момента гибели; горизонтальные прямые - концентрация ионов в тканях до стресса. Даны средние \pm ошибки средних.

При летальных формах подострого и хронического стресса можно выделить 4 наиболее значимых отклонения в системе водно-солевого равновесия:

1. Гипонатриемия до 20% при подостром стрессе и до 10% - при хроническом;
2. Снижение содержания калия в мышцах на 30-40% и более;
3. Усиление абсорбции ионов натрия из воды;
4. Общее количество потерянных организмом ионов калия у рыб перед гибелью практически одинаково при подостром и хроническом стрессе в воде различной минерализа-

ции. Однако при хроническом стрессе основные потери ионов происходили непосредственно перед гибелью рыб, а при подостром - на протяжении всего опыта.

Концентрация ионов натрия, калия и кальция в других тканях близка к норме и/или изменяется неоднозначно.

На настоящий момент вопрос о причинах гибели рыб при подостром и хроническом стрессе остается открытым. В литературе [20] встречается мнение, что продолжительность жизни организмов (предел выживания) при хроническом стрессе определяется скоростью деградации белковых макромолекул. Подострый стресс в отечественной литературе в основном представлен токсикологическими опытами, а в иностранной - не выделяется совсем. На наш взгляд, причины гибели рыб при подостром и хроническом стрессе столь же многообразны, что и болезни адаптации, быстро или длительно протекающие (или позже возникающие) и приводящие к необратимым повреждениям жизненно важных органов и тканей. Анализ представленного в работе материала позволяет выделить следующие неблагоприятные изменения в системе водно-солевого равновесия при подостром и хроническом стрессе, лежащие в основе развития болезней адаптации и, в конечном итоге, гибели рыб: 1) удерживание избыточных количеств ионов натрия в организме (вероятно, главным образом, в депо, т.к. усиление абсорбции натрия из воды сопровождается гипонатриемией); 2) выход ионов калия из клеток (и затем из организма). Однако граница между благоприятным и повреждающим действием ионных реакций на организм тонка до чрезвычайности. Проследим переход стресс-синдрома из общего неспецифического звена адаптации в общее неспецифическое звено патогенеза.

Известно [5], что наиболее характерным признаком активной защитной реакции (возникающей на несильные непродолжительные стрессоры, в том числе и в начальную фазу болезни) является гипернатриемия и сопровождающее ее усиление абсорбции натрия из воды. При подостром и хроническом стрессе с летальным исходом усиление абсорбции натрия из воды приводит не к гипернатриемии, как это следовало ожидать, а - к гипонатриемии. Небольшие потери ионов в воду низкой минерализации также не могут быть причиной столь значительной гипонатриемии. Вероятно, ионы натрия переходят в депо, в качестве которого у высших позвоночных служат печень, селезенка, подкожная клетчатка. У представителей осетровых, обитающих в заг-

ряженных районах, содержание натрия в жабрах, печени и почках выше, чем у рыб из более чистых районов [7 - 9]. Хотя в опыте, представленном на Рис. 3, не выявлено повышения концентрации натрия в мышцах у рыб при подостром и хроническом стрессе, однако такое показано в других наших исследованиях у истощенных особей, обитающих в естественных и искусственных условиях, а также у рыб, больных миопатией и азромонозом [5, 7, 19]. Известно также, что в качестве натриевого депо служит соединительная ткань в различных органах. В связи с этим можно предположить возможный механизм развития склерозов. Натрий, задерживаясь во внеклеточной жидкости соединительной ткани, повышает концентрационные градиенты на мембране ее клеток и поэтому создает условия для избыточно анаболических процессов и, следовательно, ее разрастания в ущерб специализированной ткани. Таким образом, положительная адаптивная реакция при стрессе ... удержание натрия во внутренней среде организма с целью сохранения или повышения его энергетики ... превращается в негативную: повышение энергетики соединительной ткани и, следовательно, болезни адаптации и возможную гибель рыб (организма), если склерозы поражают жизненно важные органы. Вероятно, таков же механизм развития цирроза печени в условиях постоянной интоксикации организма.

В нормальных условиях и при действии несильных непродолжительных стрессоров и даже при длительном хроническом стрессе у рыб существуют механизмы пополнения калием организма: за счет активного транспорта этих ионов из воды жабрами ([5], Рис. 2, рыбы 1, 2). Усиление абсорбции калия из воды сопровождается увеличением его концентрации в клетках организма. Однако характер изменения содержания этих ионов в различных тканях при стрессе неодинаков. Например, повышение концентрации калия в мозге и печени при остром стрессе коррелирует с уменьшением ее в скелетных мышцах [3]. Кроме того, в условиях стрессовых нагрузок выход ионов калия из клеток организма может выполнять защитную функцию, способствуя защитному торможению [13]. Этот процесс осуществляется по специальным калиевым каналам и происходит до определенного (критического) уровня, составляющего примерно половину от нормальной концентрации калия в клетках. В противном случае наступает гибель клеток и, как следствие, организма, если потери ионов происходят из жизненно важных органов (тканей). Регистрируемая нами диффузия ионов

калия в воду у рыб, главным образом, определяется выходом их из скелетных мышц - основных депо этих ионов - и, вероятно, обусловлена катаболизмом мышечных белков и высвобождением связанных с ними ионов. Если мышцы дополнительно поражены каким либо заболеванием, то (при миопатии и аэромонозе - Рис. 1, столбики 2, 5) содержание калия в них еще ниже. На фоне больших потерь ионов из скелетных мышц небольшая их добавка, например, из некритизированного участка сердечной мышцы при инфаркте миокарда будет незаметна. Однако величина диффузии ионов калия в воду является важным прижизненным диагностическим показателем состояния рыб. Так общее количество потерянных в воду ионов калия до момента гибели при температуре 17-19°C составляет 7-10 ммоль/кг и уменьшается в более низких температурах до 6 ммоль/л (Рис. 2, 3, [5]).

По динамике общей концентрации ионов кальция в тканях рыб практически невозможно определить благоприятное или повреждающее действие оказывают они на организм. Вероятно, для этих целей необходимо измерять содержание свободных ионов (активную концентрацию). Например, непродолжительная гиперкальциемия наблюдалась в ответ на несильные непродолжительные стрессоры [5], а устойчивая ... при подостром стрессе (Рис. 2), в высоких температурах при хроническом [3 - 5] и у больных миопатией [7-9], но чаще при подостром и хроническом стрессе и при целом ряде заразных заболеваний (Рис.2, [2, 10, 19]) содержание кальция в плазме крови и некоторых других тканях было несколько ниже нормы. Гипокальциемия и потери ионов кальция из многих тканей при остром стрессе [3 - 5] могут сопровождаться переходом их в некоторые другие, например, ткани желудка (Мартемьянов, личное сообщение). У условно здоровых представителей осетровых, обитающих в более загрязненных участках реки, повышено содержание кальция в печени и жабрах по сравнению с рыбами из относительно чистых участков, однако концентрация этого иона в мышцах рыб, больных миопатией, несколько ниже, чем у условно здоровых [7 - 9].

ИОНЫ, БОЛЕЗНИ АДАПТАЦИИ, ФЕНОПТОЗ

Все болезни адаптации можно разделить на 3 группы (возникновение того или иного заболевания определяется внешними и внутренними обуславливающими факторами, т.е. специфической компонентой стрессора и наследственной

предрасположенностью):

1. Болезни, связанные со склеротическими изменениями в тканях (т.е. с разрастанием соединительной ткани и гибелью специализированной). К ним относятся атеросклероз и вызываемые им стенокардия, инфаркты (и другие заболевания сердца), инсульты, а также нефросклероз, цирроз печени и другие. Склерозы встречаются и у рыб, обитающих в загрязненных водах и выращиваемых в неблагоприятных искусственных условиях. В основе старческой инволюции также лежат склеротические изменения в тканях.

2. Воспалительные процессы. Помимо воспалительных реакций, возникающих на грубое повреждение и вторжение конкретных патогенных факторов, существуют так называемые аутоиммунные заболевания, обусловленные реакциями иммунитета, направленными против собственных тканей. К ним относятся ревматизм, ревматоидный артрит, артерииты, нефриты и другие, а у рыб - миопатия [15]. К воспалительным заболеваниям следует отнести также язву желудка и кишечника.

3. Онкологические заболевания (неоплазия). В настоящее время онкозаболевания весьма распространены у рыб, обитающих в экологически неблагоприятных районах. Они рассматриваются в качестве показателя канцерогенности среды.

Обращает на себя внимание, что все три группы болезней адаптации фактически точно соответствуют трем группам общепатологических процессов — воспалению, неоплазии (онкогенезу), старческой инволюции (в основе которой лежат склеротические изменения в тканях) — на которые указывает А.В. Макрушин [11]. Автор приходит к выводу, что в основе общепатологических процессов лежат механизмы адаптации примитивных многоклеточных животных к ухудшению условий среды. Как и древние механизмы адаптации, болезни адаптации (т.е. общепатологические процессы у высших животных) являются плурокаузальными (вызываются самыми разными факторами), возникают, когда повреждающий агент превышает адаптивные возможности организма (другими словами, в условиях энергетической недостаточности — всегда при гипонатриемии). Все они связаны с пролиферацией неспециализированных или малоспециализированных тканей (соединительной и малигнизированной) и разрушением специализированной. Болезни адаптации, направленные на саморазрушение организма, в той или иной степени являются аутоиммунными.

Не является случайным и столь значительное участие в этих болезнях (или в общепатологических процессах) ионов. В организме выделяется 4 способа регуляции функций: нервный, эндокринный, аутокринный и физико-химические факторы околочелюточной среды, главным образом, ионы натрия [16]. Механизмы адаптации примитивных многоклеточных возникли на донервном и доэндокринном уровне регуляции, где в межклеточных и в межтканевых взаимоотношениях ионному и аутокринному, как более древним механизмам регуляции, отводится ведущая роль. Ионы выполняют множество функций в живых системах. Известно, например, что посредством изменений в ионном гомеостазе клетки внешние (неспецифические) стимулы вызывают генетически детерминированные фенотипические перестройки в клетке [12]. Можно предположить, что отклонение ионного состава клетки по типу редукции (происходящее до определенного уровня и в определенных тканях) запускает в геноме программу саморазрушения организма через развитие той или иной болезни адаптации. Непосредственное саморазрушение организма, реализуемое через болезни адаптации, также осуществляется с участием ионов. Неблагоприятное действие на специализированные ткани натрия, как основного иона, определяющего энергетику наружной мембраны животных клеток, заключается в стимуляции пролиферации неспециализированных и малоспециализированных тканей. Гипотетический механизм развития склерозов с участием ионов натрия описан выше. Общеизвестна роль натрия в регенерации различных тканей, включая и соединительную [12]. При воспалении пролиферирует, главным образом, соединительная ткань. Повышено содержание натрия в мышцах, больных миопатией и аэромонозом [7, 19], а также в сердечной мышце при инфаркте миокарда [17 и др]. Несомненно участие ионов натрия и в онкогенезе. Так в клетках малигнизированных тканей выше, чем в здоровых, концентрация этого иона, увеличена проницаемость клеточной мембраны, снижен мембранный потенциал и усилены активные ионо-транспортные процессы. Все эти признаки и обеспечивают нечувствительность (устойчивость) клеток опухоли к внешним воздействиям [12].

При пролиферации клеток в ткани повышается содержание калия - основного внутриклеточного катиона. Однако гибель самых различных организмов, начиная от бактерий и растений и кончая высшими позвоночными животными [12, 13, 17 и др.], сопровождается выходом этих ионов из

клеток. В последнем случае это относится к тканям, пораженным болезнями адаптации, например, при инфаркте миокарда ионы калия покидают сердечную мышцу.

При анализе влияния ионов кальция на процессы жизнедеятельности организма животных необходимо учитывать, как минимум, три обстоятельства: 1) участие этих ионов в уменьшении проницаемости клеточных мембран, 2) разрушительное действие проникающих в клетки ионов кальция, 3) неравномерное перераспределение этих ионов в организме при стрессе. Описана роль кальция в патогенезе инфаркта миокарда, язвы желудка, гипертонии, а также в онкогенезе у высших позвоночных [12,14,17 и др.]. Известно также [6], что при повреждении клеточной мембраны ксенобиотиками ионы кальция устремляются в клетку по неспецифическим каналам и разрушают ее. На явление кальцифилаксии и кальцергии впервые указал еще Г. Селье [17].

На основании выше изложенного последовательность участия ионов в деструктивных процессах может быть представлена следующим образом. Первоочередная (иницирующая) роль в саморазрушении организма, вероятно, принадлежит внеклеточным катионам натрия, которые стимулируют развитие неспециализированных или мало специализированных тканей и тем самым вытесняют (опосредованно разрушают) ткани специализированные. Можно предположить, что ионы кальция наносят "точечный" удар, проникая в клетки специализированных тканей, запрограммированные на гибель, и разрушают их. Внутриклеточным катионам — калию и магнию — в деструктивных явлениях, по-видимому, принадлежит вторичная (пассивная) роль. Покидая клетки специализированных тканей, они завершают процесс их разрушения. Остается лишь удивляться простоте и гениальности Природы, которая для поддержания жизни (энергизации наружной мембраны клеток специализированных тканей) и для саморазрушения организма (путем стимуляции разрастания неспециализированных или малоспециализированных тканей) использовала один и тот же "подручный" материал — ионы натрия, которые примитивные многоклеточные получают непосредственно из морской воды, а рыбы — тоже из воды, но опосредованно через внутреннюю среду организма. Поступление натрия в организм наземных позвоночных животных происходит исключительно через пищеварительный тракт.

Болезни адаптации в настоящее время рассматриваются как механизмы реализации феноптоза - запрограммирован-

ной смерти [18]. Смерть обусловлена не случайными нарушениями сложных систем жизнедеятельности, а включением особого биологического механизма (программы). Природа консервативна и использует для разрушения организма высших животных древнейшие механизмы регрессивного развития, возникшие у примитивных многоклеточных животных в ответ на ухудшение среды обитания. Ионам, как древнейшим механизмам регуляции, в фенотопе, вероятно, принадлежит ведущая роль. Биологический смысл фенотопе заключается в сохранении вида путем устранения ослабленных, истощенных особей, в защите от последствий резких мутаций и, в конечном итоге, в ускорении эволюции.

СПОСОБЫ СОХРАНЕНИЯ ЖИЗНИ РЫБ ПРИ СТРЕССЕ

Из результатов проведенных исследований следует, что необходимо использовать разные способы для поддержания жизнеспособности рыб при остром стрессе, с одной стороны, и подостром и хроническом, с другой. При остром стрессе сохранение жизни рыб, главным образом, заключается в сохранении натрия в организме. У рыб это достигается добавлением ионов натрия и кальция (последних с целью уменьшения проницаемости клеточных мембран и, следовательно, ионных потерь) в воду. Эти процедуры широко используются в рыбоводных хозяйствах и при транспортировке рыб. Космонавты при полетах получают пищу, обогащенную хлоридом натрия. При разработке способов сохранения жизни рыб при сильном остром стрессе необходимо обратить внимание на предупреждение развития высокой гиперкалиемии, из-за которой возможна остановка сердца в диастоле.

При хроническом и подостром стрессе, напротив, требуется выводить натрий из организма. Для этого можно рекомендовать использование различных диуретиков и антиоксидантов, обладающих натрийуретическим действием. Кроме того, из-за возникающего в организме дефицита калия требуется введение этих ионов и/или препаратов, удерживающих калий в организме. К числу наиболее распространенных относятся впервые предложенные еще Г. Селье [17] амилорид и спиронолактон. Судя по нашим предварительным данным [5] и некоторым литературным сведениям [17], изменение концентрации магния в тканях при стрессе, как внутриклеточного катиона, в значительной степени аналогично таковому калия и поэтому в отношении этого иона

можно рекомендовать аналогичные процедуры, т.е. при подостром и хроническом стрессе ... вводящие и/или сберегающие магний в организме. Результаты собственных наблюдений и приведенная выше литературная информация позволяют предположить, что при подостром и хроническом стрессе не лишним будет применение веществ, блокирующих проникновение ионов кальция в клетку (антагонистов). Таким образом, основные способы борьбы с болезнями адаптации в общих чертах могут быть сведены к защите от повреждающего действия внеклеточных катионов (натрия и кальция) и сохранению в организме внутриклеточных катионов (калия и магния). При подостром стрессе указанные мероприятия по сохранению жизни рыб необходимо проводить на 4-5 сутки после начала стрессового воздействия, при хроническом - ближе к концу жизни рыб, т.е. не ранее чем через месяц с начала опыта. Кроме того, в связи со сходством изменений в системе водно-солевого равновесия у рыб в начале острого и подострого стресса [3 - 5], рекомендуется в первые сутки подострого стресса применять такие же процедуры по поддержанию жизни рыб, что и при остром.

Препараты, выводящие натрий, удерживающие калий и магний и блокирующие проникновение ионов кальция в клетки (антагонисты кальция), применяются в медицине при лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы, вызываемых склеротическими изменениями в тканях, а также аутоиммунных болезней и некоторых других, которые мы отнесли к болезням адаптации. Однако подбор этих веществ проведен в большей степени эмпирически, в лучшем случае на основании указанных выше пионерских работ Г. Селье и Ф. Меерсона. До сих пор в медицине основное внимание уделяется изучению специфических изменений, а не общих механизмов адаптации в системе водно-солевого равновесия.

Однако приоритет всегда остается за профилактикой заболеваний. С целью повышения стрессоустойчивости рыб (чтобы вызвать активную защитную реакцию организма) можно рекомендовать применение несильных непродолжительных нагрузок. Например, в рыбоводных хозяйствах можно проводить с рыбами небольшие тренировочные упражнения. Кроме того, в последнее время в рыбоводных хозяйствах для повышения стрессоустойчивости рыб успешно применяется вещество писксин, представляющее ультрамалые концентрации феромона тревоги. Коллективом ростовских физиологов [1] разработана система активационной

терапии для целенаправленного повышения здоровья населения путем применения непродолжительных раздражителей слабой и, главным образом, средней силы. На эффективность этих процедур указывают примеры излечения от различных заболеваний вплоть до рассасывания злокачественных опухолей.

ВЫВОДЫ

1. В начальный период болезней разной этиологии изменения концентрации ионов в тканях рыб направлены в сторону повышения концентрационных градиентов на мембране клеток (гиперкомпенсация), а на поздних стадиях заболеваний — в сторону снижения (редукция), т.е. характер ответной реакции определяется количеством (силой, продолжительностью) болезни, как неблагоприятного фактора.

2. Наиболее значимыми изменениями в системе водно-солевого равновесия у рыб при подостром и хроническом стрессе с летальным исходом являются усиление абсорбции натрия из воды на фоне устойчивой гипонатриемии и потери калия. Предполагается, что эти явления лежат в основе патогенеза болезней адаптации, и как следствие, гибели рыб. В работе также обсуждается возможная роль ионов в механизмах фенотипа и предлагается гипотетический механизм развития склерозов с участием ионов натрия. Причина гибели рыб при остром стрессе — когда наблюдается максимальный ионный дисбаланс — связывается с осморегуляторным коллапсом.

3. Предлагается метод прижизненной диагностики стрессоустойчивости рыб по ионному обмену в ограниченном объеме воды. Разделение устойчивых и неустойчивых к стрессу рыб проводится по величине потерь ионов натрия, а средне- и высокоустойчивых — по скорости потери калия.

4. Основные мероприятия по сохранению жизни рыб при остром стрессе должны быть направлены на удерживание ионов натрия в организме (уменьшение потерь), а при подостром и хроническом — на сохранение ионов калия и выведение натрия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаркави Л.Х., Кеакина Е.В., Кузьменко Т.С. Антистрессорные реакции и активационная терапия. Реакция активации как путь к здоровью через процессы самоорганиза-

ции. М.:ИМЕДИС, 1998. 656с.

2. *Грищенко Л.И.* Микозы, микотоксикозы и альгровые болезни рыб // В кн: Итоги науки и техники. Сер. ихтиология. Т.1. М., 1985. С. 161-189.

3. *Запруднова Р.А.* Изменения поведения и ионной регуляцией у пресноводных рыб при стрессе. // Успех. соврем. биол. 1999. Т. 119. № 3. С. 265-270.

4. *Запруднова Р.А.* Стресс у пресноводных рыб: вопросы ионной регуляции // Проблемы экологии, биологии, экологического образования, химии. Ярославль, 2001. С. 248-250.

5. *Запруднова Р.А.* Обмен и регуляция катионов у пресноводных рыб при стрессе. Автореф. дис.. к.б.н. Борок, 2003. 23с.

6. *Крутецкая З.И., Лебедев О.Е.* Механизмы Ca^{2+} — сигнализации в клетках // Цитология. 2001. Т.43. №1. С. 5-32.

7. *Кузьмина О.Ю.* Содержание электролитов в сыворотке крови и тканях русского осетра с различной степенью расслоения мышц // В кн: Физиолого-биохимический статус Волго-Каспийских осетровых в норме и при расслоении мышечной ткани (кумулятивный политоксикоз). Рыбинск, 1990. С. 240-246.

8. *Кузьмина О.Ю.* Состояние водно-солевого гомеостаза у русского осетра *Acipenser guldenstenstadti* из Волги и Днепра // Материалы междунар. симп. "Экологич. физиолог. и биохим. осетровых" Ярославль, 1997. С.53-55.

9. *Кузьмина О.Ю., Лукьяненко В.И. и др.* Особенности водно-солевого гомеостаза у осетровых при расслоении мышечной ткани // Вопрос. ихтиол. 1992. Т.32. Вып. 4. С. 138-143.

10. *Лиманский В.В., Мартемьянов В.И., Бекина Е.Н., Головина Н.А.* Изменение электролитного состава крови и мышц при заражении карпа *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliata orphryogenidae) // Паразитология. 1984. Т.18. № 6. С. 478-481.

11. *Макрушин А.В.* Природа разрушений в организме, наблюдаемых при воспалении, неоплазии и старческой инволюции // Настоящий сборник

12. *Маленков А.Г.* Ионный гомеостаз и автономное поведение опухоли. М.:Наука. 1976. 171 с.

13. *Мелехов Е.И., Анев В.Н.* О механизмах защитной реакции клетки, сопряженной с выходом из нее K^{+} // Успехи соврем. биол. 1992. Т. 112. С.18-28.

14. *Меерсон Ф.З.* Адаптация к стрессорным ситуациям и стресс-лимитирующие системы организма // Физиология адаптационных процессов. М.: Наука, 1986. С.531-630.

15. Микряков В.Р. Аутоиммунная гипотеза разрушения мышечной ткани осетровых. // Тезис. докл. 1-го конгресс. ихтиолог. Астрахань, 1997 М.: ВНИРО, 1997. С. 231.

16. Наточин Ю.В. Архитектура физиологических функций: тот же фундамент, новые грани // Росс. Физиол. ж. 2002. Т.88. №2. С. 129-143.

17. Селье Г. Некоторые аспекты учения о стрессе // Природа.1970. N.1. С. 34-45.

18. Скулачев В.П Кислород и явление запрограммированной смерти. М.: Наука, 2000.

19. Яржомбек А.А., Лиманский В.В. и др. Электролитный состав карпа при аэромонозе // В кн: Сборник научных трудов. Болезни рыб и водная токсикология. 1984. №40. С. 74-80.

20. Hand S. C., Hardewig J. Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanism and implications // Annu. Rev. Physiol. 1996. V.58. P. 539-563.

21. Hines R.S., Spira D.T. Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* L. 4. Physiological disfunction // J.Fish.Biol. 1974. V.6. №.4. P.365-371.

STRESS AND ILLNESSES: CHANGES IN SYSTEM WATER-SALT BALANCE AT FRESH-WATER FISHES

R.A.Zaprudnova

*I.D.Papanin's Institute for biology of inland waters.RAS,
Borok, Russia*

On the own and literary data the common laws of dynamics of concentration of ions of sodium in blood plasma and potassium in muscles at different kinds of fishes are investigated at pathogenesis of various diseases and dependence of response on a degree of development of illness (or quantities of adverse influence) is revealed. On dynamics of concentration of ions of sodium, potassium and calcium in plasma of blood, erythrocytes, muscles, a brain, and also to an exchange of ions between an organism and water it is investigated a condition of system water-salt balance at fishes at stress with lethal outcome (sharp, sub sharp and chronic), the possible reasons of destruction the fishes connected to change of ionic parameters are analysed. The role of ions in mechanisms of phenoptosis is discussed, the hypothetical mechanism of development of a sclerosis with participation of ions of sodium is offered. Ways of preservation of life of fishes in various stressful conditions with use ionic preparations are described. The method of lifetime diagnostics stress-stability of fishes on an ionic exchange is offered.

ЭНКЕФАЛИНЫ КАК ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА НА ИЗМЕНЕНИЯ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

А.Е. Микулин*, Е.В. Микодина**

*Московский государственный университет технологий
и управления – МГУТУ, 113149, Москва,
ул. Болотниковская, 15.

**Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии – ВНИРО, Москва

На основании собственных и литературных данных обоснована гипотеза о механизме действия энкефалинов и их стабильных аналогов, заключающаяся в их проникновении в клетку в виде лиганд-рецепторного комплекса и далее – в ядро с последующей интеркаляцией в активно работающую часть ДНК, сопровождающуюся фрагментацией одной или обеих ее нитей, ее репарацией и амплификацией. Механизм действия энкефалинов на субклеточном уровне позволяет объяснить: пролонгированность их действия; увеличение количества хромосомных aberrаций и фрагментов ДНК после воздействия энкефалинов; усиление синтеза ДНК, РНК и белка, приводящих к акселерации роста рыб; наследование новых свойств организма по патроклиному пути. Энкефалины, видимо, являются естественными эндогенными факторами мутагенеза организма, вырабатывающимися в ответ на стрессовые воздействия внешней среды, что увеличивает разнокачественность популяции и обеспечивает материалом естественный отбор.

В 80-е годы XX столетия у высших позвоночных был открыт новый класс эндогенных регуляторов их жизнедеятельности – короткие (олиго-) пептиды, в том числе лейцин-энкефалин (лей-энкефалин) и метионин-энкефалин (мет-энкефалин) [83]. Последние называют также опиоидные пептиды, или опиаты. По признаку локализации первых находок олигопептидов в различных структурных элементах нервной системы все короткие регуляторные пептиды также называют нейропептидами.

Последовал интенсивный период исследования функциональной роли нейропептидов [20]. С использованием их синтетических аналогов было установлено, что у беспозвоночных и позвоночных животных, а также человека, они участвуют в регуляции необычайно широкого круга функций – развития [91], размножения [69], адаптации, осмо-

регуляции [86], регенерации [26, 70], обучения [8].

Основные исследования касались анальгетических и психотропных эффектов опиатов. Вместе с тем появились сведения об их иных, неклассических или висцеральных эффектах, которые, как полагали, могли возникать при взаимодействии опиоидных пептидов с периферическими рецепторами в условиях патологии. Например, было установлено, что синтетический аналог лей-энкефалина – даларгин – способствует заживлению дуоденальных язв [67].

В организме рыб (и других животных) существуют эндогенные опиаты, участвующие в регуляции метаболизма, как нам представляется, аналогичным образом. В связи с этим, была поставлена цель - провести анализ причин и результатов регулирующего действия энкефалинов в организме и рассмотреть возможный механизм действия этих веществ на клеточном и популяционном уровнях.

МЕХАНИЗМ ВОЗДЕЙСТВИЯ ДАЛАРГИНА НА СУБКЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ

В связи с тем, что эндогенные энкефалины обладают крайне коротким временем существования в организме, для выявления их эффектов в своих исследованиях мы использовали синтетические стабильные аналоги лей-энкефалина и, в частности, даларгин, который обладает пролонгированным эффектом по сравнению с лей-энкефалином. Так однократное воздействие на рыб даларгином на ранних стадиях эмбриогенеза приводит к сокращению сроков эмбрионального развития, повышению жизнестойкости не только зародышей в процессе развития, но личинок и молоди рыб при их выращивании, а также акселерации их роста [80], ускорению перехода мейоцитов в ооциты в период превителлогенеза [51].

Аминокислотный состав даларгина – Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg. Его молекула имеет два модификационных отличия от лей-энкефалина (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu): глицин во втором положении замещен на D-аланин для снижения протеолитической деструкции пептида, а в шестое положение присоединен аргинин. Ранее предполагалось, что функциональная роль аргинина, как положительно заряженной аминокислоты, заключается в снижении проницаемости даларгина через гематоэнцефалический барьер [67], однако позднее это предположение не подтвердилось [31, 85].

Даларгин, как и эндогенные энкефалины, взаимодейству-

ет с дельта-опиодными рецепторами, хотя обладает также сродством к рецепторам мю-типа. В частности, показано, что как овулировавшие неоплодотворенные яйца, так и развивающиеся эмбрионы рыб имеют как мю-, так и дельта-опиатные рецепторы [29, 84]. Таким образом, возможно прямое связывание опиодных пептидов и их аналогов с клетками различных органов и тканей организма в течение его онтогенеза, а не только опосредованное их влияние на организм через опиодную систему. Следствием прямого связывания является возникновение так называемых неклассических эффектов пептидов [67]. Связывание энкефалинов и их аналогов с опиатными рецепторами осуществляется за счет ОН-группы N-концевого тирозина. Таким образом, учитывая невозможность непосредственного проникновения этих пептидов через липидный слой мембраны клеток, образование даларгином лиганд-рецепторного комплекса является необходимым этапом для проявления его эффекта.

Различия в степени выраженности эффектов в ответ на рецепцию энкефалина и его аналогов не могут быть объяснены только через воздействие на биохимические процессы в клетке вторичными мессенджерами лиганд-рецепторного комплекса [87], поскольку даже взаимодействие рецепторов с антителами вызывает свойственный рецептору ответ в клетке [33, 99]. В связи с этим необходимо рассмотреть вероятность непосредственного проникновения энкефалинов внутрь клетки и дополнительного влияния именно их на клеточный метаболизм.

К настоящему времени накоплено большое количество данных, свидетельствующих о том, что лиганд-рецепторные комплексы проникают внутрь клеток-мишеней, т. е., подвергаются интернализации. В ряде случаев интернализированные лиганды обнаруживаются в эндоплазматическом ретикулуме и даже в ядрах [33].

На примере икринок радужной форели *Parasalmo mkyss irideus* доказано проникновение меченого даларгина из водных растворов внутрь развивающихся яйцеклеток рыб и его локализация в желтке, мембранных структурах и особенно в ядре [42, 95]. Наличие данных о пролонгированных эффектах даларгина, его способности воздействовать на клетки периферических органов и тканей, находящихся, в основном, в состоянии повышенной готовности к пролиферации или в состоянии пролиферации, для которых характерно увеличение дестабилизации хроматина в ядре [55], значительная продолжительность существования эф-

фектов в ряду клеточных поколений после однократного воздействия, влияние даларгина на повышение митотического индекса тканей, усиление включения меченых предшественников в нуклеиновые кислоты [47], изменение содержания в тканях количества ДНК и РНК [34, 48, 72], а также изменение синтеза белка [96], акселерация роста организмов под его действием [40] позволяют предположить возможность прямого взаимодействия даларгина (или продуктов его, или энкефалина деградации) с ДНК. Данные о преимущественной локализации интернализованного даларгина в ядерной фракции развивающихся икринок рыб подтверждают это предположение [42, 44, 95].

Взаимодействие даларгина (или эндогенных энкефалинов) с ДНК, по нашему мнению, может осуществляться благодаря наличию в их молекулах аминокислот тирозина и фенилаланина, за счет циклических группировок которых осуществляется интеркаляция пептида в ДНК. Полярный N-концевой тирозин молекулы даларгина, видимо, взаимодействует с внешней, гидрофильной частью молекулы ДНК. В этом случае характер взаимодействия тирозина с молекулой ДНК может быть сходным с взаимодействием радикала тирозина, например, находящегося в активном центре фермента ДНК-топоизомеразы, где за счет ОН-группировки кольца тирозина происходит разрыв фосфодиэфирной связи между нуклеозидами одной из нитей двойной спирали ДНК с образованием нуклеозид-фосфо-тирозинового комплекса. Такой разрыв способствует раскручиванию двойной спирали ДНК за счет вращения вокруг фосфодиэфирной связи противоположной цепи двойной спирали и предшествует репликации ДНК [1]. Взаимодействие тирозина с фосфодиэфирной связью должно способствовать увеличению гидрофобности пептида и облегчению интеркаляции радикала фенилаланина между основаниями ДНК. Известно, что интеркаляция ароматических аминокислот вызывает дестабилизацию участков ДНК, обогащенных А-Т парами [58].

Единственным результатом взаимодействия энкефалинов с ДНК, по-видимому, является раскручивание участка одной из нитей ее двойной спирали от места взаимодействия пептида с фосфодиэфирной связью. Участки взаимодействия пептида с ДНК, по-видимому, случайны, однако более вероятны в тех локусах, которые не защищены гистонами, т.е. в активно экспрессируемых генах. Следствием такого раскручивания, очевидно, является комплементарное дестраивание, как оставшейся второй основной нити ДНК, так

и отошедшего от нее раскрученного участка. Таким образом, видимо, вследствие своего взаимодействия с ДНК даларгин участвует в инициации процесса добавочной аномальной репликации ее отдельных участков, подвергшихся раскручиванию под воздействием пептида. Такая достройка не позволяет сразу восстановить исходный разрыв оставшейся цепи двойной спирали за счет образования добавочного фрагмента. Возможность протекания такого процесса подтверждается данными об увеличении включения в ДНК меченого тимидина под действием даларгина в процессе эмбрионально-личиночного развития рыб [47], а также увеличение под действием лей-энкефалина и даларгина ДНК-полимеразной активности [54].

При одновременном попадании даларгина в близкие участки обеих цепей двойной спирали ДНК возможен ее разрыв с образованием микрохромосом, фрагментов хромосом и их спутников различной величины. Это предположение было подтверждено экспериментально [6, 7].

Наши данные показали [44], что под действием даларгина значительно увеличивается количество ядрышек в ооцитах рыб. Поскольку ядрышки в ооцитах рыб и некоторых других животных содержат ДНК, комплементарную рибосомной РНК [55], увеличение их числа после воздействия на самок даларгинном может указывать на усиление амплификации рДНК под действием опиатов.

Мы полагаем, что при случайном распределении опиатов по экспрессируемым участкам ДНК и взаимодействии с ними, несомненно, основную роль в амплификации опиаты будут играть в участках, ответственных за производство рибосом в силу их множественности, составляющей от нескольких сот до нескольких тысяч последовательностей. В конечном счете, это выражается в усилении синтеза белка и увеличении темпа роста. Учитывая, что данные эффекты даларгина вызывает не только при воздействии им на ранних стадиях эмбриогенеза, но и их личинок, можно полагать, что опиаты вызывают амплификацию рДНК не только в генеративных, но и в соматических клетках.

Таким образом, суммируя вышесказанное, мы выдвигаем концепцию о роли энкефалинов как регуляторов генной экспрессии, осуществляемой через непосредственное их взаимодействие с информационными макромолекулами. К настоящему времени наши предположения подтверждены экспериментально и многие исследователи соглашаются, что один из путей передачи сигнала от нейропептидов в клетку

осуществляется через ее геном [9].

АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ ДАЛАРГИНА НА УРОВНЕ ОРГАНИЗМА С ПОЗИЦИЙ МЕХАНИЗМА ЕГО ДЕЙСТВИЯ

Рассмотрим возможные варианты объяснения полученных экспериментальных данных по влиянию на развивающийся организм даларгина с позиций выдвигаемого механизма его действия.

Эффект акселерации. Влияние даларгина на ускорение темпа роста рыб с позиций этого механизма может быть объяснено двумя причинами. Во-первых, взаимодействие даларгина с ДНК приводит к усилению процессов транскрипции, репликации или амплификации, приводя к экспрессии определенных генов, увеличению активности соответствующих ферментов и, в конечном счете, сдвигу метаболизма клетки и всего организма. Во-вторых, учитывая, что свыше 70% производимой клеткой РНК составляет рибосомальная [1, 2, 55, 56], а также обнаружение нами увеличения количества ядрышек в ядрах клеток рыб после воздействия энкефалинов, предложенный механизм позволяет объяснить роль опиоидных пептидов в процессах роста, созревания, повышения выживаемости, а также усиления регенерации клеток и иных процессах, полученных нами и отмеченных в литературе, и связанных с усилением синтетической активности клеток за счет повышенного производства клеткой рибосом. Тем более что, по мнению Л.И. Корочкина [32], амплификация свойственна только рибосомальной ДНК.

Оптimum концентрации действия даларгина. Optimum действующей на организм концентрации даларгина зависит от ряда факторов: 1) концентрации пептида в ядре; 2) состояния ДНК; 3) проницаемости структур для пептида. Несомненно, что при низких концентрациях даларгина в ядре его эффекты будут незначительными из-за малой вероятности встраивания даларгина в ДНК. Однако и более высокие концентрации относительно оптимальной также снижают эффективность действия даларгина, поскольку при его влиянии на ДНК будут «вырезаться» участки нуклеотидной последовательности меньшие, чем необходимо для считывания с них информации. Так нами показано, что при воздействии на икру полосатого окуня или американского лаврака *Morone saxatilis* даларгина концентрацией в

25 раз большей, чем использовалась при усилении роста лососевых рыб, рост молоди лаврака угнетается [46].

На данный момент не совсем ясно, имеет ли значение для осуществления эффекта пептида такие особенности, как состояние ДНК на момент взаимодействия с даларгином: находится ли ДНК в расплетенном состоянии или в нерабочем, в виде комплекса с гистонами, и может ли в последнем случае даларгин взаимодействовать с ДНК. Как показали эксперименты на лососях [42, 52], пептиды влияют на различные стороны эмбрионального развития как при воздействии на этапе набухания икры, так и на личинок, т.е. независимо от степени расплетенности ДНК. Однако степень выраженности эффектов при воздействии на разных стадиях развития различается, что указывает на существенную роль состояния ДНК. В связи с этим различия в эффективности влияния опиатов на различные стороны эмбрионального и постэмбрионального развития разных видов рыб обусловлены, видимо, в большей степени различиями проникновения пептида в организм и, в первую очередь, у пресноводных и морских рыб. Так эффективность действия даларгина на икринки анадромных рыб связана с большей проницаемостью для него их яйцевых оболочек, а меньшая эффективность на икре морских рыб (*Sparus auratus*, *Morone saxatilis*) - с затрудненностью попадания пептида в их яйцеклетки в связи с образованием перивителлинового пространства за счет воды желтка, а не внешней среды.

Влияние даларгина на биохимические показатели рыб. Взаимодействие опиоидного пептида с ДНК с последующей амплификацией и репликацией амплифицированных из ДНК нуклеотидных последовательностей объясняет наблюдаемое после воздействия даларгина резкое увеличение производства в клетке ДНК и РНК и изменения в биохимическом составе организма рыб.

Отдаленность эффектов воздействия даларгина. Учитывая подверженность лей-энкефалина и его аналогов воздействию аминопептидаз, приводящей к деградации даже такого устойчивого к разрушению аналога как даларгин за 84 мин [27, 28], малый срок жизни пептид-рецепторного комплекса и кратковременность действия пострецепторных посредников, выдвигаемый нами механизм прямого взаимодействия опиоидного пептида с ДНК является единственным возможным объяснением продолжительного, в течение нескольких лет, проявления эффектов однократного воздействия пептида.

Нарушения в генетическом аппарате. Выдвигаемая гипотеза о прямом взаимодействии опиоидных пептидов с ДНК, приводящем к разрыву нуклеотидной цепи, с последующей амплификацией удаленного участка ДНК, дает объяснение наблюдаемым хромосомным нарушениям генетического аппарата обработанных этими пептидами организмов, выражающихся в увеличении доли клеток с хромосомными аберрациями, в том числе фрагментами, спутниками, гэпами, разрывами хромосомом и иными нарушениями.

Наследуемость эффектов даларгина. Предполагаемый механизм действия опиоидных пептидов на хромосомный аппарат клетки позволяет объяснить наблюдаемый эффект наследования проявлений воздействия пептида, обусловленный передачей по наследству измененного генетического аппарата.

Таким образом, выдвигаемая гипотеза механизма действия опиатов путем прямого взаимодействия пептида с ДНК позволяет объяснить весь круг полученных результатов, не прибегая к помощи иных допущений и предположений.

РОЛЬ ЭНКЕФАЛИНОВ В АДАПТИВНОМ ОТВЕТЕ НА ИЗМЕНЕНИЯ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные свидетельствуют о том, что естественное мутирование обусловлено целым рядом эндогенных факторов, в частности некоторыми метаболитами [63], и экзогенных воздействий, среди которых в первую очередь рассматривают такие мутагенные факторы среды, как естественный фон радиоактивности, температуру и различные химические соединения, в основном антропогенного происхождения [23, 88, 89].

Радиационное излучение, преимущественно являющееся результатом человеческой деятельности, считается мощным фактором искусственного мутагенеза [64, 79]. Следует подчеркнуть, что эффекты, проявляющиеся на организменном уровне при воздействии на него слабых доз радиации, в значительной степени аналогичны воздействиям на организм энкефалинов. В обоих случаях эти воздействия проявляются в усиленном росте организма, что указывает на общность процессов [43]. Так Веландер [101], отмечая небольшое увеличение длины эмбрионов радужной форели по сравнению с их длиной в контроле при дозе 25 Р, считал это проявлением стимулирующего действия радиации. Об-

наружено [61], что мальки карповых рыб, получившие дозу 50 Р летом, к осени обгоняли по массе тела контрольных рыб на 25%. Г.М. Персовым [59] было показано, что при облучении зародышей горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* малыми дозами (350 Р), когда в их гонадах присутствовали либо только первичные половые клетки, либо преобладали гонии, количество ооцитов в гонадах увеличивалось. Это наблюдение было подтверждено в экспериментах на мозамбикской тилапии *Sarotherodon mossambicus*, когда также было установлено, что малые дозы радиации могут вызвать у этого вида рыб как увеличение, так и уменьшение индивидуальной плодовитости [71]. "Направление" эффекта зависело от исходного состояния половых клеток. Если у рыбы идет закладка половых желез, и в них присутствуют только первичные половые клетки, плодовитость возрастает. Облучение тилапии малыми дозами может приводить к более интенсивному росту. Это наблюдается тогда, когда облучение проводится на стадиях, приводящих к снижению плодовитости. Изменение темпа роста рыб в этом случае связывается с изменением темпа развития и функционального состояния половых желез [71]. Энкефалины также изменяют темп формирования гонад и развития половых клеток у рыб. На завершающих этапах созревания наблюдается ускорение и синхронизация нереста и увеличение продукционных характеристик производителей [51, 97].

В качестве мишени, ответственной за реакцию клетки на лучевое воздействие, многие авторы рассматривают ДНК. Учитывая, что вероятность воздействия жесткого излучения на крупные атомы с большим числом электронных орбиталей (фосфор в составе фосфодиэфирных связей ДНК) выше, чем на более мелкие (азот, углерод, кислород и водород), мы полагаем, что жесткое излучение осуществляет разрыв в ДНК именно фосфодиэфирных связей. Экспериментальные данные [76] по воздействию малых доз гамма-облучения на структуру хроматина указывают на увеличение количества олигонуклеосомных фрагментов одноцепочечной ДНК, сопровождающееся увеличением содержания лей-энкефалина и бета-эндорфина в головном мозге и плазме крови животных. Таким образом, и энкефалины, и жесткое излучение, по-видимому, осуществляют воздействие преимущественно на рибосомальные участки ДНК, как наиболее представленные в активной части хроматид, амплифицируя их и приводя к повышению синтеза белка через увеличение числа рибосом. Предположение о возрастании

количества рибосом под действием радиации подтверждается данными об увеличении включения меченых аминокислот в белки животных при облучении гамма-лучами [24, 39]. При этом слабые дозы облучения и низкие концентрации энкефалинов приводят к вырезанию значительных участков ДНК без повреждения находящейся в них информации. Высокие дозы облучения и высокие концентрации энкефалинов способствуют вырезанию большого количества мелких участков ДНК, размеры которых могут оказаться недостаточными для сохранения в них информации. Такой процесс может приводить к летальному исходу организма [35, 68].

Таким образом, влияние радиации антропогенного происхождения на мутационный процесс не вызывает сомнений. Однако давно стало ясно, что естественному фону радиации в спонтанном мутационном процессе принадлежит не первостепенная роль и его наличие не объясняет наблюдаемого уровня спонтанной мутабельности [82].

Другими физическими факторами естественного мутационного процесса являются гипо- и гипертермия [4, 25, 90, 98], магнитные и электрические поля, радиоволновые излучения [60, 92, 93]. Однако и эти факторы не объясняют естественного уровня мутационного процесса в клетках.

В качестве химических мутагенных факторов рассматриваются, как правило, вещества антропогенного происхождения - инсектициды, гербициды, дефолианты и другие пестициды [30], тяжелые металлы - кадмий, хром, свинец, марганец, ртуть [11, 62], компоненты полимерного производства [100], лекарственные препараты - сульфамиды, иммунодепрессанты, противосудорожные препараты, цитостатики и другие [3, 12]. Однако указанные мутагены, в силу их антропогенного происхождения, едва ли имеют большое значение в эволюционных процессах.

Роль естественных мутагенов в изменении наследственности и в эволюционном процессе общеизвестна. Например, колхицин и родственные ему вещества (колцемид, аценафтен) вызывают мутации на уровне генома - полиплоидию, результатом которой является гетерозис.

В проблеме биологических факторов мутагенеза, несомненно, заслуживает внимание значение стрессовых состояний, однако непосредственно механизм влияния стресса на мутационный процесс к настоящему времени изучен недостаточно. Мы считаем, что именно изменения метаболических (внутренних) процессов в организме, вызванные стрес-

сом, являются наиболее важными для понимания роли факторов внешней среды в изменчивости вида.

Многочисленными исследованиями установлено, что опиоидные пептиды вовлечены в процессы коррекции антистрессовых реакций. По мнению ряда авторов [14, 73], пептидоэргические структуры в центральной нервной системе (ЦНС) и непосредственно энкефалины участвуют в реакции организма при адаптации к действию различных факторов среды, обеспечивая более длительную мобилизацию приспособительных механизмов. Их активация, как правило, влечет за собой повышение активности ряда желез внутренней секреции, оказывающей продолжительное влияние на обмен веществ в организме. Показано, что в ответ на воздействии различных стрессовых факторов резко возрастает синтез и выброс опиоидных пептидов: содержание бета-эндорфина увеличивается в несколько раз [73], гамма-эндорфина – на 50-115% [22], мет-энкефалина – на 30%, лей-энкефалина – на 11 % [5]. Среди синтетических дериватов лей-энкефалина наибольшей антистрессовой активностью обладают аргининсодержащие лево- и правовращающие гексапептидные аналоги [36]. Опиоиды, обладая анальгетическим [31], иммунорегуляторным [10, 15], регенеративным [78, 81], гипотензивным [75] свойствами, также изменяют уровень веществ, обеспечивающих антистрессовые реакции: адено-кортикотропного гормона (АКТГ), кортизола, гормонов гипофизарно-тиреоидного комплекса в крови и содержание циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в тканях надпочечников и тимуса. Таким образом, опиоидные пептиды [8, 13, 16], а также их синтетические аналоги [17, 37] участвуют в предотвращении развития отрицательных симптомов стресса. В условиях экспериментальной адаптации к различным экстремальным воздействиям также наблюдается быстрое высвобождение опиоидных пептидов из пулов головного и спинного мозга и гипофиза. Эндорфиноэргические системы реагируют и на условия хронического действия стрессорных факторов [73]. Таким образом, вырабатываемые при стрессе энкефалины вызывают целый комплекс ответных антистрессовых реакций.

Учитывая наши данные о непосредственном взаимодействии опиоидных пептидов с ДНК [44], мы считаем, что энкефалины являются естественными эндогенными факторами мутагенеза организма, действующими в ответ на стрессовые воздействия факторов внешней среды. Одним из проявлений воздействия энкефалинов является увеличение раз-

нокачества организмов, в том числе и в потомстве, что характерно для веществ и физических факторов с мутагенными свойствами.

В настоящее время содержащуюся в клетках ДНК подразделяют на облигатную, входящую в состав хромосом ядра, и факультативную — совокупность ДНК и РНК носителей, которые от особи к особи варьируют в числе, составе и локализации. Их доля от общего содержания ДНК составляет у разных видов от 30 до 90%. Факультативная ДНК ядра включает: фракции высокоповторяющейся и умеренной ДНК, мобильные элементы генома, В-хромосомы, эндогенные вирусы, псевдогены и гены-сироты. В факультативную ДНК цитоплазмы входят амплифицированные локусы и области хромосом, разного рода кольцевые ДНК, плазмиды, цитоплазматические вирусы, а также ДНК митохондрий. Считается, что наиболее мощным источником наследственных изменений в ответ на воздействие среды является именно факультативная ДНК. При этом она пополняется за счет амплификации или рекомбинации облигатной ДНК [21].

Увеличение разнокачественности потомства является важным и необходимым материалом для направленного отбора в изменяющихся условиях внешней среды. Любой вид, являющийся частью фаунистического комплекса, как правило, на протяжении его существования подвержен стабилизирующему отбору, приводящему к уменьшению разнокачественности. Одними из механизмов поддержания разнокачественности потомства являются кроссинговер в процессе мейоза, а также процесс слияния мужского и женского геномов при образовании зиготы. При изменении условий среды необходимы иные механизмы, усиливающие разнокачественность потомства. Мы полагаем, что именно энкефалины, выполняя функцию эндогенных мутагенов, приводят к увеличению разнокачественности потомства в ответ на изменение условий среды, что является адаптивным приспособлением к этим изменениям и способствует видообразованию в условиях направленного отбора.

Энкефалины усиливают рост рыб [40, 41, 42, 43, 44, 52, 53] и повышают выживаемость их зародышей, личинок и молоди [65, 66, 94, 95]. Ускорение роста имеет приспособительное значение и способствует выходу из под пресса более многочисленного мелкого хищника. Ускоренный рост приводит к более раннему созреванию, замедлению роста с переводом основных энергетических потоков на генератив-

ный рост, увеличению популяционной плодовитости и является, в конечном счете, компенсаторным в ответ на увеличение естественной смертности [57]. Таким образом, усиление роста под действием энкефалинов также носит адаптивный характер в изменяющихся условиях среды.

Ускорение созревания, сокращение промежутков между нерестами (мозамбикская тилапия) [66, 77], повышение выживаемости потомства [52], усиление спермиации самцов [50] также являются приспособительными факторами к повышению численности в условиях возрастания смертности при резком изменении условий существования.

Как показано ранее [41, 49], наблюдаемые эффекты воздействия даларгина могут быть объяснены только с позиций прямого воздействия энкефалинов на молекулы ДНК, приводящего к амплификации ее отдельных последовательностей. Однако остается вопрос, в любой ли части ДНК может осуществляться этот процесс или есть предпочтительные участки для такого взаимодействия? Имеющиеся на этот счет литературные и собственные данные указывают, что в раннем онтогенезе, в процессе которого происходит рост организма, и активно умножаются наиболее представленные в ДНК рибосомальные участки, именно они активируются даларгином, приводя к ускорению роста. Одновременно с этим увеличение количества энкефалинов в организме влияет непосредственно на структуру хромосом, приводя к увеличению частоты хромосомных aberrаций, образованию фрагментов, спутников [6, 7], что в соответствии со сформулированным нами механизмом указывает на амплификацию экспрессируемых участков ДНК и на возможность рекомбинации в ней этих участков. На это указывают факты о высокой тропности энкефалинов, в частности даларгина, к активно пролиферирующим структурам: усилении процессов регенерации [78], рубцевания язв желудочно-кишечного тракта [67], то есть влиянии не на все клетки, а находящиеся в активном состоянии.

Наши данные о влиянии даларгина на самок рыб, имеющих гонады на разных стадиях зрелости, показали, что это воздействие проявляется в период трофоплазматического роста ооцитов и выражается в ускорении этого периода [45, 51, 97], и, следовательно, в усилении деятельности генов, ответственных за синтез желточных белков.

В современной литературе существуют сведения о передаче по наследству приобретенных признаков и ее механизме [74]. Однако, как усиление производства белка за счет уве-

личения количества рибосом, вызванных взаимодействием опиатов с ДНК, так и возможная амплификация генов, ответственных за антистрессовую регуляцию, увеличат выживаемость той части рыб популяции, которые обладают наиболее выраженным комплексом антистрессовых приспособлений. Несомненно, что изменения в ДНК, возникающие в соматических клетках в ответ на стрессовые воздействия, не могут быть переданы в половые клетки той же особи из-за отсутствия в природе соответствующего механизма. Более того, аналогичные изменения в ДНК при воздействии опиатов не могут возникнуть в половых клетках в соответствующих экспрессируемых участках их ДНК из-за нахождения хромосом половых клеток в неактивной форме. Учитывая, что генетический код исходно идентичен как в половых клетках, так и в соматических, влияние энкефалинов обеспечит выживаемость той части популяции, генетическая информация которых содержит в более явной форме признаки реализации антистрессовых реакций.

Таким образом, роль энкефалинов в эволюционном процессе - это усиление приспособительных реакций организма на стрессовые воздействия факторов внешней среды, выражающиеся в увеличении выживаемости и повышении популяционной плодовитости той части популяции, которая наиболее приспособлена к данным факторам среды. Т. е., энкефалины способствуют ускорению процесса отбора благоприятных признаков, одновременно усиливая разнокачественность потомства и обеспечивая материалом дальнейший отбор.

Следует отметить, что в естественных условиях при воздействии энкефалинов непосредственно на половые клетки, в частности на ооциты, а в экспериментальных условиях - даларгина на яйцеклетки или личинок до завершения процессов дифференциации их первичнополовых клеток, нами обнаружена возможность передачи по наследству такого признака, как ускорение роста [44]. Учитывая данные о наследуемости эффектов, вызванных энкефалинами, а также участия опиоидных пептидов в целом комплексе ответных антистрессовых реакций, мы считаем, что именно энкефалины обеспечивают наследуемость адаптивных реакций, возникших в ответ на изменение внешних факторов среды. При этом наследование эффектов воздействия энкефалинами осуществляется через наследственный аппарат самцов, т. е. по патроклинному пути [44]. Наследование по материнской линии привело бы к увеличению размеров ооцитов

и уменьшению популяционной плодовитости, что снизило бы эффективность эволюционного отбора наследуемого признака. Патроклиный механизм наследования благоприобретенных признаков, на наш взгляд, имеет приспособительное значение. Известна повышенная смертность особей мужского пола от всех вредных факторов среды, наблюдаемая как у человека и животных, в том числе и рыб, так и у растений [38]. В то же время увеличение плотности популяции, приводящей к ухудшению кормовой базы, приводит к увеличению в ней доли самцов [57]. По мнению В.А. Геодакяна [18, 19], сама половая дифференциация в популяции представляет собой специализацию на выполнение задач наследственности и изменчивости. При этом самки в популяции осуществляют, в основном, консервативную функцию (наследственность), а самцы – оперативную (изменчивость). Чем больше в популяции самок, тем лучше сохраняется генетическая структура популяции и, наоборот, чем больше самцов, тем легче происходят генетические изменения в популяции. Таким образом, соотношение полов является важным параметром разделяющей популяции, определяющим пластичность вида.

Не умаляя значения современных представлений о механизмах передачи наследственной информации, роли популяционной генетики, а также стабилизирующего и направленного естественного отбора в процессах видообразования, высказанные нами предположения о механизме действия энкефалинов позволяют более глубоко понять процессы влияния факторов внешней среды на формирование вида. Эти представления о роли энкефалинов в животном мире позволяют объединить два взгляда на эволюционное становление вида в единую теорию. Высказанные предположения о роли энкефалинов в адаптивном преобразовании генетического аппарата организма в ответ на стресс согласуются с современными биохимическими данными.

ВЫВОДЫ

1. На основании собственных и литературных данных обоснована гипотеза о механизме действия энкефалинов и их стабильных аналогов, заключающаяся в их проникновении в клетку в виде лиганд-рецепторного комплекса и далее – в ядро с последующей интеркаляцией в активно работающую часть ДНК, сопровождающуюся фрагментацией одной или обеих ее нитей, ее репарацией и амплификацией.

2. Функционально важными аминокислотами в составе энкефалинов являются тирозин и фенилаланин, циклические структуры которых ответственны за реализацию биологического эффекта этих пептидов.

3. Механизм действия энкефалинов на субклеточном уровне позволяет объяснить: пролонгированность их действия; увеличение количества хромосомных aberrаций и фрагментов ДНК после воздействия энкефалинов; усиление синтеза ДНК, РНК и белка, приводящих к акселерации роста рыб; наследование новых свойств организма по патроклининому пути.

4. Энкефалины являются естественными эндогенными факторами мутагенеза организма, вырабатываемыми в ответ на стрессовые воздействия внешней среды, что увеличивает разнокачественность популяции и обеспечивает материалом естественный отбор.

5. Энкефалины приводят к амплификации активно работающих генов в момент воздействия стрессовых факторов, что усиливает приспособляемость организма к изменяющимся условиям среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. М.: Мир. 1986. Т. 2. 313 с.

2. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. Т. 4. М.: Мир. 1987. 197 с

3. Алекперов У.К. Антимутагенез. М.: Наука, 1984. 100 с.

4. Александров В.А. Репарация теплового повреждения клеток // Проблемы экспериментальной биологии. М.: Наука, 1977. С. 257-268.

5. Аргинтаев Е.С. Функциональное состояние опиоидной системы кальцийрегулирующих желез при стрессе // Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии. Томск: СО ВКНЦ, 1985. С. 29-30.

6. Арефьев В.А., Микодина Е.В. Нарушения метафазных хромосомных наборов стальноголового лосося после воздействия олигопептида даларгина // Генетика. 1989. Т. 25. № 11. С. 2083-2089.

7. Арефьев В.А., Микодина Е.В., Душкина Л.А. Стальноголовый лосось (радужная форель) как возможный тест-объект для цитогенетического мониторинга в аквакультуре // Рыб-

ное хозяйство, сер. Аквакультура. Информ. пакет ВНИ-ЭРХ. 1996. Вып. 1. С. 15-35.

8. *Ашмарин И.П.* Перспективы практического применения и некоторых фундаментальных исследований малых регуляторных пептидов // Вопросы мед. химии. 1984. Т.30. Вып.3. С.2-7.

9. *Ашмарин И.П., Каразеева Е.П.* Нейропептиды // Нейрохимия (ред. Ашмарин И.П., Стукалова П.В.). М.: изд-во ин-та биомедицинской химии РАМН. 1996. С.296-333.

10. *Вальдман А.В., Козловская М.М., Арефолов В.А.* Нейрохимический и поведенческий анализ эффекта пептидов в регуляции адаптивных процессов // Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии. Томск: СО ВКНЦ. 1985. С. 36-37.

11. *Ведерникова Н.Н., Майский А.И.* Опиаты и эндогенные морфиноподобные пептиды: системный подход к оценке их роли в интеграции нервной и эндокринной регуляции в организме // Успехи совр. биол. 1981. Т. 91. Вып. 3. С. 380-392.

12. *Виноградов В.А., Васильева Е.В., Насонов Е.Л., Титов М.И., Мазнева Л.М.* Модуляция пролиферативного ответа лимфоцитов новым аналогом энкефалинов - даларгином // Терапевт. архив. 1984. Т. 56. № 11. С. 144-146.

13. *Гайгер Р.* Химия регуляции нейропептидами // Эндорфины. М.: Мир. 1981. С. 35-42.

14. *Галкин В.И., Павленко Л.В.* Влияние аналогов энкефалинов на устойчивость животных к гипоксической гипоксии // Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии. Томск: СО ВКНЦ. 1985. С. 41-42.

15. *Геодакян В.А.* Роль полов в передаче и преобразовании генетической информации // Проблемы передачи информации. 1965. Т.1. № 1. С. 214-225.

16. *Геодакян В. А., Кособутский В.И.* Регуляция соотношения полов у рыб механизмом обратной связи // Генетика, селекция и гибридизация рыб. 1969. С. 128-138.

17. *Голиков С.Н., Долго-Сабуров В.Б., Елаев Н.Р., Кулешов В.И.* Холинэргическая регуляция биохимических систем клеток. М.: Медицина. 1985. 220 с.

18. *Голубовский М.Д.* Роль факультативных элементов генотипа в изменчивости и эволюции // Тез. докл. V Всесоюзн. симп. «Молекулярные механизмы генетических процессов». М.: Наука. 1983. С. 64.

19. *Дмитриева О.Ф.* Определение концентрации альфа- и гамма эндорфинов в крови здоровых доноров и влияние физической нагрузки на уровень гамма-эндорфина // Ней-

ропептиды: их роль в физиологии и патологии. Томск: СО ВКНЦ, 1985. С. 51-52.

20. *Дубинин Н.П.* Об основных факторах естественного мутационного процесса // Ботан. журн. 1958. Т. 43. № 8. С. 1093-1107.

21. *Животовский Б.Д.* Пострадиационная индукция синтеза белков и ее значение в реализации программы интерфазной гибели лимфоидных клеток // Тез. докл. 1-й междунар. конф. "Биологические и радиоэкологические аспекты последствий аварии на Чернобыльской атомной станции", 1990. Ч. 1. М. С. 194.

22. *Засухина Г.Д.* Репаративные механизмы клеток и проблемы окружающей среды. М.: Наука. 1979. 183 с.

23. *Ильинский О.Б., Спевак С.Е., Шехтер А.Б.* Новый пептид активатор репаративной регенерации тканей // Фармакология и токсикология. 1987. Т. 50. № 4. С.64-66.

24. *Исакова О.Л., Бушуев В.Н., Пекелис Б.Л., Беспалова Ж.Д.* Исследование методом ¹H-ЯМР спектроскопии устойчивости к действию сывороточных протеаз ряда аналогов даларгина // Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии. Томск: СО ВКНЦ, 1985. С.12-13.

25. *Исакова О.Л., Сепетов Н.Ф., Беспалова Ж.Д., Бушуев В.Н., Виноградов В.А., Рууге Э.К., Титов М.И.* Исследование деградации пептидов в сыворотке крови методом ¹H-ЯМР // Биоорганическая химия. 1986. Т.12. №.1. С.106-111.

26. *Калюжный А.Е.* Исследование морфогенетической активности опиоидных соединений // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: ИБР РАН, 1987. 23 с.

27. *Кириллова Г.А., Тихонович И.А., Фадеева Т.С.* Генетические эффекты пестицидов // Успехи современной генетики. Т. 10. М.: Наука. 1982. С. 161-183.

28. *Коробов Н.В.* Опиоидные свойства даларгина и его фрагментов // Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии. Томск: СО ВКНЦ, 1985. С.73-74.

29. *Корочкин Л.И.* Взаимодействие генов в развитии. М.: Наука. 1977. 280 с.

30. *Кусень С.И., Стойка Р.С.* Молекулярные механизмы действия полипептидных факторов роста. М.: Наука. 1985. 236 с.

31. *Лаптева Т.И., Микодина Е.В., Фомина Г.И., Филиппович Ю.Б.* Влияние синтетического аналога лей-энкефалина даларгина на содержание нуклеиновых кислот и белка в мышцах радужной форели // Бюллетень эксперименталь-

ной биологии и медицины. 1989. № 4. С. 473-475.

32. *Ле С.Т., Граевский Э.Я.* О корреляции содержания сульфгидрильных групп в кровяной ткани и радиочувствительности мышц различных линий в постнатальном развитии // Докл. АН СССР. 1968. Т. 182. № 4. С. 965-967.

33. *Лишманов Ю.Б., Братцев Н.Ф., Ламбина С.А.* Опиоидные пептиды и стресс // Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии. Томск: СО ВКНЦ. 1985. С. 92-93.

34. *Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Тугтов М.И.* О механизме антистрессорного действия Д-ала, лей, арг –энкефалина // Бюлл. exper. биол. и мед. 1985. Т. 100. № 9. С. 268-270.

35. *Лэк Д.* Численность животных и ее регуляция в природе. М.: ИЛ. 1957. 403 с.

36. *Маринова Ц.И., Георгиева Р.Т., Пантев Т.П.* Изменение белкового синтеза лейкоцитов периферической крови *in vivo* и *in vitro* после облучения гамма-лучами // Тез. докл. 1 междунар. конф. “Биологические и радиоэкологические аспекты последствий аварии на Чернобыльской атомной станции”. 1990. Ч. 1. М. С. 188.

37. *Микодина Е.В.* О стимуляции даларгином некоторых физиологических процессов у карпа // Тр. ВНИРО “Вопросы физиологии морских и проходных рыб”. 1987. С. 80-86.

38. *Микодина Е.В.* Некоторые сведения о даларгине – синтетическом суперактивном аналоге лей-энкефалина, предложенного для интенсификации рыбоводного процесса // Тр. ВНИРО «Водная токсикология и оптимизация биопродукционных процессов». М.: ВНИРО. 1988. С. 121-130.

39. *Микодина Е.В.* Интенсификация форелеводства. Опыт и физиологические основы внедрения малых регуляторных пептидов // Рыбное хозяйство. Серия “Аквакультура”, информ. пакет ВНИЭРХ. 1995. Вып. 1. С. 1-20.

40. *Микодина Е.В.* Биологические основы и методы управления функциями в раннем онтогенезе рыб // В кн. “Биологические основы марикультуры”. М.: ВНИРО. 1998. С. 178-205.

41. *Микодина Е.В.* Физиолого-биохимические основы регуляции функций у рыб пептидами энкефалинового ряда. Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. М.: ВНИРО. 1999. 49 с.

42. *Микодина Е.В.* Исследование воздействия новых структурных аналогов даларгина на икринки африканского сомика *Clarias Clarias gariepinus* (Clariidae) *Clarias gariepinus* (Clariidae) *Clarias gariepinus* (Clariidae) *gariepinus* (Clariidae) // Вопр. ихтиологии. 1999. Т. 39. № 5. С. 701-707.

43. Микодина Е.В., Глубоков А.И., Вудс К.Л. Влияние синтетического пептида даларгина на ранний онтогенез рыб различных систематических групп // Возрастная и экологическая физиология рыб. Тез. докл. Всеросс. симп. Борок. 1998. С. 67.

44. Микодина Е.В., Лаптева Т.И. Синтез нуклеиновых кислот в онтогенезе радужной форели, индуцированный синтетическим аналогом лей-энкефалина даларгином // Вопросы ихтиологии. 1990. Т. 30. Вып. 4. С. 158-161.

45. Микодина Е.В., Лаптева Т.И. Влияние даларгина на содержание нуклеиновых кислот и белка в белых мышцах и икре радужной форели // Тр. ВНИРО "Эколого-физиологические и токсикологические аспекты и методы рыбохозяйственных исследований". М.: ВНИРО. 1990. С. 124-129.

46. Микодина Е.В., Микулин А.Е. Анализ механизма воздействия даларгина на физиологические процессы в организме рыб // Тр. ВНИРО "Эколого-физиологические и токсикологические аспекты и методы рыбохозяйственных исследований". М.: ВНИРО. 1990. С. 130-142.

47. Микодина Е.В., Микулин А.Е. Спермиация самцов рыб под действием олигопептида даларгина // Тез. докл. VIII научн. конф. по экологической физиологии и биохимии рыб. Петрозаводск. 1992. Т.2. С. 8-9.

48. Микодина Е.В., Седова М.А. Реакция половых желез симы на воздействие синтетического аналога лей-энкефалина // Тр. ВНИРО "Вопросы физиологии морских и проходных рыб". 1987. С. 86-98.

49. Микодина Е.В., Седова М.А., Глубоков А.И., Наволоцкий В.А. Методические указания по применению даларгина для повышения жизнестойкости икры, предличинок, молоди рыб и акселерации их роста. М.: ВНИРО. 1987. 13 с.

50. Микодина Е.В., Сторожук Н.Г., Седова М.А., Широкова Е.Н. Влияние на рост молоди балтийского лосося одного из структурных аналогов энкефалина // Рыб. хоз-во. 1987. № 5. С. 27-29.

51. Минькова Н.О. Влияние лей-энкефалина и его синтетического аналога даларгина на метаболизм белков и нуклеиновых кислот у насекомых // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.: МГПУ. 1999. 21 с.

52. Нейфах А.А., Тимофеева М.Я. Молекулярная биология процессов развития. М.: Наука. 1977. 312 с.

53. Нейфах А.А., Тимофеева М.Я. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития. М.: Наука. 1978. 336 с.

54. Никольский Г.В. Теория динамики стада рыб. М.:

Пищевая промышленность. 1974. 447 с.

55. *Пермогоров В.И., Тяглов Б.В., Крупенко М.А., Тарасов А.П.* Исследование белок-нуклеиновых взаимодействий с помощью модельных соединений // Отчет о НИР (заключительный). М.: ВНИИгенетика. 1986. 42 с.

56. *Персов Г.М.* Влияние радиации на функциональное состояние гонад молоди рыб при исследовании *in vitro* // Радиоэкология животных. М., 1977. С. 86-87.

57. *Позолотин А.А.* К вопросу о мутагенном влиянии магнитного поля // Науч. тр. кирг. мед. ин-та. 1974. Вып. 100. С. 134-140.

58. *Ромашов Д.Д., Головинская К.А.* Гиногенез и отдаленная гибридизация рыб // Отдаленная гибридизация растений и животных. Сб. науч. тр. ВНИИПРХ. М. 1960. С.496-510.

59. *Рупошев А.Р., Гарина К.П.* Мутагенное действие солей кадмия // Цитология и генетика. 1976. Т. 10. № 5. С. 437-439.

60. *Рыжков В.П.* Влияние некоторых метаболитов на соматические мутации у *Erisium cheranthoides* L. // Докл. АН СССР. 1963. Т. 152. № 1. С. 205-207

61. *Рябов И.Н.* Особенности экологии рыб в водоемах, загрязненных радионуклидами в результате аварии на Чернобыльской АЭС. Дисс. ... докт. биол. наук. М.: ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН. 1998. 292 с.

62. *Седова М.А.* Использование даларгина для повышения жизнестойкости икры и личинок рыб при искусственном воспроизводстве // Тр. ВНИРО "Эколого-физиологические и токсикологические аспекты и методы рыбохозяйственных исследований". М.: ВНИРО. 1990. С. 143-151.

63. *Седова М.А.* Влияние олигопептида даларгина на морфофизиологические показатели рыб // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.: ВНИРО. 1991. 22 с.

64. *Смагин В.Г., Виноградов В.А., Булгаков С.А., Полонский В.М., Беспалова Ж.Д., Титов М.И.* Клиническая оценка гексапептида даларгина как средства лечения язвенной болезни 12-перстной кишки // Терапевтический архив. 1984. Т.56. № 11. С.49-52.

65. *Смирнова И.Б., Граевский Э.Я., Константинова М.М., Нейфах А.А.* Влияние ионизирующей радиации на онтогенез // Внешняя среда и развивающийся организм. М.: Наука. 1977. С. 91-126.

66. *Тимошин С.С., Жданова Т.Ф.* Изучение сравнительного влияния различных рецепторов на процессы клеточного деления эпителия языка белых крыс // Бюлл. eksper. биол.

и мед. 1987. Т.104. № 9. С. 354-355.

67. Тимошин С.С., Панькова Т.Д., Титов М.И. Влияние лигандов опиоидных рецепторов на процессы деления эпителия роговицы белых крыс // Бюлл. exper. биол. и мед. 1987. Т. 104. № 8. С. 229-230.

68. Тьонг Ф.М. Исследование плодовитости и роста *Tilapia mossambica* после воздействия лучами рентгена в малых дозах. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Л.:ЛГУ, 1970. 28 с.

69. Филиппович Ю.Б., Лаптева Т.И., Микодина Е.В., Фомина Г.И. Влияние синтетического аналога лей-энкефалина даларгина на содержание нуклеиновых кислот и белка в мышцах радужной форели // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1989. № 4. С. 473-475.

70. Хайдарлиу С.Х. Функциональная биохимия адаптации. Кишинев: Штиинца, 1984. 270 с.

71. Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М.: Наука. 1984. 472 с.

72. Чазов Е.И., Смирнов В.Н., Титов М.И., Беспалова Ж.Д., Вальдман А.В., Медведев О.С., Виноградов В.А., Полонский В.М., Булгаков С.А. Модуляция пролиферативного ответа лимфоцитов новым аналогом энкефалина – даларгином // Терапевт. архив. 1984. Т.6. №11. С.114-116.

73. Чаяло П.П., Протас А.Ф., Черникова М.Ю. Влияние низких уровней внешнего гамма-облучения на структуру хроматина и содержание нейропептидов в головном мозге крыс // Тез. докл. 1-й междунар. конф. "Биологические и радиозоологические аспекты последствий аварии на Чернобыльской атомной станции". 1990. Ч. 1. М. С. 146.

74. Чистова М.Н., Седова М.А., Ивойлов А.А., Руденко И.В. Развитие половых желез и репродуктивная функция у самок мозамбикской тилапии после обработки даларгином // Вопросы физиологии морских и проходных рыб. М.: Сб. науч. тр. ВНИРО. 1987. С. 98-113.

75. Шейман И.М., Тирас Х.П., Виноградов В.А., Ефимов И.А. Аналог энкефалина даларгин ускоряет регенерацию головного конца тела планарий // ДАН СССР. 1985. Т. 284. № 2. С. 481-483.

76. Шеханова И.А. Радиозоология рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1983. 208 с.

77. Шеханова И.А., Микодина Е.В., Сторожук Н.Г., Седова М.А., Широкова Е.Н. Способ стимуляции физиологических процессов у рыб на ранних стадиях развития // Бюлл. изобрет. 1987. № 4. Авт. свид. №1286138. С.6-14.

78. Шехтер А.Б., Соловьева А.И., Спевак С.Е., Титов М.И.

Влияние олигопептида даларгина на репаративные процессы при заживлении ран // Бюлл. exper. биол. и мед. 1988. Т.106. №10. С. 487-490.

79. Эфраимсон В.П. Трансмутующее действие гамма-лучей и проблема генетической эволюции // Журн. exper. биол. 1981. Т. 7. Вып. 1. С. 3-14.

80. Юдаев М.А., Панков Ю.А., Бабичев В.Н., Федотов В.П., Швачкин Ю.П. Современные представления о гипоталамических рилизинг-гормонах // Вопросы медицинской химии. 1984. Т. 30. Вып. 3. С. 8-15.

81. Яковлева Т.В., Никитина Л.А., Бурлаков А.Б. Влияние специфических опиатных агонистов на индуцированное прогестероном созревание ооцитов жабы и выюна // Докл. АН СССР. 1986. Т. 286. № 3. С. 718-721.

82. Ярыгин К.Н. Использование радиолиганд-рецепторного метода для изучения биологической активности опиоидных пептидов // Олигопептиды как регуляторы функций организма. М.: Наука. 1987. С. 24-30.

83. Ярыгин К.Н., Шитин А.Г., Полонский В.М., Виноградов В.А. Влияние гексапептида даларгина на активность орнитиндекарбоксилазы в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки крыс с экспериментальной дуоденальной язвой // Бюлл. exper. биол. и мед. 1987. № 3. С. 319-321.

84. Bowen-Pope D.F., Rubin H. Growth stimulatory precipitates of Ca^{2+} and pyrophosphate // J. Cell Physiology. 1983. V.117. № 1. P.51-61.

85. Bridgess B. A. Screening for lethal mutation in female mice by 9 generations irradiation during foetal development // Mutat. Res. 1972. V. 61. № 2. P. 279-285.

86. Clarke C.H. Naturally occurring mutagens // Mutat. Res. 1976. V. 32. №. 3. P. 3 - 4.

87. Corry R.M., Robinson S., Getz S. Hypertermic effects on DNA repair // Phys. Med. and Biol. 1977. № 1. P. 146-149.

88. Ilynsky O.B., Kozlova E.V., Kondricova E.S., Kalentchuk V.U., Titov M.I., Bepalova Z.D. Effects of opioid peptides and naloxon on nervous tissue in culture // Neuroscience. 1987. V. 22. № 22. P. 719-735.

89. Marino A.A., Berger T.Y., Mitchell A. et al. Electric field effects in selected biologic systems // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1974. V. 238. P. 436-444.

90. Mernuet S., Katayama K.P., Castilla A. et al. The effect of ultrasound on human chromosomes in vitro // Obstet. and Gynecol. 1973. V. 41. №. 1. P. 4-6.

91. Mikodina E.V. Nutzung von Neuropeptiden zur

Steigerung des Überlebens von Karpfen in der fruhnen Ontogenese // *Physiol., Biol. und Parasitol. von Nutzfischen* (VI Wissenschaftliche Konferenz vom 29 Sept. bis 1 Okt. 1986 in Gustrow). Rostok: Wilhelm-Pieck Univ. 1987. S. 92-94.

92. Mikodina E.V. Physiological and biochemical specificity of the effects of dalargin and its analogues on hatchability of fish eggs // *Proc. Intern. Conf. Fish reproduction '92. CSSR, Vodnany. 1992. P.103-105.*

93. Mikodina E.V., Lapteva T.I. Vliv syntetickeho analogu leu-enkefalinu dalarginu na zmeny nukleovych kyselin a bilkovin u pstruhe duhoveho // *Chov lososovitých ryb včetně sihu. CSSR, Mariánské Lázně, 22-24 Okt. 1989. S. 109-115.*

94. Mikodina E.V., Sedova M.A., Chistova M.N. Effect of "Dalargin", a synthetic Leu-enkephaline analogue, on growth and gonad Development of sterlet, *Acipenser ruthenus* // *Absr. Bull. Intern. Symp. on Sturgeons. Sept. 6-11. Russia, Moscow, VNIRO. 1993. P. 95-96.*

95. Osieka R., Madreiter H., Schmidt C. The effect of hypertermia on DNA repair // *Krebstorsch. und Klin. Oncol. 1976. V. 78. №. 1. S. 139-148.*

96. Schreiber A.B., Lax I., Yarden Y. et al. Monoclonal antibodies gainst the receptor for epidermal growth factor induced early and delayed effects of epidermal growth factor // *Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1981. V.78. № 12. P.7535-7539.*

97. Wade M.J., Moyer J.W., Hine C.H. et al. Mutagenic action of a series of epoxides // *Mutate Res. 1979. V. 66. № 4. P. 367-371.*

98. Welander A.D. Some effects of X-irradiation on different stages on the trout (*Salmo gairdneri*) // *Growth. 1954. V. 18. № 4. P. 227-255.*

ENKEPHALINES AS ENDOGENOUS REGULATORS OF THE ADAPTIVE ANSWER TO CHANGES OF FACTORS OF AN ENVIRONMENT

A.E.Mikulín *, E.V.Mikodina **

* *The Moscow state university of technologies and managements, Moscow.*

** *The All-Russia scientific research institute of a fish facilities and oceanography, Moscow*

On the basis of the own and literary data the hypothesis about the mechanism of action of enkephalines and their stable analogues, consisting in their penetration into a cell as a ligand-receptoric complex and further - in a

nucleus with the subsequent intercalation in actively working part ДНК accompanying with a fragmentation of one or its both strings, its reparation and amplification is proved. The mechanism of action of enkephalins at a subcellular level allows to explain: prolongation of their actions; increase of quantity of chromosomal aberrations and fragments ДНК after influence of enkephalines; amplification of synthesis of DNA, RNA and the protein, resulting in an acceleration of growth of fishes; inheritance of new properties of an organism on patroclinous ways. Enkephalins, probably, are natural endogenous factors of mutagenes of an organism produced in reply to stressful influences of an environment that increases the difference of populations and provides with a material natural selection.

УДК 597-11+597-1.05:639, 3.001.5

**АДАПТИВНЫЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ
РЕАКЦИИ РЫБ НА РЕЗКИЕ
ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВОДЫ**

Головин П.П., Головина Н.А., Романова Н.Н.

ФГУП «ВНИИПРХ» 141821, Московская обл.,

Дмитровский район, пос. Рыбное тел. (095) 587-27-16,

E-mail: VNIIPRH@dmitrow.ru

На годовиках карпа и сеголетках ленского осетра оценивали стресс-реакцию, вызванную воздействием гипер- и гипотермией. Физиологическое состояние организма определяли по изменениям поведения рыб и параметрам крови и наружной слизи. Проведенные исследования выявили, что стресс-реакция у рыб зависит от силы стрессора и стресс-реактивности вида. Гипотермию рыба переносила легче гипертермии. Реакция на гипертермию у ленского осетра проявлялась в виде реакции тревоги в общем адаптационном синдроме (шока), которого у карпа визуально не наблюдали. Изменения физиолого-биохимических параметров у обоих видов рыб находились в пределах нормы реакции при стрессе.

ВВЕДЕНИЕ

Для водных экосистем зоны влияния тепловых и атомных электростанций являются одним из существенных фак-

торов экологической опасности теплового загрязнения [11]. Его негативные последствия неоднократно обсуждались в литературе [10; 16; 17]. Известно, что резкое изменение температуры влияет на белковый и ионный обмен, биологическое потребление кислорода, иммунологическую реакцию, воспроизводительную способность рыб [12; 19]. Не менее важным, на наш взгляд, является изучение реакции организма на резкие колебания температур, то есть последствий температурного стресса. В связи с этим целью настоящей работы являлась оценка стресс-реакции рыб на гипотермию и гипертермию.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работу проводили в аквариальных условиях на годовиках карпа и сеголетках ленского осетра массой соответственно 30 и 60 г. Стресс-факторами служили гипер- и гипотермии, то есть повышение температуры воды на 2, 6 - 7 и 11 - 12°C или ее понижение на 6 - 7 и 11 - 12°C. В качестве контроля брали интактную группу рыб, которая была адаптирована в исходной температуре воды 14 и 23°C. Пробы отбирали спустя 60 мин. после воздействия стрессора. Степень развития стресс-реакции у рыб оценивали по изменению ее поведения и физиологического состояния с использованием биохимического состава слизи и гематологических показателей. Для оценки биохимического состава слизи применяли современный аналитический метод, основанный на использовании мультислойных носителей (стиксов) фирмы «Вауег» [15], который позволяет выявить до 10 биохимических параметров. Одновременно проводили анализ крови по принятым в ихтиогематологии методам [13]. Гематологические исследования включали определение уровня глюкозы с помощью глюкостиксов, числа эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, среднего диаметра эритроцитов (СДЭ) и их оснащенность гемоглобином (СГЭ).

Считывание результатов со стиксов проводили на приборах «Clinitek-50» и «Глюкометр-ГН», метрический уровень оценки которых точнее визуального.

Статистическая обработка полученных материалов проводилась по пакету программ Statgraf и Harvard Graphics для РС и с использованием дополнительного анализа материала по непараметрическим критериям [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенные исследования показали, что, независимо от вектора изменения температуры воды (гипер- или гипотермии) и силы воздействия стресс-фактора, наиболее информативными среди гематологических параметров у рыб оказались величина гемоглобина, число эритроцитов и уровень глюкозы в крови, а из 10 определяемых биохимических показателей слизи - только гемоглобин и белок. Остальные показатели имели недостоверные отклонения и в дальнейшем описании полученных результатов нами не обсуждаются.

Опыты на карпе.

В опытах по гипертермии на годовиках карпа интактная рыба (1-я группа) содержалась при 14°C, а опытная была подвергнута быстрой пересадке из аквариума с температурой 14°C в воду с температурой 16°C (2-я группа рыб), 20°C (3-я группа рыб) и 26°C (4-я группа рыб).

Результаты физиолого-биохимического анализа опытных и контрольных рыб свидетельствуют, что действие этого стрессора у карпа вызывает в первую очередь значительные изменения содержания глюкозы в крови, а также белка и гемоглобина в слизи (рис. 1, а). Даже при повышении температуры воды на 2°C (2-я группа) почти в 2 раза увеличивается уровень глюкозы в крови и на 85 % гемоглобин в слизи. С увеличением температуры воды на 6 (3-я группа) и 12°C (4-я группа) уровень глюкозы в крови у рыб возрастал больше чем в 2.5 раза. В слизи наблюдали увеличение гемоглобина на 85% и 156 % и снижение концентрации белка на 23 и 26 % соответственно у 3-й и 4-й групп рыб.



б) гипотермия



Рис. 1. Изменение некоторых биохимических показателей при гипертермии (а) и гипотермии (б) у карпа, в % от контроля.

В опытах по гипотермии пересадку карпа проводили из аквариума с температурой воды 23°C (контроль) в воду с температурой 16°C (2-я группа) и 11°C (3-я группа). При резком снижении температуры воды на 7 и 12°C у рыб отмечены достоверные изменения гематологических показателей. Возрастает количество гемоглобина на 13 % у 2-й группы рыб и на 22% у 3-й группы рыб. Кроме того, у последних произошло увеличение числа эритроцитов на 28% и уровня глюкозы в крови на 57 %. Из биохимических показателей в слизи у опытных рыб наблюдали увеличение гемоглобина и белка соответственно на 31 и 175 % у 2-й группы рыб. При снижении температуры воды на 12°C (3-я группа) происходит увеличение глюкозы в крови на 67%, белка в слизи - на 72,4 %. В то же время содержание гемоглобина в слизи практически не изменяется (всего на 15,4 %) (рис. 1, б).

Опыты на ленском осетре

В опытах на сеголетках ленского осетра гипертермия на 7°C с 15 до 22°C (1-я серия) и с 13 до 20°C (2-я серия) вызвала изменения физиолого-биохимических параметров. Кроме того, у опытной группы рыб во 2-й серии был отмечен кратковременный (около 10 мин) шок, или по классическим канонам развития стресс-реакции - стадия тревоги. Рыба становилась мало активной, ложилась на дно, а затем, спустя 30 минут, у нее наблюдали стадию контрашока, а затем - резистентности.

В отличие от карпа, у которого при гипертермии уровень

глюкозы крови возрастал почти в 3 раза, у ленского осетра этот показатель значительно снижался: в 1-й серии на 54,5%, а во 2-й на 21,4 %. Также отмечено снижение гемоглобина в слизи на 39 и 18 % соответственно. Концентрация белка в слизи у рыб в 1-й серии падает на 64,3 %, а во 2-й серии происходит его увеличение на 6,3 % относительно интактной группы (рис. 2).

При гипотермии – пересадке осетров в воду с температурой 20 в 13 С – визуально наблюдаемая стадия шока отсутствовала.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ответ на действия различных по своей природе раздражителей в организме рыб формируется ряд неспецифических однотипных реакций, названных стрессом, или общим адаптационным синдромом (Селье, 1960), согласно которому известно, что в развитии стресса выделяют три последовательные группы реакций: первая – нервные и нейроэндокринные, вторая – физиолого-биохимические, третья связана с изменениями поведения, размножения, скорости роста, резистентности рыб.

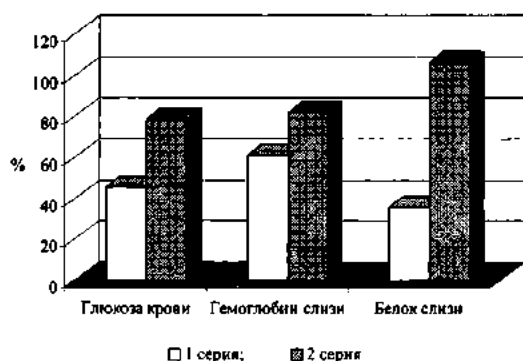


Рис. 2. Изменение некоторых биохимических показателей ленского осетра при гипертермии, в % от контроля.

На практике диагностика стресса у рыб обычно ведется на уровне физиолого-биохимических реакций. Наиболее показательными среди них являются уровень кортизола [1], водно-солевого баланса [12], глюкозы, молочной кислоты, морфологического состава крови [5] и биохимического состава слизи [14].

Образование наружной слизи у рыб связано в первую очередь с выделительной функцией кожи и является одним из важных физиологических процессов, обеспечивающих гомеостаз рыб. Поэтому изменение физиолого-биохимического статуса организма отражается в изменении состава биологических жидкостей и в первую очередь слизи и крови. Кроме этого, наружная слизь является для рыбы важным защитным барьером от различных абиотических и биотических факторов окружающей среды. В иммунитете рыб она отнесена к первой линии защиты. Ее бактерицидные свойства определяются присутствием в ней ряда белков, относящихся к гуморальным факторам [2, 3; 8]. Полифункциональность слизи определяется ее сложным химическим составом, который коррелирует с типом секретирующих клеток [9]. Основными компонентами слизи являются белки, липиды, углеводы и сухой остаток [14]. Через слизь происходит обмен биологически активными веществами между организмом и внешней средой.

Полученные нами данные по изменению уровня общего белка и гемоглобина в слизи свидетельствуют о нарушении нормально протекающих обменных процессов в организме рыб при стрессе и даже имеют разнонаправленный характер на гипо- и гипертермию.

Из литературы известно, что показатели красной крови у рыб не контролируются глюкокортикоидными гормонами, а тепловой шок может вызывать возрастание некоторых показателей крови у карпа и лососевых рыб, а холодной – их снижение [6]. Во многих источниках сообщалось о воздействии температурного стресса на уровень глюкозы в крови. Так, по данным О. Меламед с соавторами [18], у гибридов лаврака (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*) при резком понижении температуры на 7°C наблюдается медленно развивающаяся стресс-реакция, при этом уровень глюкозы крови увеличивается с 54,25 до 338 мг/дл в течение 24 часов. Однако данных по биохимическому составу слизи рыб при перепадах температуры воды в литературе нами не обнаружено.

Результаты настоящего исследования позволили выявить у рыб, в зависимости от силы воздействия температурного стресс-фактора, ряд наиболее значимых ответных реакций. При этом у карпа как на повышение, так и на понижение температуры воды при усилении действия стрессора увеличивается уровень глюкозы в крови и изменяется биохимический состав слизи. Кроме того, при гипертермии у него

отмечено достоверное увеличение в крови количества гематокрита (на 80%) и числа эритроцитов (на 21 %). При этом гипотермию карпы переносят легче, чем гипертермию.

У ленского осетра визуально стресс-реакция на гипертермию протекала в виде шока при изменении температуры от 13 до 20°C (у карпа такой реакции на температурный шок не отмечали). В то же время и глубина изменений физиолого-биохимических параметров у ленского осетра меняет свою направленность по сравнению с таковыми у карпа. Уровень глюкозы в крови и количество гемоглобина в слизи снижается.

Таким образом, у обоих исследованных видов рыб изменения в физиолого-биохимических показателях при резких изменениях температуры являются типичными для стресс-реакции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Ведмейер Г.А., Мейер Ф.П., Смит Л. Стресс и болезни рыб. - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. - 128 с.

2. Вихман А.А. Система иммунитета рыб и ее противои-
нфекционная и противопаразитарная функции // Известия
ГосНИОРХ. - 1976. - Т. 105. - С. 84 - 91.

3. Вихман А.А. Иммунофизиологический статус рыб - объек-
тов аквакультуры // Автореф. док. дисс. - М., 1994. - 48 с.

4. Вихман А.А., Анкудинова В.А. О барьерных свойствах
кожи рыб // Тез. докл. Всесоюз. совещ. «Профилактика,
лечение и диагностика инфекционных болезней рыб». - М.,
1986. - С.16 - 18.

5. Головин П.П. Стресс-факторы в индустриальном рыбо-
водстве, их влияние на рыб и меры предупреждения // Ав-
тор. канд. дис. - М.: ВНИИПРХ, 1984. - 21 с.

6. Головина Н.А., Тромбицкий И.Д. Гематология прудо-
вых рыб. - Кишинев: Штиинца, 1989. - 158 с.

7. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметричес-
ких критериев статистики в медико-биологических иссле-
дованиях. - М.: Медицина, Л.О., 1973. - 141 с.

8. Гусева Н.В. Иммунитет рыб и факторы, влияющие на
его активность // Рыбное хоз-во / Сер. Аквакультура. Ин-
форм.- пакет. М.: ВНИЭРХ, 1999. - Вып. 3. - С.18-31.

9. Димитриева Т.М. О возможных источниках химичес-
ких сигналов в коже рыб // Химические сигналы живот-
ных. - М.: Наука, 1982. - С. 36 - 56.

10. *Ефимова Т.А.* Влияние сбросных теплых вод Конаковской ГРЭС на половые циклы рыб Иваньковского водохранилища // Биологический режим водоемов – охладителей ТЭЦ и влияние температуры на гидробионтов. – М.: Наука, 1977. – С. 63 – 82.

11. *Жукинский В.Н.* Опыт оценки качества прибрежных морских вод Приморье на основе микробной индикации // Водные ресурсы. – М.: Наука, МАИК, Наука / Интерпериодика, 2003. – Т. 30, № 2. – С. 213-221.

12. *Запруднова Р.А.* Стресс у пресноводных рыб: вопросы ионной регуляции // Проблемы экологии, биологии, экологического образования, химии. – Ярославль, 2001. – С. 248-250.

13. Лабораторный практикум по болезням рыб / Мусселиус В.А., Ванятинский В.Ф., Вихман А.А. и др. / под ред. В.А. Мусселиус. – М.: Легкая и пищевая пром-ть, 1983. – 296 с.

14. *Лебедева Н.Е.* Слизь кожи рыб – индикаторная система их физического состояния // Рыбн. хоз-во / Сер.: Болезни гидробионтов в аквакультуре. Аналит. и реф. информ. – М.: ВНИЭРХ, 2001. – Вып. 2. – С. 1-23.

15. *Лебедева Н.Е., Головкина Т.В.* Использование биохимических методов для оценки физиологического состояния рыб при действии химических сигналов // Сенсорная физиология морских рыб (методические аспекты). – Апатиты, 1990. – С. 37 – 40.

16. *Никаноров Ю.И.* Влияние сбросных вод тепловых электростанций на ихтиофауну и рыбное хозяйство водоемов-охладителей / Биологический режим водоемов – охладителей ТЭЦ и влияние температуры на гидробионтов. – М.: Наука, 1977. – С. 135 – 156.

17. *Татарко К.И.* Аномалии карпа и роль температурного фактора в их развитии / Биологический режим водоемов – охладителей ТЭЦ и влияние температуры на гидробионтов. – М.: Наука, 1977. – С. 157 – 196.

18. *Melamed O., Timan B., Avtalion R.R. and Noga E.J.* Design of a stress model in the hybrid bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*) // The Israeli Journal of Aquaculture. Bamidgheh, 1999. V. 51 (1), - P. 10 – 16.

19. *Snieszko S.F.* The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes // J. Fish. Biol. - 1974. – № 6. - С. 197-208.

ADAPTIVE physiological BIOCHEMICAL REACTIONS of FISHES ON SHARP TEMPERATURE CHANGES of WATER

Golovin P.P., Golovina N.A., Romanova N.N.

On yearling of carp and fingerlong of siberian sturgeon estimated the stress - reaction caused by influence hyper- and hypothermia. A physiological condition of an organism defined on changes of behaviour of fishes and parameters of blood and external slime. The carried out(spent) researches have revealed, that stress - reaction at fishes depends on force of stressor and stress - reactance of a kind. The Hypothermia the fish transferred more easy then hyperthermia. Reaction on hyperthermia at the siberian sturgeon was shown as reaction of alarm in the general adaptable syndrome (shock) which at a carp visually did not observe. Changes of physiological biochemical parameters at both kinds of fishes were within the limits of norm of reaction at stress.

УДК 597.554.3:504.054(285.2)

МОРФОПАТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ МАССОВЫХ ВИДОВ РЫБ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

А. С. Васильев, А. В. Буйневич

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанова РАН

Проведен сравнительный морфопатологический анализ 11 массовых видов рыб Рыбинского водохранилища в 1995-2002 гг. Исследования позволили установить, что наиболее отчетливо отклонения от нормы проявляются в жабрах и печени, менее затронута изменениями почка, а состояние кишечника и селезенки у большинства исследованных рыб близко к норме. В ряде случаев отмечены аномалии в строении плавников и ротового аппарата, искривления позвоночника, изменения в гонадах, наличие абсцессов и язв на теле рыб. Среди исследованных видов наиболее глубокие патологические изменения выявлены у плотвы, меньше отклонений от нормы отмечено у густеры, ельца, голавля и окуневых рыб. Состояние органов и тканей рыб связано, как мы полагаем, с состоянием среды обитания, характером распределения загрязняющих веществ по акватории водохранилища и особенностями экологии рассматриваемых видов.

ВВЕДЕНИЕ

Как и многие водоемы средней полосы Европейской части России, водохранилища Верхней Волги в течение ряда лет

подвергаются интенсивному антропогенному воздействию. Это вызывает у рыб многие неспецифические симптомы, которые трудно связать с действием определенных токсикантов. Среди методов оценки состояния отдельных особей и популяций рыб важное место занимает морфопатологический (патологоанатомический) анализ [2, 11], поскольку рыбы являются четкими биоиндикаторными организмами при оценке уровня загрязнения водоемов и качества водной среды, так как на всех этапах развития аккумулируют в себе изменения в среде обитания. Морфопатологический метод благодаря экспрессивности, результативности и практической значимости открывает широкие возможности для оценки состояния рыб в естественных водоемах. К тому же морфопатологический метод оценки состояния рыб и среды обладает высокой чувствительностью, в сравнении с рядом методов биологического анализа качества вод [9]. Достоинством патологоанатомического метода является и то обстоятельство, что он может использоваться в полевых условиях, так как при этом не требуется специального оборудования. Ранее нами проведены детальные морфопатологические исследования леща и синца Рыбинского водохранилища [3]. В настоящем сообщении представлены данные ихтиопатологического анализа других массовых видов рыб, обитающих в Рыбинском водохранилище.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отлов рыб производился в весенне-летне-осенний период в 1995-2002 гг. в Рыбинском водохранилище. Отлов проводился донным тралом с борта э/с «Академик Топчиев», 30 и 50-метровыми неводами и ставными сетями. Исследованы рыбы семейства карповых: плотва, густера, язь, жерех, елец, голавль, укляя, а также семейства окуневых: окунь, ерш, берш, судак. В общей сложности проанализировано свыше 1000 особей 11 видов рыб.

Морфопатологические исследования проводились непосредственно после отлова рыбы. Используемая методика предусматривает наружный осмотр рыб с последующим их вскрытием [1]. Состояние органов оценивалось по шкале, разработанной Аршаницей и Лесниковым [2].

Рассчитывали индекс неблагоприятного состояния (ИНС) и нормированный индекс (IN), предложенные Решетниковым с соавторами [11]. ИНС выражает состояние особи в виде одного числа, и в нашем случае он определялся как

сумма баллов по 4 анализируемым органам (жабры, печень, почка, кишечник). Нормированный индекс (IN) рассчитывали по формуле:

$$IN = \sum_{i=1}^{i=n} B_i / \sum_{i=1}^{i=n} B_{max}$$

где IN - нормированный индекс; B_i - балл по i -му признаку; B_{max} - максимальный балл по i -му признаку; n - число исследованных признаков.

В таблицах, характеризующих ихтиопатологические показатели, представлены: степень выраженности токсикоза в баллах (нормированные индексы) и доля особей, имеющих аномалии органов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Остаточное влияние на рыб загрязняющих стоков обнаруживается уже при визуальном осмотре - нарушение целостности чешуйного покрова, поражение плавников, ослизнение жабр, снижение упитанности вплоть до истощения и т.д. Результаты вскрытия показали, что у многих видов и возрастных групп рыб в местах локальных загрязнений имеют место патологические изменения внутренних органов: печени, почек, сердца, кишечника. В жаберной ткани отмечаются отек, гиперемия с кровоизлияниями, ослизнение, поверхностный и тканевый некроз. Все это признаки хронического кумулятивного политоксикоза с многосистемным проявлением. Разная степень выраженности обнаруженных патологических изменений проявляется у различных видов и разных возрастных групп, отловленных на разных станциях, по-разному.

Морфологические аномалии у карповых рыб

Наиболее отчетливо отклонения от нормы в строении и состоянии органов плотвы визуально фиксируются при анализе жабр, печени, почек и кишечника, поскольку именно перечисленные органы являются органами, через которые попадают загрязняющие вещества и которые ответственны за их детоксикацию и выведение из организма. В ряде случаев отмечены аномалии в строении плавников и ротового аппарата, искривления позвоночника, изменения в селезенке и гонадах, наличие абсцессов и язв на теле рыб. Проанализированы 316 особей плотвы, отловленной в Рыбинском водохранилище, а также в р. Волге в районе г. Углича (табл. 1, 2).

Среди проанализированных видов у плотвы выявлены наибольшие отклонения от нормы в состоянии внутренних органов. У плотвы Рыбинского водохранилища поражение печени и жабр достигает 50-60%. Балльная оценка поражения органов плотвы Рыбинского водохранилища от 1.5 до 3.5, что соответствует среднему уровню загрязнения среды. В то же время данные патологоанатомических исследований густеры, отловленных в тех же районах (в частности в Волжском плесе) Рыбинского водохранилища, характеризуют акваторию как слабо загрязненную.

Несмотря на то, что в выборке плотвы из р. Волги (р-н г. Углича) была исследована молодь, нами зафиксированы перерождение печени, увеличение и отек почки, выявлены 2 случая абсцесса. У 20% исследованных особей плотвы обнаружена инвазия лигулами. В отдельных выборках плотвы, отловленных на защищенных мелководьях (ст. Красный ручей), доля инвазированных лигулами особей плотвы достигает 75%.

Таблица 1

Пределы колебаний и средние значения нормированного индекса неблагоприятного состояния (IN) у плотвы *Rutilus rutilus* (L.) из различных участков Рыбинского водохранилища

Район сбора материала	IN (плотва)		
	Колебания	Среднее	Число рыб, экз.
Волжский плес ниже г. Углича	0.09-0.35	0.15	36
устье р. Сутки	0.00-0.19	0.11	43
Красный ручей	0.00-0.25	0.10	174
Коприно	0.11-0.36	0.18	12
о. Радовский	0.00-0.18	0.06	29
Шекснинский плес Торово	0.12-0.39	0.21	14
Главный плес Молога	0.00-0.22	0.10	8

У густеры (152 особи) отмечены патологические изменения в жабрах (анемия, поверхностный некроз, точечные кровоизлияния), печени (бледная, тусклая окраска органа, точечные кровоизлияния), почке (разрастание ткани) (табл. 3, 4). Доля особей с «пораженными» органами достигает 85.7%, однако глубина патологических процессов не велика (до 2.5 баллов). Состояние кишечника густеры близко к норме или норма (1-2.0) и лишь у отдельных особей отмечены изменения, позволяющие оценить состояние кишечника как 2.5 балла.

Таблица 2

Частота встречаемости аномалий (%) у плотвы Рыбинского водохранилища

Район сбора материала	Плотва			
	Жабры	Печень	Почки	Кишечник
Волжский плес				
ниже г. Углича	11	44	22	0
устье р. Сутки	0-17	0-26	0-24	0-15
Красный ручей	0-38	8-40	0-27	0-53
Коприно	12	48	18	32
о. Радовский	6-28	12-33	0-23	17-39
Шекснинский плес				
Торово	63	54	54	36
Главный плес				
Молога	40	40	0	0

Таблица 3.

Пределы колебаний и средние значения нормированного индекса неблагоприятного состояния (IN) у густеры *Blicca bjoerkna* (L.) из различных участков Рыбинского водохранилища

Район сбора материала	IN (густера)		
	Колебания	Среднее	Число рыб, экз.
Волжский плес			
устье р. Сутки	0.00-0.12	0.06	24
Красный ручей	0.00-0.10	0.04	38
Коприно	0.09-0.21	0.11	12
о. Радовский	0.00-0.15	0.06	16
Шекснинский плес			
Торово	0.15-0.30	0.18	27
Главный плес			
Брейтово	0.06-0.21	0.09	15
Молога	0.00-0.19	0.07	13
Бабы горы	0.00-0.13	0.04	7

Таблица 4

Частота встречаемости аномалий (%) у густеры Рыбинского водохранилища

Район сбора материала	Густера			
	Жабры	Печень	Почки	Кишечник
Волжский плес				
устье р. Сутки	0-18	0-12	0-17	0-22
Красный ручей	0-26	0-18	0-34	0
Коприно	33-100	0-33	0-44	0-66
о. Радовский	36	12	0	0
Шекснинский плес				
Торово	86	43	14	29
Главный плес				
Брейтово	29	15	19	14
Молога	8	8	16	8
Бабы горы	43	28	0	0

По градации, предложенной Н.М.Аршаницей и Л.А. Лесниковым [2], выявленные нами изменения в органах густеры отражают слабое загрязнение акватории плесов Рыбинского водохранилища.

Результаты патологоанатомического обследования особей язя, ельца, голавля, уклей и жереха позволили зафиксировать лишь отдельные отклонения от нормы и компенсаторные изменения.

Морфологические аномалии у окуневых рыб.

Для окуневых рыб, проанализированных нами, характерен целый набор патологоанатомических отклонений от нормы, однако отклонения эти в большинстве случаев незначительны, а частота встречаемости особей с отчетливо выраженной патологией органов сильно варьирует (табл. 5-6). Для жабр зафиксирована анемия, дисконплексаия, отеки, очаги поверхностного некроза; для печени - очаги перерождения, точечные кровоизлияния и атрофия. У отдельных особей нами выявлены отеки слизистой кишечника, а также явления атрофии в почках и селезенке. Средний балл патологоанатомических изменений в органах окуневых рыб, превышающий балл 2,5, зафиксирован нами только для жабр, печени и кишечника судака и берша, что позволяет отнести большинство участков Волжского, Шекснинского и Главного плесов Рыбинского водохранилища к акваториям со слабой степенью загрязнения.

Картина поражения органов исследованных видов рыб крайне неравномерная как у различных особей из одной выборки, так и между выборками, собранными в различных точках Рыбинского водохранилища, а также собранных в одних и тех же точках в разное время. Вероятно, данный факт является отражением неравномерности загрязнения акватории Рыбинского водохранилища и миграциями рыб. Известно, что уровень загрязнения воды претерпевает значительные изменения в течение коротких временных отрезков, грунты же остаются загрязненными долгое время в связи с осаднением и аккумуляцией в них токсикантов [7, 10, 12]. В Рыбинском водохранилище высокие концентрации токсикантов (тяжелых металлов и органических загрязняющих веществ) наблюдаются в донных отложениях вблизи городов, портов, по руслам затопленных рек [4, 5, 7]. В то же время в органах и тканях рыб содержание токсикантов, в частности, тяжелых металлов, в большинстве случаев находится на допустимом уровне [5].

Таблица 5

Пределы колебаний и средние значения нормированного индекса неблагоприятного состояния (IN) у судака *Stizostedion lucioperca* (L.) из различных участков Рыбинского водохранилища

Район сбора материала	IN (судак)		
	Колебания	Среднее	Число рыб, экз.
Волжский плес			
Коприно	0.07-0.20	0.09	34
Шекснинский плес			
Торово	0.08-0.27	0.12	12
Главный плес			
Молога	0.00-0.18	0.05	21

Таблица 6

Частота встречаемости аномалий (%) у судака Рыбинского водохранилища

Район сбора материала	Судак			
	Жабры	Печень	Почки	Кишечник
Волжский плес				
Коприно	0-100	0-100	0	0-100
Шекснинский плес				
Торово	66	42	17	17
Главный плес				
Молога	0-100	0	0	0

ВЫВОДЫ

Патологоанатомический анализ массовых видов рыб, обитающих в Рыбинском водохранилище, позволил установить отклонения от нормы у следующих исследованных видов: поражение жабр у плотвы, густеры, судака, берша, ерша; поражение печени у густеры, плотвы, ельца, жерева, судака, поражение почки у густеры, плотвы; поражение кишечника у плотвы, густеры, берша и судака.

Наиболее отчетливо отклонения от нормы проявляются в жабрах и печени, менее затронута изменениями почка, а состояние кишечника и селезенки у большинства исследованных рыб близко к норме. В ряде случаев отмечены аномалии в строении плавников и ротового аппарата, искривления позвоночника, изменения в гонадах, наличие абсцессов и язв на теле рыб. Среди исследованных видов наиболее глубокие патологические изменения выявлены у плотвы, меньше отклонений от нормы отмечено у густеры, ельца,

голавля и окуневых рыб.

Морфопатологические исследования рыб Рыбинского водохранилища показали, что состояние органов и тканей связано, как мы полагаем, с состоянием среды обитания, характером распределения загрязняющих веществ по акватории водохранилища и особенностями экологии рассматриваемых видов.

В целом проведенный биологический и ихтиопатологический анализ отловленных особей позволяет считать, что на загрязненных участках Рыбинского водохранилища состояние донных рыб (плотва, густера, ерш) хуже, чем рыб, обитающих в пелагиали (елец, голавль, укляя, жерех).

Выявленная степень поражения органов и тканей исследованных видов рыб (в особенности наличие рыб с необратимыми патологическими изменениями) позволяет охарактеризовать глубоководные (русловые) участки Шекснинского плеса (прилегающие к г. Череповцу), а также Волжского (ст. Коприно) и Главного (ст. Бабы горы) плесов Рыбинского водохранилища как загрязненные в средней степени. Верховья Шекснинского плеса на участке Череповец – Торово можно характеризовать как зоны экологического бедствия. Остальные станции, расположенные в Главном, Волжском, Моложском и Шекснинском плесах, по данным ихтиопатологического анализа классифицируются как слабо загрязненные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аршаница Н.М. 1970. Методика патологоанатомических исследований в водной токсикологии // Памятная записка о симпозиуме по водной токсикологии (СЭВ). Л.: ГосНИОРХ, С. 5-9.

2. Аршаница Н.М., Лесников Л.А. 1987. Патолого-морфологический анализ состояния рыб в полевых и экспериментальных токсикологических исследованиях // Методика токсикологических исследований. Л.: ГосНИОРХ, С. 7-12.

3. Васильев А.С. Морфопатологический анализ леща и синца Рыбинского водохранилища // Вопросы рыболовства. Т. 3. №4(12). С. 605-613.

4. Гапеева М.В. 1993. Биогеохимическое распределение тяжелых металлов в экосистеме Рыбинского водохранилища // Современное состояние экосистемы Рыбинского водохранилища. СПб.: Гидрометеиздат, С. 42-49.

5. Гапеева М.В., Груздев Е.С., Лукьяненко В.И., Шувало-

ва А.Б. 1998. Межгодовая и сезонная изменчивость содержания тяжелых металлов у рыб Верхневолжских водохранилищ // Актуальные проблемы экологии Ярославской области. Ярославль. С. 85-93.

6. Гапеева М.В., Законнов В.В., Гапеев А.А. 1989. Локализация и распределение тяжелых металлов в донных отложениях Верхней Волги // Водные ресурсы. Т. 16. № 1. С. 170-172.

7. Козловская В.И., Герман А.В. 1977. Полихлорированные бифенилы и полиароматические углеводороды в экосистеме Рыбинского водохранилища // Водные ресурсы. Т. 24. № 5. С. 563-569.

8. Козловская В.И., Павлов Д.Ф., Чуйко Г.М., Халько В.В., Винников Ю.Я., Анохин С.В. 1990. Влияние загрязняющих веществ на состояние рыбы в Шекснинском плесе Рыбинского водохранилища // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск, С. 123-143.

9. Макрушин А.В., Аршаница Н.М., Мосиенко Т.К., Чинарева И.Д., Сношкина Е.В. 1989. Сопоставление результатов применения разных методов биологического анализа качества вод // Сборник научных трудов ГосНИОРХ. СПб., № 291. С. 117-123.

10. Мур Дж., Рамамурти С. 1987. Тяжелые металлы в природных водах. Контроль и оценка влияния. М.: Мир, 286 с.

11. Решетников Ю.С., Попова О.А., Кашулин Н.А., Лукин А.А., Амундсен П.А., Сталдвик Ф. 1999. Оценка благополучия рыбной части водного сообщества по результатам морфопатологического анализа рыб // Успехи современной биологии. Т. 119. №2. С.165-177.

12. Томилина И.И., Гапеева М.В. 2000. Экоотоксикологическая оценка загрязнения кадмием донных отложений водохранилищ верхней Волги // Биология внутренних вод. №2. С. 143-147.

THE MORPHOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF THE CONDITION OF ORGANS AND TISSUES OF MASS KINDS OF FISHES OF THE RYBINSK WATER BASIN

A.S.Vasil'ev, A.V.Bujnevich

I.D.Papanin's Institute for biology of inland waters RAS,
Borok, Yaroslavl region

A comparative morphopatological analysis was made off
11 mass fish species sampled in the Rybinsk reservoir in 1995-

2002. The studies allowed to reveal that the most anomalies were manifested in gills and liver, kidney was less subjected to changes, intestine and spleen were in norm. In some cases anomalies were registered in structure of fin and mouth apparatus, curvature of the spine, changes in gonads, presence of abscesses and ulcers on the fish body. Among investigated fish samples the most sufficient pathological changes were found in roach, less deviations from norm were registered in white bream, dace, chub and perch. We suggest that state of fish organs and tissues depends on the ambient environment conditions, a pattern of toxic substances distribution in the reservoir and specificity of the ecology of considered species.

УДК 577.15:[597.531:576.895.121]

**ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ НЕКОТОРЫХ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ
И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
В АДАПТАЦИОННЫХ МЕХАНИЗМАХ СИСТЕМЫ
SCHISTOCEPHALUS SOLIDUS (CESTODA) – КОЛЮШ-
КА ТРЕХИГЛАЯ *GASTEROSTEUS ACULEATUS* L.**

Р.У. Высоцкая, Е.П. Иешко, Н.В. Евсеева

*Институт биологии Карельского научного центра РАН,
185610, ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Карелия
185610 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11, Институт
биологии КарНЦ РАН,*

Высоцкая Р.У., e-mail: [rimma@bio.krc.karelia.ru](mailto:rigma@bio.krc.karelia.ru)

В естественных и экспериментальных условиях (голодание) проведено сравнительное изучение активности пяти лизосомальных гидролаз (кислой фосфатазы, ДНКазы, РНКазы, β -глюкозидазы, β -галактозидазы), щелочной фосфатазы и альдолазы в тканях паразита и хозяина в устойчивой паразитарной системе цестода *Schistocephalus solidus* (Müller, 1776) – колюшка трехиглая *Gasterosteus aculeatus* (L.). По уровню активности и характеру варьирования лизосомальных нуклеаз и альдолазы паразит значительно отличался как от зараженного, так и незараженного хозяина. Непродолжительное голодание вызывало достоверные изменения в активности ряда лизосомальных ферментов в тканях у паразита, но не у хозяина, хотя направленность этих изменений у того и другого была одинаковой. Уровень альдолазы в опыте у плероцеркоидов повышался, а у зараженной и незараженной колюшки значительно снижался. Обсуждается роль изученных ферментов в адаптации к эндопаразитизму, в реакциях компонентов паразитарной системы на неблагоприятные воздействия.

В процессе взаимной адаптации в паразитарных системах устанавливается динамическое равновесие между составляющими их компонентами. Паразит, приспосабливаясь к экологии и биохимии хозяина, в то же время индуцирует ответную реакцию на инвазию. В отличие от других консументов, паразиты оказывают влияние на популяцию хозяев не только трофическими, но и патогенными воздействиями [8]. Защитная реакция со стороны хозяина на присутствие в нем чужеродного организма проявляется в различных, в том числе иммунологических и физиолого-биохимических реакциях [16, 19, 25]. Все главные признаки паразита связаны с его теснейшим приспособлением к своему хозяину. Ярким примером такой адаптации к среде являются цестоды, обитающие в пищеварительном канале и полостях тела хозяина. В ходе эволюции гельминты этого класса утратили кишечник, их внешние покровы претерпели структурные изменения и приобрели многообразные функции, в том числе трофическую [6].

Адаптация на уровне клетки осуществляется за счет преобразований ферментативных систем. Важная роль в защитных и компенсаторно-приспособительных реакциях организма принадлежит лизосомальным ферментам, ответственным за внутриклеточное пищеварение. Кроме того, у эндопаразитов особые условия их существования вызвали изменения в функционировании ферментов, участвующих в энергетическом обмене. Биохимические взаимоотношения с участием этих ферментов между паразитическими червями и их хозяевами — рыбами выяснены пока недостаточно [13, 15, 21].

Целью настоящего исследования было сравнение ферментативного статуса паразита и хозяина в устойчивой паразитарной системе цестода *Schistocephalus solidus* (Müller, 1776) — колюшка трехиглая *Gasterosteus aculeatus* (L). Плероцеркоиды *Sch. solidus* (сем. Ligulidae) паразитируют в полости тела рыбы, являющейся для них вторым промежуточным хозяином. Развитие паразита завершается в рыбоядных птицах. У представителей этого семейства в отличие от других цестод в промежуточном хозяине наблюдается не только рост паразита, но и практически полное формирование половой системы. Такой сложный органогенез у плероцеркоидов *Sch. solidus* может протекать лишь в специфических условиях среды, определяя своеобразие взаимоотношений паразита и хозяина на клеточном уровне. При изучении механизмов ферментных адаптаций на уровне клетки мы использовали

модель полного голодания, позволяющую выяснить роль каждого энзима и изменения ферментных пропорций в условиях напряжения метаболических процессов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили сборы, проведенные в мае-июне 2000-2002 гг. в устье реки Лососинки, впадающей в Онежское озеро в черте г. Петрозаводска. Рыб отлавливали с помощью электролова, транспортировали с аэрацией в аквариальную, помещали в бассейны емкостью 12 куб. м воды и в дальнейшем содержали при температуре 13–15° С без кормления. Вскрытие рыбы осуществлялось в течение 3-9 дней с момента вылова. Эксперимент по кратковременному голоданию проводили с двумя группами рыб (по 50 экз. каждая), которых помещали в емкости с дехлорированной водой. Контрольную группу брали на анализ в начале эксперимента, опытную – через 24 дня. Всего исследовано 157 рыб средним размером - 5,9 см, массой – 2,4 г. Общая зараженность колюшки *Sch. solidus* была 24 %. Количество плероцеркоидов в одной рыбе, как правило, составляло одну особь, но отмечены случаи более интенсивной инвазии.

Для анализов брали ткани рыбы без внутренних органов и плероцеркоидов - целиком. Приготовление гомогенатов из исследуемых тканей, определение содержания белка и активности лизосомальных РНКазы, ДНКазы, β -глюкозидазы, цитоплазматической щелочной фосфатазы и альдолазы проводили по методикам, описанным ранее [3]. При определении активности кислой фосфатазы использовали специфичный для лизосомальной формы фермента субстрат - β -глицерофосфат [1]. Активность ферментов рассчитывали на 1 г сырого веса ткани и на 1 мг белка.

Полученные результаты обрабатывали статистически общепринятыми методами, достоверность различий оценивали по непараметрическому критерию U Вилкоксона – Манна – Уитни [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследования показали довольно высокий уровень активности ферментов в тканях изученных объектов. Сопоставление ферментных профилей паразита и хозяина выявило наличие в них черт сходства и различия. В большинстве случаев активность изученных энзимов в теле цестоды была

выше, чем у рыбы. Наибольшие отличия были обнаружены по уровню активности лизосомальных нуклеаз и одного из ферментов гликолиза — альдолазы.

Следует подчеркнуть, что значительные различия выявлены как между гельминтом и зараженной рыбой, так и между гельминтом и незараженным хозяином. Для тканей зараженной и незараженной колюшки, напротив, характерно большое сходство по изученным биохимическим показателям, различия отмечены только по двум ферментам — РНКазе и альдолазе. При этом получены совпадающие результаты при расчете активности ферментов на 1 г сырого веса ткани и на мг белка. Подробно данные по этой части наших исследований изложены в статье, направленной для опубликования в журнал «Паразитология».

Результаты эксперимента по голоданию представлены на рисунке. Хорошо видно, что в опыте активность лизосомальных ферментов у плероцеркоидов повышалась. Это возрастание было достоверным для всех ферментов, исключая кислотную фосфатазу. У хозяина наблюдалась та же тенденция, но изменение уровня активности по сравнению с контролем было недостоверным. В то же время активность щелочной фосфатазы значительно повышалась у зараженной и незараженной колюшки. Изменение активности альдолазы у паразита и хозяина было разнонаправленным: у паразита в условиях опыта наблюдалось ее повышение, а у хозяина (зараженного и незараженного) происходило заметное снижение.

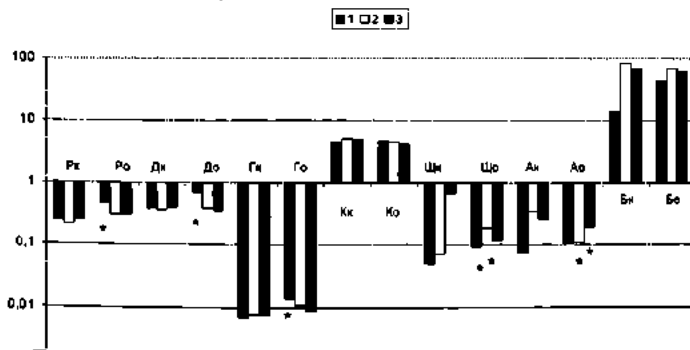


Рис. Динамика биохимических показателей в тканях плероцеркоида *Sch. solidus* (1), зараженной (2) и незараженной (3) колюшки трехиглой в условиях голодания. По оси ординат — lg значений активности ферментов и содержания белка. Р — РНКаза, Д — ДНКаза, Г — β -глюкозидаза, К — кислотная фосфатаза, Щ — щелочная фосфатаза, А — альдолаза, Б — белок; к — контроль, о — опыт. * — Различия между контролем и опытом достоверны.

Адаптация к эндопаразитизму у плоских червей сопровождалась переходом функций ассимиляции и всасывания веществ от кишечника к покровам. Изучение механизмов трофических отношений в паразито-хозяйинных системах цестоды – рыбы выявило значительное сходство структурно-функциональной организации пищеварительно-транспортных систем паразита и хозяина [7, 9]. Вопросы о роли исследованных в данной работе ферментов в процессах адаптаций и механизмах пищеварения у хозяев (рыб) освещены довольно подробно [12]. Сведений о ферментном наборе и функциях лизосомального аппарата у цестод крайне мало.

Сложились представления о том, что у этих гельминтов отпала надобность в мощном арсенале разнообразных гидролаз. Однако, как показали исследования, в тегументе плероцеркоидов *Sch. solidus* выявлен уровень активности гидролитических ферментов, вполне сопоставимый с активностью одноименных гидролаз в тканях хозяина. Особенно ярко обозначилась необходимость в собственных ферментах у паразита в эксперименте по голоданию рыб.

Кислым гидролазам принадлежит важная роль у гельминтов и у других паразитов в процессах инвазии и расщепления тканей хозяина, в процессах внутриклеточного пищеварения [10, 11, 14, 17, 20, 21]. Показано, что механизм проникновения белков через покровы цестод аналогичен пиноцитозу, широко распространенному у беспозвоночных [13]. В тегументе плоских червей обнаружены пиноцитозные пузырьки, первичные и вторичные лизосомы, в которых выявлена высокая активность маркерных ферментов этих органелл [23, 24]. Ранее сообщалось об обнаружении в тканях взрослых и личиночных форм рыбьих цестод кислых протеаз и фосфатазы [7, 13, 21]. Как показали наши исследования, в тканях цестод есть ферменты, гидролизующие нуклеиновые кислоты, углеводы, гликолипиды, гликопротеины и многие другие вещества. Учитывая сказанное, можно предположить, что лизосомы гельминтов содержат такой же обширный набор кислых гидролаз, какой характерен и для других живых организмов [1].

В ходе эволюции системы паразит – хозяин наряду с антигенной мимикрией паразитов сложились механизмы взаимного влияния компонентов системы друг на друга. Паразит продуцирует иммунодепрессивные вещества или лизосомальные ферменты, чтобы обеспечить устойчивость к им-

мунной системе хозяина, а инвазированные животные выделяют иммуноглобулины, с помощью которых связываются эти ферменты и ингибируется их активность [6, 11, 18, 22, 26]. Гликокаликс поверхностной мембраны цестод выполняет функции химической и иммунологической защиты. У плероцеркоидов *Ligulidae* из полости тела рыб в области переднего конца и на латеральной поверхности были выявлены железистые комплексы, секретирующие мукополисахариды, протеазы и гиалуронидазы. С действием этого секрета связывают значительный патологический эффект плероцеркоидов ремнецов на рыб [9]. Обнаружение активных кислых гидролаз, в том числе гликозидаз, в тканях плероцеркоидов *Sch. solidus*, еще раз подтверждает участие лизосомальных ферментов в защитных биохимических реакциях паразита от воздействия хозяина.

Гликокаликс тегумента цестод является не только активным участником защитных реакций, но и важнейшим компонентом пищеварительно-транспортной системы [9]. При изучении этой системы у цестод было показано наличие многих пищеварительных ферментов, в том числе щелочной и кислой фосфатаз [5]. Установлена возможность абсорбции на поверхности тегумента гельминтов ферментов хозяина и участие их в процессах пищеварения [7, 9, 13]. Использование гидролитического аппарата хозяина возможно для цестод, паразитирующих в кишечнике, плероцеркоиды же из полости тела рыбы осуществляют гидролиз субстратов, обходясь главным образом набором собственных ферментов. Как показали наши эксперименты, особенно роль этих ферментов возрастает при голодании хозяина, вынужденного экономно расходовать внутренние резервы.

Заключительные этапы усвоения белков и других веществ происходят с помощью механизмов мембранного и внутриклеточного пищеварения. Многие реакции при этом катализируются ферментами лизосом [7, 12]. В организме хозяина значительная часть этих процессов происходит в слизистой кишечника. У гельминта те же ферменты осуществляют аналогичные процессы в покровах тела. Содержащиеся в лизосомах тегумента разнообразные гидролазы позволяют гельминтам расщеплять и использовать для биосинтеза и энергообеспечения все необходимые вещества.

При голодании, когда происходит переключение на эндогенное питание, наблюдается активизация лизосомального аппарата клетки. У рыб, приспособленных к длительному отключению экзогенного питания, всплеск активности кис-

лых гидролаз отмечается на более поздних сроках голодания, чем у теплокровных [2, 3]. В нашем эксперименте колюшка голодала всего 24 дня, поэтому отмечено лишь небольшое повышение активности гидролаз в ее тканях.

Выявленный нами высокий уровень активности нуклеаз у плероцеркоидов *Sch. solidus* отражает интенсивно происходящие в организме гельминта процессы биосинтеза. На стадии плероцеркоида паразит интенсивно растет, достигает больших размеров, у него происходит морфогенез половой системы. Необходимые для всех этих преобразований пластические и энергетические материалы в значительной мере поставляются за счет активного пиноцитоза и дальнейшего расщепления содержимого пиноцитозных пузырьков ферментами вторичных лизосом, образующихся в результате слияния пиноцитозных вакуолей и первичных лизосом [24]. При голодании хозяина, который переходит на экономное использование всех своих резервов, гельминт использует собственные ферменты для обеспечения организма веществом и энергией, о чем свидетельствует достоверное повышение активности всех гидролаз.

Этим же можно объяснить и довольно высокую активность щелочной фосфатазы - фермента, регулирующего многие реакции метаболизма, в том числе энергетического обмена. Гистохимическими методами было показано, что активность щелочной фосфатазы выявляется в участках стробилы цестод с интенсивным органогенезом [5, 20]. При голодании у *Sch. solidus* уровень этого фермента возрастал почти в два раза, еще большее достоверное увеличение отмечалось в тканях зараженного и незараженного хозяина.

Интересными представляются результаты по изменению активности важнейшего фермента углеводного обмена — альдолазы. В норме активность ее у гельминта достоверно выше, что позволяет сделать вывод об удовлетворении значительных энергетических потребностей интенсивно растущего плероцеркоида за счет гликолиза. При расходовании основных запасов энергетических материалов могут включаться альтернативные механизмы поддержания биоэнергетики тканей, при этом возрастает роль фосфатаз, лизосомальных гликозидаз. В опыте по голоданию у хозяина активность альдолазы заметно снижалась. Аналогичную картину изменения активности изученных ферментов мы отмечали ранее у других видов рыб и теплокровных [2, 3]. Видимо, в условиях дефицита питательных веществ, организм переходит на более эффективные пути окисления, чем гликолиз.

Таким образом, сопоставление ферментных профилей гельминта и его хозяина – рыбы выявило наличие в них черт сходства и различия. Активность большинства изученных ферментов в теле плероцеркоидов *Sch. solidus* была выше, чем в тканях колюшки трехиглой.

Наиболее яркие различия между паразитом и хозяином отмечены в уровне активности кислых нуклеаз и альдолазы, что отражает особенности метаболизма быстро развивающегося червя в специфических условиях обитания.

Полученные данные свидетельствуют о важной роли лизосомальных гидролаз, щелочной фосфатазы и альдолазы в адаптации к эндопаразитизму, процессах питания и энергообеспечения гельминта, ответных реакциях обоих компонентов паразитарной системы на неблагоприятные изменения условий существования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баррет А.Дж., Хит М.Ф. Лизосомные ферменты. Методы исследования. М.: Мир, 1980. С. 25-156.

2. Высоцкая Р.У., Иешко Е.П., Яковлева К.Е., Серженко Л.П. Лизосомальная и энергетическая ферментные системы у карася при некоторых патологических состояниях // Биохимические особенности болезней рыб. Петрозаводск: КарНЦ АН СССР, 1991. С.93-99.

3. Высоцкая Р.У., Яковлева К.Е., Васильева Т.С., Ломаева Т.А. Некоторые показатели углеводного обмена у животных при голодании // Биохимия экто- и эндотермных организмов. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1989. С.98-104.

4. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина, 1969. 29 с.

5. Давыдов В.Г. Гистохимическое изучение псевдофиллидных цестод // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л.: Наука, 1979. С. 189-200.

6. Давыдов В.Г., Микряков В.Р. Адаптивные структуры покровов тела некоторых цестод, связанные с защитой паразитов от влияний организма хозяев // Иммунологические и биохимические аспекты взаимоотношений гельминта и хозяина. М.: Наука, 1988. С. 88-100.

7. Извекова Г.И. Сравнительная характеристика процессов пище-варения у некоторых цестод и их хозяев – рыб. Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 1991. 22 с.

8. Краснощекоев Г.П. Паразитизм: критерии и экологический статус // Успехи соврем. биол. 2000. Т. 120, № 3. С. 253-264.

9. Куперман Б.И. Функциональная морфология низших цестод. Онтогенетический и эволюционный аспекты. Л.: Наука, 1988. 167 с.

10. Пархоменко Л.В., Ковальчук В.К., Опенько Л.В. Патогенетические аспекты гиалуронидазной активности *Proteus mirabilis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1993, № 5. С. 14-18.

11. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., Смирнов Л.П., Гурьянова С.Д. Сравнительная биохимия гельминтов рыб: Аминокислоты, белки, липиды. Л.: Наука, 1989. 152 с.

12. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. С.-Пб.: Гидрометеоздат, 1993. 239 с.

13. Шишова-Касаточкина О.А., Леутская З.К. Биохимические аспекты взаимоотношений гельминта и хозяина (обмен белков, витаминов и стероидов в процессе паразитирования). М.: Наука, 1979. 280 с.

14. Aikawa M., Kilejian A. Invasion procedures and intracellular localization of parasitic protozoa // Lysosomes in applied biology and therapeutics. Vol. 6 (Part 1. Chapter 2) / Eds. J.T. Dingle, P.J. Jacques, I.H. Shaw. Amsterdam-N.Y.- Oxford: North - Holland Publishing Company, 1979. P. 31-48.

15. Beis I., Barrett J. Oxidative enzymes in plerocercoides of *Schistocephalus solidus* // Int. J. for Parasitol. 1980. Vol. 10. P. 151-153.

16. Brombacher F. The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy // BioEssay. 2000. Vol. 22, N. 7. P. 646-656.

17. Coggins J. Apical end organ structure and histochemistry in plerocercoids of *proteocephalus ambloplitis* // Int. J. Parasitol. 1980. Vol. 10, N 2. P. 97-101.

18. Dowd A.J., Smith A.M., Carmona C., Robertson C., Dalton J.P. Purification and characterization of a cysteine proteinase secreted by *Fasciola hepatica* // Biochem. Soc. Trans. 1992. Vol. 20, N. 1. P. 865.

19. Houba V., Butterworth A.E., David J.R., Sher A., Glauert A.M., Sturrock R.F., Vadas M.A. Lysosomes in immunity to schistosomes and other helminthes // Lysosomes in applied biology and therapeutics. Vol. 6. (Part 1. Chapter 1) / Eds. J.T. Dingle, P.J. Jacques, I.H. Shaw. Amsterdam - N.Y.- Oxford: North - Holland Publishing Company, 1979. P.3-29.

20. Hulinskó D. The distribution and activity of enzymes in larvae of *Taenia hydatigena* Pallas, 1766 // Folia parasitol. 1979. Vol. 26, N 4. P. 315-324.

21. Matskósi I., Nümeth I. *Ligula intestinalis* plerocercoid larva proteolitikus enzim ís protebzggtly aktivitósónak jellemzése // Magy. 6llatorv. Lapja. 1980. Vol. 35, N 8. P. 550-552.

22. McKeand J.B., Knox D.P., Duncan J.L., Kennedy M.W. Antibody binding and inhibition of secreted enzymes of *Dictyocaulus viviparus* // J. Cell. Biochem. 1992. Vol. 16A, Suppl. P. 149.

23. Poljakova-Krusteva O., Gorchilova L., Mizinska-Boevska Y., Stojsova S. Lysosomes and lysosome-like structures in the teguments of trematodes and cestodes // Helminthology. 1985. Vol. 20. P. 66-79.

24. Threadgold L.T., Hopkins C.A. *Schistocephalus solidus* and *Ligula intestinalis*: pinocytosis by the tegument // Exper. Parasitol. 1981. Vol. 51, N. 3. P. 444-456.

25. Tristzo A.R., Melo A.L., Vasconcelos A.S., Grossi F.M. Apoptose na modulazro da resposta inflamatoryria aos ovos do *Schistosoma mansoni* // Arq. bras. med. vet. e zotech. 2000. Vol. 52. N 6. P. 586-591.

26. Wliffels G., Panaccio M., Salvatore L., Walker J.D., Spithill T.W. Characterisation of the excreted/secreted cysteine proteases of adult *Fasciola hepatica* // J. Cell Biochem. 1993. Vol. 17 C. Suppl. P. 113.

**STUDYING OF A ROLE OF SOME LYSOSOMAL AND
CYTOPLASMIC ENZYMES IN ADAPTABLE
MECHANISMS OF SYSTEM SCHISTOCEPHALUS
SOLIDUS (CESTODA) - THREE-SPINED STICKLEBACK
GASTEROSTEUS ACULEATUS L.**

R.U.Vysotskaja, E.P.Ieshko, N.V.Evseeva

*Institute of biology of the Karelian centre of science of the
Russian Academy of Science, 185610, Petrozavodsk, Karelia
Vysotskaja R.U., e-mail: rimma@bio.krc.karelia.ru*

In natural and experimental conditions (starvation) is carried out comparative studying activity of five lysosomal hydromanhole (sour phosphatase, DNase, RNase, β -glucosidase, β -galactosidase), alkaline phosphatase and aldolase in tissues of the parasite and the host in steady parasitic system cestoda *Schistocephalus solidus* (Muller, 1776) - three spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (L). On a level of

activity and character of a variation of lysosomal nucleases and aldolase the parasite significantly differed as from infected, and the not infected host. Short starvation caused authentic changes in activity of lines of lysosomal enzymes in tissues in the parasite, but not at the host though the orientation of these changes at that and another was identical. The level of aldolase in experience at plerocercoids raised, and at the infected and not infected stickle-back was considerably reduced. The role of the investigated enzymes in adaptation to endoparasitism, in reactions of components of parasitic system to adverse influences is discussed.

УДК 597.553.2

**ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ
МОЛОДИ КЕТЫ (ONCORHYNCHUS КЕТА),
ВЫПУСКАЕМОЙ ЛОСОСЕВЫМИ РЫБОВОДНЫМИ
ЗАВОДАМИ ПРИМОРСКОГО КРАЯ**

В.Н. Валова, Е.А. Панченко, Н.Л. Асеева

*Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный
центр (ФГУП ТИНРО-центр), Владивосток, 2004 г.*

Приводятся результаты исследования физиологического состояния молоди кеты выращиваемой на лососевых рыбоводных заводах Приморья. Показано влияние различных типов искусственных кормов на состояние пищеварительной системы и крови молоди кеты. Дается анализ, происходящих изменений, и определяется соответствие физиологического состояния молоди кеты при выпуске ее заводами рыбоводному стандарту по физиологическим показателям. Приводится оценка паразитологической ситуации на лососевых рыбоводных заводах Приморья.

ВВЕДЕНИЕ

Важной составляющей оценки эффективности работы лососевых заводов является жизнестойкость выпускаемой молоди. При искусственном воспроизводстве тихоокеанских лососей необходима оценка качества молоди, что связано с отсутствием биотехники ее выращивания, которая бы полностью соответствовала естественному воспроизводству. Темп роста разводимых лососей и качество получаемой молоди зависят от ряда биотических и абиотических факторов [3, 4, 15 – 17]. Одним из определяющих биотических факторов является кормление рыб (корма и рационы, режимы кормления). Как правило, в лососеводстве используются искусственные корма, часто вызывающие развитие алимен-

тарных заболеваний, препятствующих в дальнейшем достижению состояния смолтификации [2, 6, 13, 14]. В конце прошлого столетия был разработан рыбоводный стандарт по физиологическим показателям для использования при оценке качества молоди кеты, выпускаемой с рыбоводных заводов Приморья [3 -5, 12]. Он представляет собой совокупность гематологических и гистологических показателей и бионормативов подращивания. Стандартизация качества молоди на рыбоводных заводах и рыбопитомниках по комплексу морфологических и физиологических показателей и соблюдение строгого соблюдения этих норм несомненно приведет к совершенствованию биотехники разведения и, соответственно, к улучшению качества выпускаемой молоди и повышению эффективности работы рыбоводных заводов. В настоящее время на территории Приморского края находятся два действующих рыбоводных завода, сданных в эксплуатацию в 1987 г. Оба завода расположены на юге Приморья в Хасанском районе на расстоянии 40 км друг от друга. За 16 лет работы заводов вернулось 13 поколений кеты, полученной искусственным путем. Необходимо отметить, что Барабашевский завод построен на реке, имевшей мощную естественную популяцию кеты; Рязановский ЭПРЗ выстроен на реке, где практически отсутствовала естественная популяция. Последний завод строился как экспериментальный для ТИНРО и был рассчитан на воспроизводство и других видов рыб, в частности, симы.

Цель настоящей работы – оценка качества молоди кеты, выпускаемой в последние годы лососевыми рыбоводными заводами Приморского края.

Для достижения поставленной цели в ходе исследований необходимо было решить следующие задачи.

- Оценить физиологическое состояние молоди кеты, выпускаемой с лососевых рыбоводных заводов Приморья в разные годы выпуска
- Сравнить физиологическое состояние молоди кеты с рыбоводным стандартом.
- Дать оценку паразитологической ситуации на лососевых рыбоводных заводах Приморья.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сбор материала осуществлялся на Барабашевском ЛРЗ и Рязановском ЭПРЗ во время выпуска молоди кеты в 1999, 2000 и 2003 гг.. В последние годы закладка икры на эти

заводы производится не только из донорских рек (р. Пойма, р. Нарва) и ЛРЗ о. Сахалина, но и из собственных базовых рек (р. Рязановка, р. Барабашевка). В 2003 г. выпуск молоди, в отличие от предыдущих лет, производился в базовые реки, то есть р. Барабашевку и р. Рязановку.

При подращивании молоди кеты в 1999 г. на обоих заводах использовались корма японского производства с истекшим сроком хранения. На Рязановском ЭПРЗ для стабилизации корма использовали добавки витаминов С и Е, а также вводилась культура лактобактерий (*Lactobacillus acidophilum*). На Барабашевском ЛРЗ для подращивания молоди кеты корма использовались без каких-либо пробиотических добавок.

В 2000 г. и 2003 г. для кормления молоди кеты на заводах применялись комбикорма отечественной разработки (рецептуры разработаны в ФГУП «ТИНРО-центре» - ЛСГК и НПЦ «Аквакорм» - ЛСНТ), изготовленные на комбикормовой установке во ФГУП «ТИНРО-центре».

Физиологическое состояние молоди кеты оценивалось на основе представленного в рыбоводном стандарте [3, 4] симптомокомплекса по гистологическим и гематологическим показателям.

Обработка материала по гематологии и гистологии проводилась по общепринятым методикам [10, 11]. Весь материал статистически обработан с применением программы Excel 2000.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика физиологического состояния молоди кеты

С середины 1990-х годов прошлого столетия на лососевых рыбоводных заводах Приморского края для подращивания молоди кеты использовались корма японского производства в качестве стартовых кормов. Однако в Россию японские корма, как правило, поставляются с практически истекшим сроком хранения, что нередко приводит к непредсказуемым последствиям. Необходимо отметить, что оценка физиологического состояния молоди тихоокеанских лососей, выпускаемых приморскими лососевыми рыбоводными заводами, не проводилась с 1992 г. И только спустя 7 лет, начиная с 1999 г., практика оценки физиологического состояния молоди кеты была возобновлена.

В 1999 г. при кормлении молоди кеты на лососевых рыбоводных заводах Приморья использовались японские кор-

ма с истекшим сроком хранения. Необходимо отметить, что на Рязановском ЭПРЗ для предотвращения развития алиментарной патологии использовались следующие добавки: культура бактерий *Lactobacillus acidophilum*, витамин С (1000 мг/кг корма) и витамин Е (800 мг/кг корма). Культура acidофильных бактерий и витамины вводились в корма непосредственно перед скармливанием в виде водно-жировой эмульсии. На Барабашевском заводе профилактические добавки в корма при кормлении молоди не применялись.

Рязановским ЭПРЗ (с 16.04. по 23.04. 1999 г.) было выпущено 2297,8 тыс. экз. молоди кеты из закладки Ясноморского и Калининского ЛРЗ (о. Сахалин), 2204,16 тыс. экз. молоди кеты из закладки Ясноморского и Сокольниковского ЛРЗ (о. Сахалин) и 1472,61 тыс. экз. молоди кеты из закладки Рязановского ЭПРЗ (р. Рязановка). Суммарный отход за период инкубации икры, выдерживания свободных эмбрионов и кормления не превысил нормативного. Барабашевским ЛРЗ в период с 30.04. до 15.05.1999 г. было выпущено 215,9 тыс. экз. молоди кеты закладки Барабашевского ЛРЗ из р. Барабашевка; 2984,2 тыс. экз. закладки Ясноморского и Сокольниковского ЛРЗ (о. Сахалин). Суммарный отход за период инкубации, выдерживания свободных эмбрионов и период подращивания составил 12%, что превышает нормативы (не более 15%).

При исследовании молоди кеты во время выпуска с Барабашевского ЛРЗ было обнаружено отсутствие пилорических придатков, при этом печень имела темно-серый цвет с кровоизлияниями. На Рязановском ЭПРЗ цвет печени молоди колебался от светлого красно-коричневого цвета до светло-серого с кровоизлияниями у отдельных особей, однако, патологии, сходной с таковой на Барабашевском ЛРЗ, не обнаружено. В печени практически 70 % исследованной молоди кеты на Рязановском ЭПРЗ отмечались признаки липоидной дегенерации печени тяжелой и средней степени, в 30 % случаев сопровождавшейся развитием патологических изменений в желудке и кишечнике. Алиментарная патология в пищеварительном тракте была представлена гастритом с атрофией желез в фундальном отделе желудка, отеком и отслоением слизистой оболочки в среднем отделе кишечника, наличием микророзий и мелких очагов некроза в эпителиальной выстилке слизистой оболочки других отделов кишечника. Основным признаком того, что молодь кеты не смогла достигнуть состояния смолтификации, послужило отсутствие серотонинсодержащих клеток в желуд-

ке и кишечнике рыб, отвечающих за усвоение морской воды.

У 96% молоди, выпускаемой Барабашевским ЛРЗ, наблюдалось развитие липоидной дегенерации печени тяжелой степени, сопровождавшейся развитием патологии в желудке и кишечнике. Наиболее распространенной алиментарной патологией в желудке оказалась кишечная метаплазия, также нередко встречался хронический гастрит с атрофией желез. В кишечнике чаще всего отмечались отек и отслоение эпителиального пласта слизистой оболочки, микроэрозии, язвы и очаги некроза. При наличии этих патологических изменений в кишечнике наблюдалось отсутствие серотонинсодержащих клеток. Практически вся молодь, имевшая алиментарную патологию в пищеварительной системе, не достигла состояния смолтификации.

Данные анализа гистоструктуры пищеварительной системы молоди кеты подтверждаются результатами исследования красной и белой крови. Согласно полученным результатам, состояние красной и белой крови выпущенной молоди кеты не соответствовало рыбоводному стандарту [3 - 5], представленному в таблице 1. В сравнении с ним общее количество эритроцитов было снижено в два раза, в крови присутствовали первичные эритроциты и достаточно большое количество юных эритроцитов, что не соответствует данному этапу развития молоди, то есть состоянию смолтификации. В лейкоцитарной формуле крови наблюдалось повышенное содержание фагоцитарных элементов: нейтрофилов и моноцитов при снижении доли лимфоцитов. Такие изменения в лейкоцитарной формуле на данном этапе онтогенеза свидетельствуют о развитии патологических процессов в организме рыб.

Таблица 1

Характеристика состояния красной и белой крови молоди кеты при выпуске с лососевых рыбоводных заводов Приморья в 1999 г.

Показатели	Рязановский ЭПЗ		Барабашевский ЛРЗ		Рыбоводный стандарт
	Закладка ЭПЗ	Закладка сахалинских заводов	Закладка ЛРЗ	Закладка сахалинских заводов	
Эритроциты, млн./мм ³	0,62	0,56	0,52	0,62	1,2
Первичные эритроциты, %	10,2	5,1	13,5	14,4	Нет
Юные эритроциты, %	52,0	52,5	60,0	59,8	41,0
Зрелые эритроциты, %	37,8	42,4	26,5	25,8	59,0
Лейкоциты, тыс./мм ³	1,04	1,37	1,0	1,18	2,0
Лимфоциты, %	86,33	82,25	87,38	85,37	96,0
Нейтрофилы, %	4,9	10,63	5,09	5,13	4,0
Тромбоциты, %	3,69	3,07	3,24	4,46	Не более 4,0
Моноциты, %	5,06	4,04	4,31	5,15	Не более 2,0

Следовательно, исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что выпущенная в 1999 г. заводами молодь кеты к моменту выпуска не достигла состояния смолтификации, несмотря на приобретение серебристой окраски тела и других внешних признаков.

В 2000 г. начало выпуска молоди кеты на Рязановском ЭПРЗ совпало со сроками ската молоди кеты из естественных популяций (10.04.2000 г.). В период с 10.04.00 г. по 23.04.00 г. было выпущено 762,71 тыс. экз. молоди кеты закладки Ясноморского и Калининского ЛРЗ (о. Сахалин) и 60481,15 тыс. экз. молоди кеты закладки Рязановского ЭПРЗ от производителей, отловленных в р. Рязановка и р. Нарва (Приморский край). Выпуск молоди кеты на Барабашевском ЛРЗ производился в конце ската молоди из естественных популяций и был начат 21.04.00 г. Всего было выпущено 4690,3 тыс. экз. закладки Барабашевского ЛРЗ из р. Нарва и р. Барабашевка и 2459,7 тыс. экз. закладки Ясноморского ЛРЗ и Калининского ЛРЗ (о. Сахалин).

Суммарный отход за период инкубации икры, выдерживания свободных эмбрионов и подращивания молоди соответствовал нормативам, то есть не превысил 15% [12].

Необходимо отметить резкое снижение процента молоди, имеющей алиментарную патологию, по сравнению с предыдущим годом. Признаки липоидной дегенерации печени наблюдались лишь у 5% исследованной молоди, выпускаемой лососевыми заводами Приморья. У отдельных рыб патологические изменения в печени сопровождалось развитием поверхностного гастрита с атрофией желез в фундальном отделе желудка, отеком и отслоением эпителиального пласта слизистой оболочки в среднем отделе кишечника. В эпителиальной выстилке слизистой оболочки желудка и кишечника отмечалось отсутствие серотонинсодержащих клеток, отвечающих за усвоение морской воды. Отсутствие серотонинсодержащих клеток у 2% исследованных рыб является показателем того, что 2% молоди кеты не достигла состояния смолтификации, несмотря на окраску тела, соответствующую смолтификации. При отсутствии патологических изменений в желудке и кишечнике липоидная дегенерация печени легко обратима и хорошо поддается лечению [2, 18].

Согласно данным гематологического анализа, представленным в таблице 2, большинство молоди перед выпуском достигла состояния смолтификации и отвечала параметрам рыбоводно-физиологического стандарта [3 – 5, 12]. У всей исследованной молоди общее количество лейкоцитов не от-

личалось от такового у молоди из природных популяций и соответствовало рыбоводному стандарту. Интенсивность эритропоза и лейкопоза у выпущенной с заводов молоди также соответствовала рыбоводному стандарту. Лейкоцитарная формула крови у всех исследованных рыб (как на Рязановском, так и на Барабашевском ЛРЗ) незначительно отличается от рыбоводного стандарта и от таковой у молоди из естественных популяций. В составе лейкоцитарной формулы отмечено повышенное содержание тромбоцитов при снижении доли лимфоцитов, что является обратимым функциональным отклонением, связанным с ограничением двигательной активности рыб при искусственном выращивании.

Таблица 2

Характеристика состояния красной и белой крови молоди кеты при выпуске с лососевых рыбоводных заводов Приморья в 2000 г.

Показатели	Рязановский ЭПЗ		Барабашевский ЛРЗ		Рыбоводный стандарт
	Закладка ЭПЗ	Закладка сахалинских заводов	Закладка ЛРЗ	Закладка сахалинских заводов	
Эритроциты, млн./мм ³	1,9	1,22	1,55	1,05	1,2
Первичные эритроциты, %	-	-	-	-	Нет
Юные эритроциты, %	30	27	34	42	41,0
Зрелые эритроциты, %	70	73	66	58	59,0
Лейкоциты, тыс./мм ³	2,78	3,86	2,55	1,82	2,0
Лимфоциты, %	86,33	85,25	86,7	88,5	96,0
Нейтрофилы, %	4,9	4,1	4,45	4,45	4,0
Тромбоциты, %	3,69	3,07	0,4	0,45	Не более 4,0
Моноциты, %	5,08	4,04	2,3	2,15	Не более 2,0

Начиная с 2002 г., на заводах Приморского края закладку икры стали осуществлять из базовых рек заводов и частично из донорских: р. Нарва и р. Пойма, при этом был прекращен ввоз оплодотворенной икры с лососевых рыбоводных заводов о. Сахалина.

В 2003 г. заводы начали выпускать молодь во время естественного ската (18.04.03 г.), и выпуск продолжался до конца апреля. Выпуск молоди кеты осуществлялся только в базовые реки заводов. Всего двумя заводами было выпу-

щено 19576,02 тыс. экз. молоди кеты. Отход за весь период инкубации икры, выдерживания свободных эмбрионов и подращивания молоди не превысил нормативов (15%). Во время подращивания молоди кеты обоими заводами в качестве профилактических добавок использовались витамины С (1000 мг/кг корма) и Е (800 мг/кг корма), а также бактериальная культура штамма *Lactobacillus acidophilum*. Физиологическое состояние молоди кеты оценивалось при выпуске.

Средний вес молоди, выпущенной Барабашевским ЛРЗ, составил 0,83 г при его варьировании от 0,35 г до 1,51 г. Коэффициент вариации составил 25%, что на 20 % выше нормативного [3, 4]. Рязановский ЭПРЗ выпустил молодь кеты со средним весом 1,06 г при минимуме 0,44 г и максимуме 1,97 г. Коэффициент вариации не превысил 21%, что лишь немного выше нормы. Внешний вид молоди (наличие характерной серебристой окраски), выпущенной лососевыми рыбноводными заводами, соответствовал состоянию смолтификации.

Анализ физиологического состояния молоди кеты при выпуске показал следующее. Визуально при вскрытии рыб у 5-10% молоди наблюдались внешние признаки липоидной дегенерации печени: изменение окраски печени на песочную (норма - яркий красно-коричневый цвет) при рыхлой консистенции ткани органа. Остальная молодь (90-95%) имела печень яркой красно-коричневой окраски с плотной консистенцией ткани.

На препаратах, изготовленных из кусочков печени с внешними признаками патологии, были обнаружены симптомы липоидной дегенерации печени легкой или средней тяжести. При легкой степени заболевания в гепатоцитах на неокрашенных препаратах были обнаружены золотисто-коричневые кристаллы цероида (нерастворимые липиды, производные липофусцинов), создающие эффект крупной зернистости цитоплазмы клеток печеночной паренхимы. При средней тяжести заболевания ткань печени напоминает «ажурную сетку», где глыбками цероида может замещаться до 50 % объема клетки. При этом нередко нарушается целостность клетки и наблюдается пикноз клеточных ядер. Как правило, липоидная дегенерация печени сопровождается патологическими изменениями в желудке и кишечнике [2], что мы имели и в данном случае. У всей молоди с симптомами липоидной дегенерации печени средней тяжести в желудке и кишечнике была обнаружена алиментарная патология. В желудке наиболее пострадал фундальный от-

дел, где у всех исследованных особей отмечалось развитие поверхностного гастрита с атрофией желез, вследствие чего была нарушена пищеварительная функция данного отдела. Это означало снижение выработки пищеварительных ферментов и соляной кислоты, осуществляемой за счет деятельности фундальных желез. В кишечнике патологические изменения затрагивали в основном средний отдел, исполняющий активную всасывающую функцию. Здесь отмечались отек и отслоение эпителиальной выстилки слизистой оболочки стенки кишечника, изредка встречались мелкие очаги некролиза. У всей молодежи с признаками липоидной дегенерации печени в слизистой оболочке желудка и кишечника отсутствовали серотонинсодержащие клетки, отвечающие за усвоение морской воды. Вся эта молодежь, несмотря на внешние признаки смолтов, не достигла состояния смолтификации. Это означает то, что при выносе течением реки в эстуарную зону и морское побережье она не в состоянии будет питаться и погибнет.

Результаты анализа гематологических показателей представлены на таблице 3.

Таблица 3

Характеристика состояния красной и белой крови молодежи кеты при выпуске с лососевых рыбоводных заводов Приморья в 2003 г.

Показатели	Рязановский ЭПРЗ	Барабашевский ЛРЗ	Рыбоводный стандарт
Эритроциты, млн./мм ³	1,73	1,18	1,2
Первичные эритроциты, %	-	-	-
Юные эритроциты, %	45,3	48,0	41,0
Зрелые эритроциты, %	54,7	52,0	59,0
Лейкоциты, тыс./мм ³	3,09	2,76	2,0
Лимфоциты, %	89,2	88,3	96,0
Нейтрофилы, %	6,8	5,9	4,0
Тромбоциты, %	2,8	3,2	Не более 4,0
Моноциты, %	2,8	3,2	Не более 2,0

Из таблицы 3 видно, что у молодежи, выпускаемой заводами, имеются некоторые отличия от рыбоводного стандарта [3, 4] в количестве эритроцитов, что может являться компенсаторной реакцией организма рыб на условия содержания и ограниченность движения, а также может быть связано с искусственными кормами. Более высокий, по сравнению с рыбоводным стандартом, уровень эритропоэза, характеризовавшийся увеличенным количеством незрелых форм (юных эритроцитов) эритроидного ряда, также является следствием содержания в искусственных условиях, при скармливании комбикормов, значительно отличающихся по

составу от естественной пищи. То же касается и общего количества лейкоцитов и состава лейкоцитарной формулы крови, особенно процентного содержания моноцитов и нейтрофилов. В принципе кровь очень лабильна, и данная картина может быть связана не только с условиями содержания и кормления рыб, а также со стрессом, который вызывается отловом рыб, и изменения носят обратимый характер. Необходимо отметить, что когда картина крови становится характерной для алиментарной патологии, болезнь уже носит необратимый характер и как следствие начинается торможение темпа роста рыб и их массовая гибель. В нашем случае (в 2003 г.) симптомов тяжелой степени липоидной дегенерации печени не отмечалось, болезнь носила обратимый характер, и молодь, не имевшая симптомов алиментарных заболеваний средней и тяжелой степени тяжести, достигла состояния смолтификации, несмотря на некоторые отклонения в картине белой и красной крови.

Оценка паразитологической ситуации на лососевых рыбодоводных заводах Приморского края

В весенний период при выпуске молоди осуществлялось изучение паразитологической ситуации на лососевых заводах Приморского края. В течение этого периода из бассейнов исследовалось по 100 экз. сеголетков кеты.

В результате проведенных паразитологических исследований молоди кеты была обнаружена триходина - *Trichodina truttae*. Данный паразит - широко распространенный у мальков лососей на рыбодоводных заводах о. Сахалин [1, 7]. Впервые этот вид триходин был зарегистрирован А.В. Ермоленко [8] у диких лососей из рек Приморья. На лососевых рыбодоводных заводах Приморского края триходины были обнаружены еще в 1987 г., при этом у 90% выпускаемой молоди наблюдалось покрытие паразитами 50-60% поверхности тела. Такое массовое заражение молоди трихинами было связано с ослаблением организма рыб в результате использования при подращивании молоди кеты несбалансированных по основным питательным веществам кормов, к тому же с высоким содержанием перекисных соединений.

В настоящее время на заводах данный паразит регистрировался только при температуре воды выше 4°C на поверхности тела и плавниках, реже на жабрах. Зараженность молоди этими паразитами составляла 10-25 экз. на каждую из 100 исследованных рыб, при этом экстенсивность инвазии достигает 4-73 экз. на рыбу (интенсивность инвазии 90 - 100%). Наблюдались случаи, когда триходины были рас-

положены друг на друге, при этом тело рыбы было покрыто слизью, жабры имели бледно-серую окраску, это свидетельствует о том, что при такой инвазии этот паразит, безусловно, приносит вред своему хозяину.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Причиной выпуска нежизнестойкой молодежи в 1999 г. послужило использование на лососевых рыболовных заводах Приморья кормов японского производства сомнительного качества (истекший срок хранения), предоставленных Приморьрыбводом. Комбикорма, выпускаемые японскими производителями, отличаются от отечественных кормов повышенным содержанием микробного белка, заменяющего рыбную муку. В Японии для замены дорогостоящей рыбной муки в комбикормах для рыб используются дрожжи р. *Torula*, применяемые для очистки сточных вод. По-видимому, по окончании срока хранения, указанного в сертификате изготовителя, они становятся остротоксичными из-за продуктов распада микробного сырья. На рыболовные заводы Приморского края были доставлены корма без сертификата качества, выданного японским производителем. Попутно заметим, что корма японского производства с истекшим сроком хранения стали причиной массовой гибели молодежи лососевых на Малкинском рыболовном заводе (Камчатка) при проведении испытаний стартовых сухих гранулированных кормов (неопубликованные данные Б.П. Смирнова, ВНИРО). Необходимо отметить, что в 1999 г. добавки культуры ацидофильных бактерий и витаминов С и Е, применяемые на Рязановском ЭПРЗ, позволили значительно снизить процент молодежи с необратимой алиментарной патологией.

Начиная с 2000 г., на лососевых заводах Приморского края для подрачивания молодежи кеты стали использовать корма отечественных рецептур производства ФГУП «ТИНРО-центр». Основным отличием отечественных рецептур кормов от зарубежных является низкое содержание (10-15%) дрожжевого белка в рецептурах стартовых и продукционных кормов. Введение в стартовые корма профилактических добавок (культуры ацидофильных бактерий и витаминов С и Е) при выращивании молодежи кеты на Рязановском ЭПРЗ в 2000 г. позволило этому заводу выпустить более жизнестойкую молодежь в сравнении с Барабашевским ЛРЗ. В 2003 г. оба завода стали применять указанные выше профилактические добавки и добились снижения числа молодежи

с признаками алиментарных патологий, несмотря на скормливание рыбам недостаточно сбалансированных кормов и нестандартную ситуацию сложившуюся на Барабашевском ЛРЗ (резкая нехватка воды в феврале 2003 г.).

Таким образом, при подращивании молоди кеты на лососевых рыбоводных заводах Дальнего Востока более рационально использование кормов отечественных рецептур. Проведенные в конце 80-90-х гг. прошлого столетия производственные проверки отечественных рецептур комбикормов и вновь полученные результаты показали, что рыбоводные и физиологические показатели молоди кеты, полученные в ходе исследований, не уступают таковым у рыб, подращиваемых на кормах японского производства хорошего качества.

Паразитологические исследования молоди кеты на заводах Приморского края носили фрагментарный характер и впервые были проведены в 1987 г. при массовой гибели молоди кеты на Рязановском ЭПРЗ при выпуске, когда и были впервые обнаружены триходины на поверхности тела рыб. Как правило, наличие триходин на поверхности тела у искусственно выращенной молоди свидетельствует об ослаблении организма рыб вследствие несоблюдения условий содержания и кормления, поскольку является вторичной инфекцией. Это также является свидетельством несбалансированности используемых искусственных кормов для данного вида рыб, а также их низкого качества. При использовании заводами качественных, сбалансированных кормов, а также при применении профилактических добавок в виде культуры ацидофильных бактерий и витаминов С и Е (природные антиоксиданты, нивелирующие последствия использования несбалансированных, некачественных кормов) триходины на поверхности тела рыб не обнаруживались. Появление триходин в донорских и базовых реках рыбоводных заводов, по-видимому, связано с завозом икры с рыбоводных заводов о. Сахалин, где заражение триходинами молоди кеты при искусственном выращивании обычное явление [7]. В связи этим анализ паразитологической ситуации на заводах необходим и может служить одним из способов определения качества выпускаемой молоди.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богданова Е.А. Паразиты и инвазионные болезни лососевых на рыбоводных заводах Севера и Северо - Запада СССР и мероприятия по их профилактике.// Изв. ГОСНИОРХ1976. Том 105.стр.130 – 139.

2. Валова В.Н. Поиск путей профилактики и лечения алиментарных заболеваний у тихоокеанских лососей // Рыбное хозяйство.- 1998.- № 2.- С.46-47

3. Валова В.Н. Характеристика физиологического состояния молоди тихоокеанских лососей при выращивании на искусственных кормах // Автореф. дис. ... канд. биол. наук.- Москва (Рыбное).- 1999 а.- 24с.

4. Валова В.Н. Проблема качественной оценки заводских популяций тихоокеанских лососей // Российско-американская конфер. по сохранению лососевых (доклад).- октябрь, 1999 б. Хабаровск. С.107-110.

5. Валова В.Н. Рыбоводный стандарт молоди кеты // Рыболовство и рыбоводство.- 2000.-№ 4.- С.23.

6. Валова В.Н. Цитоморфологическая характеристика молоди тихоокеанских лососей из природных популяций и при искусственном выращивании // Вопросы рыболовства. 2002. Т.3. № 3 (11). С. 502-521.

7. Вялова Г.П. Паразитозы кеты и горбуши Сахалина // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Южно-Сахалинск. 1999. 22 с.

8. Ермоленко А.В. Паразиты рыб пресноводных водоемов континентальной части бассейна Японского моря // Владивосток: ДВО РАН, 1992. – 237 с.

9. Ермоленко А.В., Беспрозванных В.В., Шедько С.М. Фауна паразитов лососевых рыб (Salmonidae, Salmoniformes) Приморского края. Владивосток: ДВО РАН, 1998. – 87 с.

10. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия // М. – Мир.- 1969.- 624 с.

11. Ромейс Б. Микроскопическая техника // М.- Мир.- 1954.- 631 с.

12. Скирин В.И., Крупянюк Н.И., Валова В.Н., Калинина М.В. Инструкция по искусственному разведению приморской кеты в заводских условиях // ТИПРО.- Владивосток.- 1992.- 45 с.

13. Скопичев В.Г., Ноздрачев А.Д., Раковская Л.В., Фомин А.В., Хованский И.Е. Влияние состава и консистенции кормов на структурно-функциональную организацию желудочно-кишечного тракта молоди кеты // Сборник научных трудов ГосНИОРХ.- 1991.- В.306.- С. 129-143.

14. Скопичев В.Г., Ноздрачев А.Д., Соколова И.О., Балашов И.В., Хованский И.Е. Фомин А.В. Цитофизиологические исследования в разработке мероприятий по повышению эффективности промышленного рыбоводства // Сборник научных трудов ТИПРО.- 1994.- С. 122-129.

15. Факторович К.А. Алиментарные заболевания у рыб / В сборнике «Биологические основы рыбоводства: паразиты и болезни рыб».- М: Наука.-1984.- С. 144-159.

16. Hendricks J.D., Sinhuber R.O., Henderson M.C., Buchler D. Liver and kidney pathology in rainbow (Salmo gairdneri) exposed to dietary pyrrolisidine (Senecio) alkaloids // Exp. and Mol. Pathol. - 1981.- V. 35.- N. 2.- 170-183.

17. Roald S.O. An outbreak of lipoid degeneration (LLD) in atlantic salmon in a fish farm and attempts the cure disease / Nordisk. Veterin.- 1976/- V. 28.- P. 243-249.

18. Smith C. E. The prevention of liver degeneration (ceroidosis) and mycroitic anaemia in rainbow trout Salmo gairdneri, Richardson, fed rancid diets a preliminary report / J, Fish Biol.- 1979. - 2. - N 5. - P. 429-437.

**THE APPRAISAL OF THE PHYSIOLOGICAL
CONDITION CHUM SALMON FINGERLING
(ONCORHYNCHUS KETA), WHICH ARE RELEASING
FROM THE SALMON HATCHERY
OF THE PRIMORYE REGION**

V. N. Valova, E. A. Panchenko, N. L. Aseeva
Pacific Research Fisheries Center, Vladivostok

At the manuscript were leaded results of the investigation of the physiological condition chum salmon fingerlings were raising at the salmon hatchery of the Primorye. There is shown the influence of the kind types artificial foods on the condition of the digestive system and blood of chum salmon fingerling. Also there is let as analysis of make an changes and are define the conformity of the physiological condition chum salmon fingerling, which are releasing on the hatchery, to the piscicultural standard for physiological indexes. Were leaded the appraisal of the parasitological situation on the salmon hatchery of the Primorye.

**ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ
ПРИ АЛИМЕНТАРНОМ ТОКСИКОЗЕ
У ИСКУССТВЕННО ВЫРАЩИВАЕМЫХ МАЛЬКОВ
ТИХООКЕАНСКИХ ЛОСОСЕЙ НА РЫБОВОДНЫХ
ЗАВОДАХ КАМЧАТКИ**

Т.В. Гаврюсева

*Камчатский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии (КамчатНИРО),
683000, Петропавловск-Камчатский, ул. Набережная, 18
E-mail: kamniro@elizovo.kamchatka.ru*

В настоящем исследовании приведены данные гистологических и гистохимических исследований лососей рода *Oncorhynchus*, проведенных в 2003 г. на 5 лососевых рыбноводных заводах Камчатки. Описаны деструктивные изменения в печени, почке, жабрах, желудочно-кишечном тракте, поджелудочной железе и головном мозге, выявленные при алиментарном токсикозе.

ВВЕДЕНИЕ

При индустриальных методах выращивания рыбноводство полностью базируется на искусственных кормах. Лососевые рыбы очень чувствительны к погрешностям диеты, особенно к неполноценности и несбалансированности белков и недостатку витаминов [9]. Известно, что алиментарные заболевания могут вызывать жировое перерождение печени, нефрокальциноз почки и миолиз скелетной мускулатуры [9, 13, 14]. Кроме того, пищевые токсикозы значительно ослабляют резистентность организма рыб, повышают восприимчивость особей к воздействию патогенов различной этиологии и усложняют борьбу с заболеваниями на заводах, что значительно затрудняет процесс воспроизводства. Поэтому при искусственном рыборазведении важное значение имеют исследования, направленные на выявление у выращиваемых рыб алиментарных заболеваний.

В настоящее время на Камчатке существует 5 лососевых рыбноводных заводов (Паратунский, Кеткино, Озерки, Малкинский, Вилюйский), где воспроизводят тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus*: кету (*O. keta*), нерку (*O. nerka*), чавычу (*O. tshawytscha*) и кижуча (*O. kisutch*). Для оценки состояния здоровья рыб на всех заводах проводятся плановые бактериологические, вирусологические, паразитоло-

гические и гистологические мониторинговые исследования молоди тихоокеанских лососей.

Целью настоящей работы было выявление гистопатологических изменений у мальков тихоокеанских лососей на ЛРЗ и сравнение состояния исследуемых органов и тканей с таковыми у молоди рыб из естественных водоемов Камчатки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для гистологических исследований отобрали 8143 пробы органов и тканей от 220 экз. личинок и мальков лососей рода *Oncorhynchus* на пяти лососевых рыболовных заводах: Малкинском (МЛРЗ), Паратунском (ПЛРЗ), Вилюйском (ВЛРЗ), Озерки (ОЛРЗ), Кеткино (КЛРЗ) и 167 экз. молоди разного возраста родов *Oncorhynchus* и *Salvelinus* из бассейнов рек Авача, Паратунка, Большая; из них чавычи — 20, нерки — 110, кеты — 70, кижуча — 160, горбуши — 10, гольца — 17 экз.

Первый отбор проб органов и тканей у заводских лососей проводили в период перехода на экзогенное питание, второй — за 7–10 дней перед выпуском в естественные водоемы. Кроме того, у мальков нерки на МЛРЗ (12.05.03) производили дополнительный отбор гистологических проб, показанием к которому была высокая доля рыб-носителей бактериальной флоры. Фиксировали пробы тканей и органов от мальков кижуча, оставленных на подращивание на ВЛРЗ 12.08.03. Отбирали также заводских особей с визуальными признаками патологии для выявления причин заболевания. Для сравнения нормы и патологии тканей исследовали гистологические пробы от сеголеток кеты, нерки, кижуча из рек Авача, Паратунка, Большая.

Образцы тканей рыб фиксировали непосредственно после отлова. Эвтаназию мальков проводили в 1-1,5% водном растворе диэтилового эфира. Пробы кожи, жабр, передней и задней почки, печени и желчного пузыря, сердца, плавательного пузыря, селезенки, пищевода, желудка, кишечника, головного мозга, скелетной мускулатуры и хрящевой ткани фиксировали в жидкости Дэвидсона [11]. Мальков, длина тела которых не достигала 4 см, фиксировали целиком. Материал обрабатывали по общепринятой методике [10, 12]. Срезы изготавливали толщиной 4–5 мкм на ротационном микротоме Shandon AS 325. Препараты окрашивали гематоксилин-эозином по Мейеру, Циль-Нильсену, Романовскому-Гимза, железным гематоксилином по Гейденгайну,

ШИК-световым зеленым и по Граму. Полученные препараты изучали под световым микроскопом Olympus BH-2, имеющим автоматическое фотографическое устройство.

При сравнении структуры печени у мальков лососей, питающихся искусственными и естественными кормами, учитывали различный характер отложения жировых капель [4, 9]. Классификацию степени липоидной дегенерации гепатоцитов проводили по Факторовичу [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В период перехода на экзогенное питание пробы кеты и кижуча на холодноводных (КЛРЗ, ОЛРЗ, ПЛРЗ, ВЛРЗ), а также нерки на тепловодном (МЛРЗ) заводах отбирали еще на стадии личинки, когда от 30 до 100% особей имели остатки желточного мешка. За период исследования средние размеры у рыб увеличивались: длина 3,22–4,67 см и масса 0,27–1,15 г у кеты; 2,5–4,96 см и 0,12–1,74 г у нерки; 3,76–5,1 см и 0,81–2,94 г у кижуча, 4,55–6,33 см и 1,51–4,07 г у чавычи.

При визуальном осмотре рыб на ЛРЗ в основном признаки заболевания не отмечали. Лишь у отдельных особей нерки на МЛРЗ (25.03.05) обнаружили потемнение кожных покровов, рыба плавала на боку. При патолого-анатомическом вскрытии у кеты на КЛРЗ (21.04.03) регистрировали увеличение плавательного пузыря, иногда асцит; у особей этого же вида на ОЛРЗ (12.05.03) выявили бледность и рыхлую консистенцию печени. У кижуча на ВЛРЗ, чавычи на МЛРЗ и кеты на КЛРЗ наблюдали обилие внутр-нерных жировых отложений.

В результате гистологического и гистохимического исследования искусственно выращиваемой молодежи тихоокеанских лососей установили следующие деструктивные изменения.

Печень. Липоидную дегенерацию гепатоцитов 2-3 степени отмечали у кеты от 40% на КЛРЗ до 100% на ВЛРЗ. Четвертую степень дегенерации (Рис. 1) обнаружили от 20% у кижуча на ВЛРЗ и кеты на КЛРЗ до 90% у мальков кеты с признаками патологии на КЛРЗ. Цероидную дегенерацию (Рис. 2) выявили у 20% мальков нерки на ОЛРЗ и кижуча на ВЛРЗ. Отложение гранул цероида отмечали как внутри клеток, так и в межклеточном пространстве.

Почка. Выявили гиперемию, фокальный пикноз и карioreксис клеток гемопоэтической ткани (Рис. 3) у нерки на МЛРЗ и ОЛРЗ. У этих же рыб и у молодежи кижуча на ВЛРЗ

регистралировали гиалиново-капельную дегенерацию цилиндрического эпителия почечных канальцев (Рис. 4). Нефрокальциноз почечных канальцев отмечали у кижуча, оставленного на подращивание на ВЛРЗ.

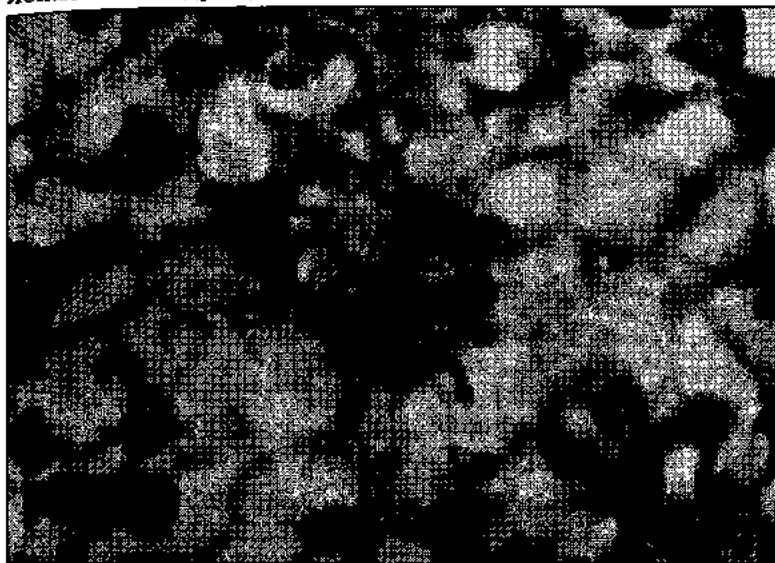


Рис. 1. Печень малька чавычи. Липоидная дегенерация гепатоцитов (4 степень). Увеличение $\times 1000$. Окрашивание гематоксилин-эозином

Жабры. Гиперплазию респираторного эпителия и слипание жаберных ламелл наблюдали от 20% у кеты на КЛРЗ и ВЛРЗ до 90% у нерки на МЛРЗ и кижуча на ВЛРЗ перед выпуском в естественные водоемы.

Желудочно-кишечный тракт. При отборе гистологических проб в период перехода на экзогенное питание у мальков нерки на МЛРЗ и ОЛРЗ, кеты на ПЛРЗ и КЛРЗ деструктивных изменений не отмечали. Перед выпуском в естественные водоемы в пилорическом отделе желудка у 90% молодых нерки на МЛРЗ отмечали локальный цитолиз эпителия слизистой оболочки и эпителиальных клеток кардиальных желез, очаговую деструкцию ворсинок. Деструкцию подслизистого и слущивание слизистого слоев, разрушение ворсинок и истончение мышечных слоев (Рис. 5) выявили у кижуча, оставленного на подращивание на ВЛРЗ.



Рис. 2. Цероидная дегенерация гепатоцитов в печени у малька нерки: отложение гранул цероида (Ц), некротизированные ядра (НЯ). Увеличение $\times 1000$. Окрашивание по Циль-Нильсену

У нерки с признаками патологии на МЛРЗ выявили деструктивные изменения пилорического отдела желудка. В очаге некроза обнаружили гифы и споры гриба неопределенного таксономического положения. У мальков нерки (10%, 09.06.03) и кеты (по 50%, 15.04.03 и 12.05.03) на ОЛРЗ регистрировали некроз, деструкцию клеток слизистого и подслизистого слоев пищевода, желудка и кишечника, вызванные простейшим паразитом рода *Hexamita*. Аналогичных простейших и более глубокие деструктивные изменения желудочно-кишечного тракта и паренхиматозных органов выявили у кеты с признаками патологии.

Головной мозг. Регистрировали очаговый некроз гранулированного слоя и зрительной доли мозжечка у кижуча, оставленного на подращивание на ВЛРЗ.

Липоидная дистрофия гепатоцитов 2–3 степени является обратимой при переходе на естественное питание. Дегенерация 4 степени и отложение цероида в печеночной паренхиме могут привести к гибели рыб. Она происходит постепенно и продолжается длительное время, даже после выпуска рыб в естественные водоемы [4, 8, 9].



Рис. 3. Почка сеголетка нерки. Фокальный пикноз, кариорексис (↑) клеток гемопоэтической ткани. Увеличение $\times 400$. Окрашивание гематоксилин-эозином



Рис. 4. Почка сеголетка нерки. Интерстициальный отек и локальная гиалиново-капельная дегенерация (↑) цилиндрического эпителия почечных канальцев. Увеличение $\times 400$. Окрашивание гематоксилин-эозином



Рис. 5. Цитоллиз цилиндрического эпителия слизистого слоя, разрушение ворсинок и мышечных слоев пилорического отдела желудка и придатков у сеголетка кижуча. Увеличение $\times 50$. Окрашивание гематоксилин-эозином

Жировая дистрофия печени вызывала нефроз, который сопровождался нарушением нормального функционирования почек и приводил к удержанию воды в организме и межклеточному отеку. При зернистой дегенерации печени продукты окисления вызывали некроз гемопоэтической ткани, уменьшение или остановку гемопоэза (анемию), в результате чего в кровяное русло выделялись незрелые эритроциты. Об отравлении организма токсинами, возможно, содержащимися в корме, свидетельствовали гиалиново-капельная дегенерация цилиндрического эпителия почечных канальцев и начальный нефрокальциноз. Некроз гемопоэтической ткани почки мог быть усугублен другими этиологическими агентами. Так, у мальков нерки, отобранных 12.05.03 на МЛРЗ, на состоянии почки сказалось негативное воздействие эндотоксинов бактерий.

Выявленные повреждения жабр также характерны для алиментарного токсикоза [14]. Эти изменения значительно уменьшают респираторную площадь и, следовательно, эффективность газообмена, в результате чего даже незначительное снижение содержания кислорода в воде может вызвать массовый отход среди пораженных рыб [6].

Деструктивные изменения в желудочно-кишечном тракте у кижуча на ВЛРЗ могли привести к повышенному отходу

молоди. У остальных исследуемых рыб встречаемость и степень тяжести гистопатологических изменений незначительны и обратимы при переходе на естественное питание.

У кижуча на ВЛРЗ, чавычи на МЛРЗ и кеты на КЛРЗ отмечали обилие жировых отложений в брюшной полости. Кроме этого, у кижуча на ВЛРЗ выявили атрофию ткани поджелудочной железы. У лососевых рыб отложение жира локализовано в мышцах [3], поэтому увеличение внутреннего жира и липоидная дегенерация печени являются признаками алиментарного заболевания. Степень ожирения печени у искусственно выращиваемых рыб свидетельствуют о неполноценности используемых кормов [9]. Известно также, что содержание жировых запасов в организме рыб характеризует уровень резистентности организма [1].

Таким образом, гистопатологические изменения, выявленные в печени, почке, жабрах и желудочно-кишечном тракте носят алиментарный характер. Большинство из них обратимы при переходе на сбалансированные корма или естественное питание, но существенно снижают иммунитет рыб и способствуют повышенной восприимчивости к заболеваниям различной этиологии.

Так, у 30% исследуемых мальков нерки с признаками патологии на ОЛРЗ отмечали деструкцию паренхимы тимуса. Поражение этого органа эндокринной системы является часто встречающимся деструктивным изменением у искусственно выращиваемых рыб при использовании кормов низкого качества [14]. У молоди нерки с признаками патологии на МЛРЗ выявили гифы и споры гриба неопределенного таксономического положения в очаге некроза пилорического отдела желудка и скелетной мускулатуры. Воздействие эндотоксинов бактерий на выделительную и кроветворную систему также оказывало негативное воздействие на иммунитет рыб. У мальков нерки и кеты на ОЛРЗ регистрировали деструктивные изменения клеток слизистого и подслизистого слоев пищевода, желудка и кишечника, вызванные простейшим паразитом рода *Hexamita*. Известно, что смертность при гексамитозе невысока, и наиболее часто болезнь возникает при ослаблении организма рыбы неблагоприятными условиями содержания и кормления. Главное условие предупреждения болезни — получение здоровых жизнестойких мальков и кормление их доброкачественными кормами [7]. Из медикаментозных средств используются фуразолидон, сернокислый магний, метронидазол, триптофлавин [6].

Наиболее выраженные деструктивные изменения выяви-

ли у мальков нерки на ОЛРЗ и кижуча на ВЛРЗ. Цероидная дегенерация гепатоцитов (20%), отмеченная у этих рыб перед выпуском в естественные водоемы, привела к повышенному отходу молоди как на заводах, так и после выпуска молоди в естественные водоемы. У кижуча, оставленного на подращивание, то есть находившегося на заводе более длительное время, кроме патологии печени, регистрировали необратимые деструктивные изменения в желудочно-кишечном тракте и нефрокальциноз в почке. Известно, что при подращивании на заводе снижается гибель мальков от хищных рыб, повышается их устойчивость к потоку воды, расширяется диапазон предпочитаемых молодью течений [5]. Большое значение имеет физиологическое состояние рыб, особенно их способность к осморегуляции [4]. Обнаруженные деструктивные изменения оказывают негативное влияние на готовность молоди к покатной и океанической миграции. Увеличение размерно-весовых показателей должно идти в основном за счет наращивания мышечной массы тела, а не жировых отложений. Для устранения патологического ожирения печени в рацион заводских рыб следует добавлять свежий корм [9]. Обязательным также является применение антидотных препаратов: метиленовый синий, хитозан [2].

По результатам гистологических и гистохимических исследований в жабрах, желудочно-кишечном тракте и паренхиматозных органах у молоди тихоокеанских лососей из бассейнов рек Авача, Паратунка и Большая структурных нарушений алиментарного характера не было выявлено.

ВЫВОДЫ

1. У искусственно выращиваемой молоди тихоокеанских лососей установлены: липоидная и цероидная дегенерация гепатоцитов; некроз гемопозитической ткани, гиалиново-капельная дегенерация цилиндрочечного эпителия почечных канальцев и нефрокальциноз почки, гиперплазия респираторного эпителия и слипание жаберных ламелл, увеличение внутренних жировых отложений и атрофия поджелудочной ткани, деструкция ворсинок пилорического отдела желудка, очаговый некроз гранулированного слоя зрительной доли и мозжечка.

2. Выявленные изменения характерны для алиментарного токсикоза и связаны с тем, что искусственно выращиваемая заводская молодь тихоокеанских лососей получала несбалансированные или недоброкачественные корма. Сте-

пень тяжести деструктивных изменений варьирует в зависимости от вида рыб и длительности кормления.

3. Наиболее выраженные деструктивные изменения отмечали у мальков нерки на ОЛРЗ и кижуча на ВЛРЗ.

4. Обнаруженные гистопатологические изменения обратимы при переходе на сбалансированные корма или естественное питание, хотя они существенно ослабляют резистентность организма рыб и, как следствие, увеличивают восприимчивость к заболеваниям различной этиологии.

5. Цероидная дегенерация гепатоцитов (20%), регистрируемая перед выпуском в естественные водоемы у мальков кижуча на ВЛРЗ и нерки на ОЛРЗ, возможно, привела к повышенному отходу молоди как на заводах, так и после выпуска в естественные водоемы.

6. При искусственном выращивании лососевых рыб необходим постоянный контроль за качеством используемых кормов. Очень важна и ранняя диагностика алиментарных заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вейдемейер Г.А., Мейер Ф.П., Смит Л. Стресс и болезни рыб. М.: Лег. и пищ. пром-сть. 1981. 127 с.

2. Головин П.П., Головина Н.А., Цылев О.П. Алиментарные болезни рыб: диагностика и профилактика. // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре. Тезисы научно-практич. конф. М. Россельхозакадемия. 2000. С. 49-50.

3. Грищенко Л.И., Акбаев М.Ш., Васильков Г.В. Болезни рыб и основы рыбоводства. М.: Колос. 1999. 456 с.

4. Запорожец О.М., Запорожец Г.В., Толстяк Т.И. Исследование влияния плотности посадки и интенсивности водообмена на рост и физиологическое состояние молоди кеты и кижуча // Сб. науч. тр. КамчатНИРО: Исследования биологии и динамики численности промысловых рыб Камчатского шельфа. Петропавловск-Камчатский. 1995. С. 78-88.

5. Канидьев А.Н. Биологические основы искусственного разведения лососевых рыб. М. Лег. и пищ. пром-сть. 1984. 216 с.

6. Мирзоева Л.М. Алиментарные болезни рыб // Общ. инф. Рыбохозяйственное использование внутренних водоемов. М.: Рыб. хоз. 1990. Вып. 4. С. 1-68.

7. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. Под ред. Яременко Н.А. М.: Отдел маркетинга АМБ-агро. 1998. 307 с.

8. Патологическая анатомия. Под ред. Пальцева М.А., Аничкова Н.М. 2000. Т. 1. 528 с.

9. Факторович К.А. Алиментарные заболевания рыб // Биологические основы рыбоводства: паразиты и болезни рыб. М.: Наука. 1984. С. 144-159.

10. Bruno D.W., Poppe T.T. A colour atlas of Salmonid diseases // Harcourt Brace and Co. Publ. 1996. 186 p.

11. Bucke D. Cataracts in farmed fish - a multidisciplinary initiative for scientific progress: histological techniques for teleost eyes // Bull. of the European Ass. of Fish Path. 1998. V. 18. P. 121-123.

12. Culling C.F.A., Allison R.T., Barr W.T. Cellular pathology technique. 4th ed. Butterworths // Co. Publ. LTD. London. 1985. P. 3-163.

13. Daskalov H., Grozeva N., Stoev S. Hepatic lipoidosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) – influence of pathomorphological changes upon flesh quality // Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 1999. V. 19(1). P. 20-23.

14. Ferguson H.W. Systematic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of Teleosts. 3rd ed. Iowa State Univ. Press Ames. 1995. 267 p.

**HISTOPATHOLOGICAL CHANGES AT THE
ALIMENTARY TOXICOSIS IN ARTIFICIAL
GROWTHING NEWLY-HATCHED FISH OF PACIFIC
SALMONS AT FISH-BREEDING
FACTORIES OF KAMCHATKA**

T.V.Gavrjuseva

*The Kamchatka scientific research institute of a fish
facilities and oceanography ,
683000, Petropavlovsk - Kamchatka*

In the present research the data histologic and histochemical the researches of salmon of sort *Oncorhynchus* which has been carried out in 2003 at 5 salmon fish-breeding factories of Kamchatka are given. Are described destructive changes in a liver, a kidney, gills, a gastroenteric path, a pancreas and a brain, revealed at an alimentary toxicosis.

ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ВОДЫ И СОДЕРЖАНИЯ РТУТИ В КОРМЕ НА УСТОЙЧИВОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ КАРБОГИДРАЗ КАРПА К ДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ.

И.Л. Голованова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
152742 Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н*

Исследовано влияние повышения температуры воды и содержания ртути в корме на устойчивость карбогидраз пищеварительного тракта молоди карпа к действию тяжелых металлов *in vitro*. Резкое увеличение температуры воды на фоне высокой функциональной активности пищеварительной системы может значительно усиливать негативный эффект меди и цинка. Повышенное содержание ртути в корме (0.3-0.4 мг/кг) снижает показатели линейно-весового роста, уровень активности карбогидраз, а также устойчивость амилазы, осуществляющей начальные этапы пищеварения, к действию кадмия. Полученные результаты свидетельствуют о том, что резкое повышение температуры воды и высокое содержание ртути в корме могут снижать устойчивость пищеварительных карбогидраз молоди карпа к действию тяжелых металлов, негативно влияя на эффективность питания рыб.

ВВЕДЕНИЕ

Экологическое неблагополучие многих рыбохозяйственных водоемов часто связано с наличием в них токсичных веществ, снижающих резистентность гидробионтов и способствующих возникновению различных заболеваний. Поскольку иммунный статус рыб в значительной мере связан с состоянием пищеварительной системы, несомненный интерес представляет изучение влияния тяжелых металлов, поступающих с естественным кормом, на активность ферментов, гидролизующих углеводные компоненты пищи. Одними из самых опасных в экотоксикологическом отношении элементов являются ртуть, кадмий, медь и цинк. Эти металлы в значительных количествах накапливаются в различных тканях и органах гидробионтов, оказывая негативное влияние на различные морфофизиологические и биохимические показатели, изменяя скорость потребления и ассимиляции пищи [1]. Значительные изменения активности и кинетических характеристик пищеварительных карбогид-

раз рыб в присутствии тяжелых металлов (Hg, Cd, Cu, Zn) были показаны ранее как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* [3, 6, 7]. В то же время несомненный интерес представляет изучение влияния ртути, поступающей с естественным кормом, на устойчивость пищеварительных ферментов, гидролизующих углеводные компоненты пищи, к действию других тяжелых металлов.

Термальное и химическое загрязнение водоемов в результате природных и антропогенных воздействий часто приводит к функционированию пищеварительной системы рыб в условиях, близких к экстремальным. Так, внезапное увеличение температуры воды в естественных и искусственных водоемах, особенно в зонах сброса подогретых вод атомных и тепловых электростанций, часто приводят к массовой гибели рыб [2]. Влияние температуры на активность пищеварительных ферментов у пресноводных рыб детально изучено, при этом установлено, что ферментные системы пищеварительного тракта рыб хорошо адаптированы к функционированию в широком диапазоне температур [5]. Однако резкое повышение температуры воды в осенне-зимний период оказывает негативное влияние на скорость гидролиза белковых и углеводных компонентов пищи в кишечнике пресноводных рыб [3]. В то же время влияние повышения температуры окружающей среды на устойчивость пищеварительных гидролаз рыб к действию меди и цинка, являющихся необходимыми элементами для функционирования организма животных, ранее не исследовалось.

Цель работы состояла в изучении влияния повышения температуры воды и содержания ртути в корме на устойчивость карбогидраз пищеварительного тракта молоди карпа к действию тяжелых металлов *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первой серии экспериментов изучали влияние повышения температуры окружающей среды на устойчивость пищеварительных карбогидраз к действию меди и цинка. В течение двух недель сеголетков карпа *Cyprinus carpio* (L.), массой 10.2 ± 0.8 , содержали в аквариумах при температуре акклимации 3°C зимой и 20°C летом. Затем 4 группы рыб (по 6 особей) помещали в аквариумы объемом 60 л. В контрольных аквариумах рыбы содержались при температуре акклимации, в опытных аквариумах температуру воды повышали со скоростью 50°C/час до достижения уровня верх-

ней летальной температуры. Всех карпов кормили 1 раз в день рыбным фаршем и сухим комбикормом в объеме 3-4% от общей массы тела в сутки. По окончании эксперимента у рыб изымали желудочно-кишечный тракт и готовили суммарные гомогенаты кишечника, используя раствор Рингера для холоднокровных животных (110 mM NaCl, 1.9 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, pH 7.4). Общую амилолитическую активность определяли у особой опытной и контрольной групп в присутствии меди и цинка (CuSO₄ и ZnSO₄, номинальная концентрация 0.1, 1, 5, 10 и 25 мг/л по металлу).

Во второй серии экспериментов оценивали хроническое влияние повышенной концентрации ртути в корме на устойчивость карбогидраз пищеварительного тракта карпа к действию кадмия *in vitro*. Молодь карпа (масса 9.9±0.5 г), полученную от одной пары производителей и находившуюся в пруду на естественной кормовой базе в течение 5 мес, помещали в экспериментальные лотки. В течение 6 мес карпа кормили рыбным фаршем, содержащим разное количество ртути: для контрольных рыб - менее 0.02 мг/кг (фоновая концентрация в водоеме), для особой опытной группы - 0.3-0.4 мг/кг. В гомогенатах кишечника опытных и контрольных рыб определяли общую амилолитическую активность, а также активность α-амилазы и сахаразы в отсутствие (контроль) и в присутствии различных концентраций кадмия (CdSO₄, номинальная концентрация 0.5, 5, 25 и 50 мг/л по общему кадмию). Общую амилолитическую активность (суммарная активность α-амилазы, КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы, КФ 3.2.1.3. и ферментов группы мальтаз, КФ 3.2.1.20), а также активность сахаразы, КФ 3.2.1.48, оценивали по приросту гексоз за 1 мин инкубации в расчете на 1 г сырой массы ткани (мкмоль/(г·мин)) при помощи метода Нельсона в модификации А. М. Уголева и Н. Н. Иезуитовой [4]. Активность α-амилазы, КФ 3.2.1.1, определяли методом Смита и Роя в модификации А.М. Уголева [4] и выражали в мг крахмала, гидролизованного за 1 мин инкубации в расчете на 1 г сырой массы ткани (мг/(г·мин)).

Результаты обработаны статистически с использованием ANOVA и последующей оценкой различий при помощи LSD теста [8], $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что у сеголетков карпа при скорости нагрева воды 50°C/час в летний период уровень общей амилоли-

тической активности в слизистой кишечника значительно повышается (Рис. 1), зимой — достоверно снижается (Рис. 2). Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными ранее для серебряного караса *Carassius auratus* (L.) и свидетельствуют о том, что резкое повышение температуры воды в осенне-зимний период оказывает более пагубное влияние на пищеварительные гидролазы по сравнению с другими сезонами года [3]. Низкие концентрации меди могут оказывать стимулирующее действие на активность карбогидраз, в то время как более высокие концентрации вызывают достоверное торможение. При этом медь вызывает больший токсический эффект по сравнению с цинком.

Так, в летний период у карпа снижение ферментативной активности в присутствии меди в концентрации 10-25 мг/л составляет 86-89% от контроля, в присутствии цинка торможения активности не отмечено (Рис. 1).

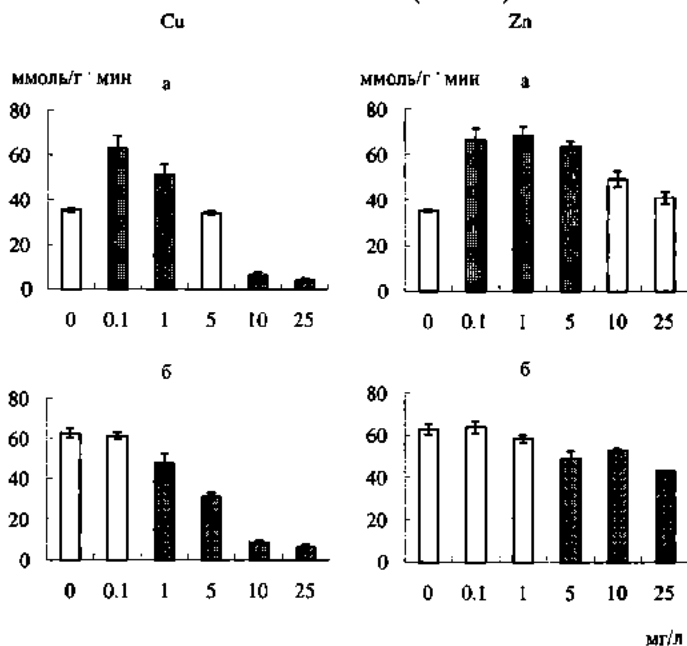


Рис. 1. *In vitro* влияние различных концентраций Cu и Zn на общую амилолитическую активность в слизистой кишечника сеголетков карпа в летний период при скорости нагрева воды 0°C/час (а) и 50°C/час (б). По оси ординат: общая амилолитическая активность (мкмоль/ (г·мин)); по оси абсцисс: концентрация металла, мг/л. Разная окраска столбиков - различия статистически достоверны по сравнению с контролем (концентрация металла 0 мг/л), $p < 0.05$. ($n = 12$ экз).

Зимой на фоне низкой функциональной активности пищеварительной системы резкое повышение температуры воды снижает активность карбогидраз в кишечнике карпа на 40% от контроля, однако тормозящее действие меди и цинка практически не изменяется по сравнению с летним периодом (Рис. 2). В то же время летом отмечено значительное повышение чувствительности карбогидраз к действию исследованных металлов при резком увеличении температуры воды (Рис. 1). Этот факт обусловлен как увеличением силы тормозящего эффекта при одной и той же концентрации металла, так и снижением активности ферментов при более низких концентрациях Cu и Zn. Действительно, в летний период в присутствии Cu в концентрации 5 мг/л у карпа контрольной группы снижение активности составляет 3%, в то время как при скорости нагрева воды 50°С/час – 37%; общая амилолитическая активность в кишечнике карпа в контроле достоверно снижается при концентрации меди 10 и 25 мг/л, при скорости нагрева воды 50°С/час – при концентрации 1, 5, 10 и 25 мг/л.

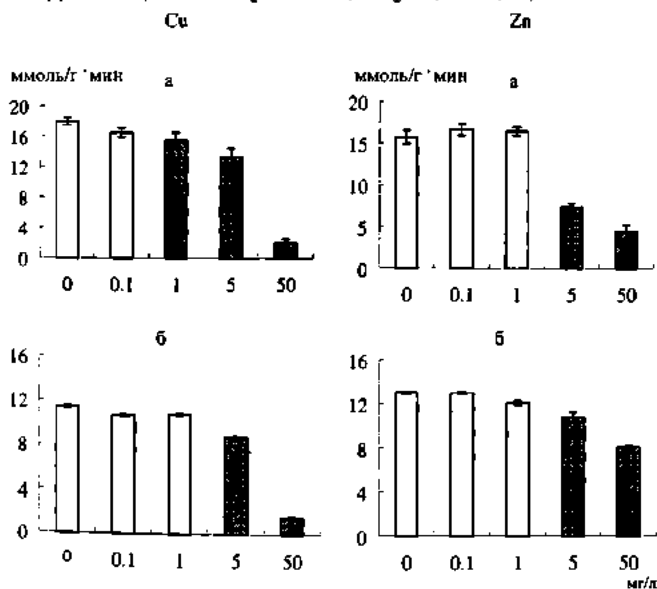


Рис. 2. *In vitro* влияние различных концентраций Cu и Zn на общую амилолитическую активность в слизистой кишечника сеголетков карпа в зимний период при скорости нагрева воды 0°С/час (а) и 50°С/час (б). По оси ординат: общая амилолитическая активность (мкмоль/г·мин); по оси абсцисс: концентрация металла, мг/л. Разная окраска столбиков - различия статистически достоверны по сравнению с контролем (концентрация металла 0 мг/л), $p < 0.05$. ($n = 12$ экз).

Повышенные концентрации ртути в корме оказывают негативное влияние как на линейно-весовые, так и на физиолого-биохимические показатели карпа. Так, масса сеголетков при фоновых концентрациях ртути (12.84 ± 0.65 г) была достоверно выше ($p < 0.05$) массы рыб при повышенных концентрациях ртути в корме (9.94 ± 0.39 г). Длина тела составляла 7.3 ± 0.1 и 7.0 ± 0.1 см у тех и других соответственно.

Активность всех исследованных карбогидраз у рыб, получавших корм с высоким содержанием ртути, достоверно ниже активности ферментов особой контрольной группы на 18-36%. Общая амилолитическая активность составляла 137.7 ± 2.6 и 89.3 ± 2.0 мкмоль/(г·мин), активность α -амилазы - 448.4 ± 12.1 и 285.3 ± 4.7 мг/(г·мин), активность сахаразы - 2.8 ± 0.1 и 2.3 ± 0.1 мкмоль/(г·мин) у контрольных и опытных рыб соответственно ($n=10$).

При исследовании влияния кадмия *in vitro* на активность различных ферментов цепи карбогидраз у карпа, получавшего корм с фоновым и повышенным содержанием ртути, выявлены однонаправленные, но разные по степени воздействия эффекты. Общая амилолитическая активность достоверно не изменяется при концентрации 0.5-5 мг/л и уменьшается на 17-21% при концентрации кадмия 25-50 мг/л как у контрольных, так и у опытных рыб ($p < 0.001$). Активность сахаразы (маркерного фермента мембранного пищеварения) достоверно снижается в присутствии кадмия в концентрации 5-50 мг/л на 22-29% у рыб контрольной и на 30-35% у рыб опытной группы ($p < 0.001$). При этом статистически достоверного взаимодействия двух факторов - присутствия кадмия и экспозиции к повышенным концентрациям ртути - как в случае сахаразы, так и общей амилолитической активности не обнаружено. Однако у рыб, получавших корм с более высоким содержанием ртути, отмечено достоверное снижение устойчивости α -амилазы (фермента, осуществляющего начальные этапы переваривания углеводов) к действию кадмия ($F=76.9$, $p=0.0000$). Несмотря на то, что одни и те же концентрации этого металла вызывают достоверный негативный эффект, степень торможения ферментативной активности у карпов с фоновым и повышенным содержанием ртути в корме различна (Рис. 3). Так, у рыб контрольной группы активность α -амилазы достоверно снижается на 12, 43 и 60%, у рыб опытной группы - на 40, 60 и 67% от контроля при концентрации кадмий 5, 25 и 50 мг/л ($p < 0.05$).

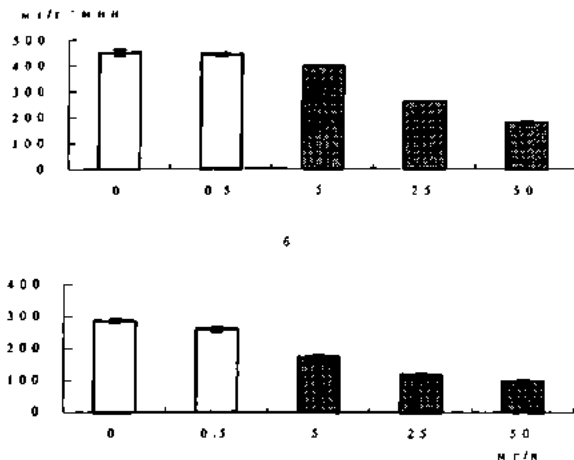


Рис. 3. *In vitro* влияние различных концентраций Cd на активность α -амилазы в слизистой кишечника сеголетков карпа с фоновым < 0.02 мг/кг (а) и повышенным 0.3-0.4 мг/кг (б) содержанием ртути в корме. По оси ординат: активность α -амилазы (мг/г·мин); по оси абсцисс: концентрация кадмия, мг/л. Разная окраска столбиков - различия статистически достоверны по сравнению с контролем (концентрация металла 0 мг/л), $p < 0.05$. (n = 10 экз).

ВЫВОДЫ

Показано, что увеличение температуры окружающей среды в летний период достоверно повышает общую амилолитическую активность в слизистой оболочке кишечника у молоди карпа, в зимний период - значительно снижает. Резкое повышение температуры воды на фоне высокой функциональной активности пищеварительной системы может значительно усиливать негативный эффект меди и цинка, снижая активность карбогидраз и эффективность усвоения рыбами углеводных компонентов корма. Результаты, полученные при изучении хронического действия различных концентраций ртути в корме, свидетельствуют о негативном влиянии повышенного содержания этого металла на морфометрические и физиолого-биохимические показатели сеголетков карпа. Длительное воздействие высоких концентраций ртути снижает показатели линейно-весового роста, а также активность пищеварительных ферментов, осуществляющих гидролиз углеводных компонентов корма. При этом

высокие концентрации ртути в корме могут значительно снижать устойчивость карбогидраз, осуществляющих начальные этапы пищеварения, к действию других тяжелых металлов (в частности кадмия), снижая тем самым эффективность переваривания пищи, устойчивость к действию неблагоприятных факторов среды и негативно влияя на иммунный статус рыб.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 01-04-49120).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алабастер Дж., Ллойд Р. Критерии качества воды для пресно-водных рыб. М.: Легкая и пищ. пром-сть, 1984. 344 с.
2. Голованов В.К. Влияние дополнительного тепла. Рыбы / Гл. 9. Биологические последствия антропогенного воздействия // Экологические проблемы Верхней Волги. Ярославль, 2001. С. 295–302.
3. Голованова И.Л., Кузьмина В.В., Голованов В.К. Воздействие высоких температур на пищеварительные гидролазы серебряного карася *Carassius carassius* L. // Вопр. ихтиол. 2002. № 1. С. 121-128.
4. Уголев А.М., Иезуитова Н.Н. Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов Л.: Наука, 1969. 216 с.
5. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеиздат, 1993. 238 с.
6. Golovanova I.L., Chuiko G.M., Pavlov D.F. Effects of cadmium, Naphthalene and DDVP on Gut Carbohydrases Activity in Bream (*Abramis brama* L.) and Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) // Bull. Envir. Contam. Toxicol. 1994. V. 52. N 3. P. 338 -345.
7. Golovanova I.L., V.V. Kuz'mina, T.E. Gobzhelian, D.F. Pavlov, G.M. Chuiko. In vitro effects of cadmium and DDVP (Dichlorvos) on intestinal carbohydrase and protease activities in freshwater teleost // Comp. Biochem. Physiol. 1999. Vol. 122 C. P. 21-25.
8. Sokal R.R., Rohlf F.J. Biometry. N.Y.: Freeman and company, 1995. 887 p.

EFFECT OF INCREASE OF WATER TEMPERATURE AND MERCURY CONTENTS IN FORAGE UPON CARP DIGESTIVE CARBOHYDRASE STABILITY TO HEAVY METALS.

I.L. Golovanova

*Institute for Biology of Inland Water RAS, 152742 Borok,
Russia*

The influence of increase of water temperature and mercury contents in forage on carp digestive carbohydrase stability to heavy metals in vitro is analysed. The sharp increase of water temperature can considerably increase negative effect copper and zinc at high functional activity of digestive system. The increased contents of mercury in a forage (0.3-0.4 mg/kg) reduce parameters of linear - weight growth, carbohydrase activity and the stability of α -amylase, carrying out the initial stages of digestion, to cadmium. The received data testify that sharp increase of water temperature and high mercury contents in a forage can reduce stability of carp digestive carbohydrase to heavy metals, negatively influencing on efficiency of fish feeding.

УДК 597.587.9

СОСТОЯНИЕ ПОЛОВЫХ И ИНТЕРРЕНАЛОВОЙ ЖЕЛЕЗ У ПОЛОСАТОЙ КАМБАЛЫ *PLEURONECTES PINNIFASCIATUS* ИЗ АМУРСКОГО ЗАЛИВА ЯПОНСКОГО МОРЯ

В.Б. Дуркина

*Институт биологии моря ДВО РАН, 690041 Владивосток, ул.
Пальчевского, 17*

Известно, что антропогенное загрязнение оказывает повреждающее действие на функционально взаимосвязанные друг с другом железы рыб — половые и интерреналовую. Имеющиеся в литературе крайне ограниченные данные позволяют предполагать, что низкие репродуктивные характеристики у рыб могут определяться активностью их стероидогенной интерреналовой ткани. В настоящей статье обобщены данные по состоянию интерреналовой железы и репродуктивной системы у полосатой камбалы *Pleuronectes pinnifasciatus* из Амурского залива (Японского моря), у которой в течение трех нерестовых сезонов наблюдается массовое разрушение зрелых половых продуктов. Амурский залив является одним из наиболее загрязненных в заливе Петра Великого Японского моря. Показано, что у камбалы вы-

является повреждение ооцитов на всех стадиях репродуктивного цикла. Одной из причин формирования некачественных половых клеток у полосатой камбалы может быть истощение стероидогенной ткани.

Хорошо известно, что антропогенное загрязнение акваторий оказывает повреждающее действие на репродуктивную функцию рыб [1, 2, 9, 21]. Как было отмечено ранее [12], для анализа процессов воспроизводства у рыб представляет большой интерес изучение интерреналовой железы. Стероидогенная интерреналовая железа является гомологом коры надпочечников млекопитающих. Установлено, что основным гормоном стероидогенных клеток костистых рыб является кортизол [28]. Повышенные уровни кортизола в плазме крови рыб отмечают в период вителлогенеза [29], а также на заключительных стадиях созревания ооцитов и во время овуляции [19, 22, 29, 31 – 33]. Считают, что кортизол может играть ряд важных ролей, включая регуляцию финального созревания ооцита [20, 27], овуляцию [23], нерестовое поведение [18]. Интерреналовая железа в свою очередь испытывает влияние со стороны половых гормонов. Так, введение рыбам после гонадэктомии андрогенов и эстрогенов вызывает гипертрофию интерреналовой ткани [34]. Интересно отметить, что у рыб, имеющих в нерестовый период признаки снижения функциональной активности интерреналовых клеток и низкий уровень кортизола в плазме крови, выявлена низкая плодовитость [30]. Одним из морфологических признаков, по которому судят о функциональной активности стероидогенных клеток, является объем их ядер. На ряде видов установлено, что на ранних стадиях гаметогенеза ядра эндокринных клеток имеют минимальные размеры, затем, по мере развития гонад, они увеличиваются и перед нерестом достигают максимума; кроме того, у рыб перед нерестом наблюдается гипертрофия клеток железы [3, 10, 11].

В последние годы появилась информация, что хроническое антропогенное загрязнение отрицательно влияет на функционирование интерреналовой ткани рыб [4, 5, 8, 24-26, 35]. Кроме того, показано, что при глубоких нарушениях функции гонад, вызванных загрязнением среды обитания, в плазме крови рыб выявляют низкий уровень кортизола [6]. Это позволяет предположить, что одной из причин снижения качества половых продуктов при действии загрязняющих веществ является повреждение стероидогенной ин-

терреналовой железы.

В настоящей статье обобщены результаты исследования оогенеза и состояния интерреналовой железы у полосатой камбалы *Pleuronectes pinnifasciatus* из Амурского залива (зал. Петра Великого) Японского моря, у которой обнаружено массовое разрушение овариальных фолликулов в течение трех нерестовых сезонов (2001-2003 гг.). Полосатая камбала является типичным представителем икhtiофауны Амурского залива. Этот вид в течение всего года придерживается мелководья, совершая самые незначительные сезонные миграции, а в январе приближается к берегу для нереста [13]. Известно, что Амурский залив, и особенно его северо-восточная часть, где отлавливали камбал, характеризуются крайне неблагоприятной экологической ситуацией. В воде и донных осадках залива содержатся тяжелые металлы, нефтепродукты и хлорорганические пестициды, причем концентрация химических веществ в донных отложениях и придонном слое воды намного выше, чем в водной толще [7].

Компактная интерреналовая железа камбалы локализована в головной части каждой из почек. Клетки железы формируют двухслойные эпителиальные тяжи, между которыми находится хорошо развитая система кровеносных капилляров. В марте объем ядер интерреналовых клеток полосатой камбалы составляет $63,4 \pm 5,5$ мкм². Яичники рыб в этот период находятся на II стадии зрелости (для определения стадий зрелости гонад камбал использовали шкалу, предложенную О.Ф. Сакун и Н.А. Бупкой [16]). В них происходит разрушение всех превителлогенных ооцитов, в цитоплазме которых имеются интенсивно окрашивающиеся гематоксилином концентрические структуры, соответствующие описанным ранее [14] зонам накопления РНК в ооцитах лососевых рыб. Поврежденными остаются лишь мелкие, не вступившие в фазу цитоплазматического роста половые клетки. Некоторые авторы [17] отмечают, что тотальная дегенерация ооцитов периода цитоплазматического роста – явление не редкое, и в ряду аномалий гонад встречается довольно часто. Она может наблюдаться как при изменении температурного режима, так и при хроническом загрязнении среды обитания рыб.

В мае объем ядер интерреналовых клеток составляет $45,1 \pm 1,9$ мкм². Яичники все еще находятся на II стадии зрелости. Те превителлогенные ооциты, которые сохранились в марте, в мае заканчивают цитоплазматическую фазу

роста. У многих рыб ооциты характеризуются низким тургором, что выражается в деформации гамет и их ядер. В яичниках также присутствуют мелкие превителлогенные ооциты с темноокрашенной гомогенной цитоплазмой. Деформация половых клеток рыб может быть одним из следствий действия загрязняющих веществ; ее связывают с нарушением тургора и уменьшением прочности оболочек гамет [1].

В августе объем ядер стероидогенных клеток достигает наиболее низких значений — $27,2 \pm 4,9$ мкм³. В эпителиальных тяжах появляются просветы между стероидогенными клетками. Яичники полосатой камбалы находятся на III стадии зрелости; для них характерно наличие вителлогенных (с интенсивной вакуолизацией цитоплазмы) и превителлогенных ооцитов. У половины из всех исследованных самок вакуолизация цитоплазмы ооцитов начинается непосредственно под радиальной оболочкой, тогда как у других особей в яичниках достаточно много гамет, в которых вакуолизация цитоплазмы происходит не под радиальной оболочкой, а ближе к их центральной части; как правило, эти ооциты являются деформированными.

В октябре объем ядер интерреналовых клеток составляет $41,8 \pm 3,1$ мкм³; у некоторых камбал встречаются патологические изменения в железе. На этих участках, которые могут занимать до 1/3 эндокринной ткани, эпителиальные тяжи раздуваются и расслаиваются, что приводит к сдавливанию кровеносных капилляров, а клетки железы теряют контакт друг с другом, округляются и сливаются. Яичники рыб в этот период находятся на IV стадии зрелости; в них встречаются превителлогенные и вителлогенные ооциты. В вителлогенных ооцитах среди гранул желтка нередко встречаются небольшие участки гомогенизированного трофического материала, что является показателем перезревания гамет. Кроме того, ооциты в яичниках одной самки могут различаться по интенсивности окраски эозином их содержимого. Встречаются клетки, в которых трофический материал окрашен равномерно по всему их объему; встречаются гаметы со слабо окрашенными желточными гранулами либо в центральной части клетки, либо по всему ее объему. В яичниках также имеются разрушающиеся ооциты. Резорбции подвергаются именно те половые клетки, в которых на III стадии зрелости яичников вакуолизация цитоплазмы начиналась не под радиальной оболочкой, а ближе к центральной части гамет. Маркером этих ооцитов служат

гомогенные периферические участки цитоплазмы, в которых отсутствуют желточные гранулы.

В начале нерестового периода (январь) объем ядер стероидогенных клеток составляет $48,5 \pm 1,6$ мкм³. Для яичников полосатой камбалы на V стадии зрелости характерно наличие многочисленных ооцитов, находящихся на разных стадиях разрушения. Среди них различаются клетки с желточными гранулами, с гомогенизированным содержимым, а также обводненные ооциты. Интересно отметить, что в яичниках кроме погибающих гамет встречаются немногочисленные опустевшие фолликулы — свидетельство прошедшего нереста.

К концу нерестового сезона интерреналовая железа камбал, как и у других видов рыб, разрушается. В яичниках на VI-II стадии зрелости присутствуют немногочисленные првителлогенные ооциты с гомогенной цитоплазмой и атретичные фолликулы.

Таким образом, у полосатой камбалы из Амурского залива (зал. Петра Великого Японского моря) наблюдается нарушение оогенеза и необычный, по сравнению с другими видами рыб [3, 10, 11, 15], характер изменений в интерреналовой железе в течение репродуктивного цикла. Прежде всего, обращает на себя внимание максимальный объем ядер клеток стероидогенной ткани на ранних стадиях оогенеза, тогда как у других исследованных рыб величина ядер в этот период самая низкая. Далее объем ядер стероидогенных клеток у полосатой камбалы, в отличие от других рыб, продолжает снижаться и достигает минимума к началу процесса накопления трофических веществ в ооцитах. Затем объем ядер начинает возрастать но, перед нерестом он все же остается ниже, чем на ранних стадиях оогенеза, тогда как у других рыб величина ядер стероидогенных клеток перед нерестом достигает максимального значения. Характер активности интерреналовой ткани полосатой камбалы, по-видимому, складывается в результате совмещения двух функций, которые присущи интерреналовой железе рыб — способности развивать стрессовую реакцию в ответ на раздражение [26] и гормональной регуляции процессов размножения что, в итоге, может оказать негативное действие на качество формирующихся половых клеток. Об истощении эндокринной железы рыб свидетельствуют нарушение межклеточных контактов в ней в период вителлогенеза, атрофия ее участков в конце вителлогенеза, низкий объем ядер стероидогенных клеток перед нерестом.

1. Акимова Н.В., Рубан Г.И. Систематизация нарушений воспроизводства осетровых (Acipenseridae) при антропогенном воздействии // Вопр. ихтиологии. 1996. Т. 36. № 1. С. 65–80.
2. Багнюкова Т.В., Овен Л.С. Порционная плодовитость и нарушения гонадо- и гаметогенеза у некоторых черноморских рыб с многопорционным типом нереста // Вопр. ихтиологии. 1999. Т. 39. № 1. С. 98–104.
3. Баранникова И.А., Васильева Е.В., Тренклер И.В., Цепелован П.Г. Интерреналовая железа в жизненном цикле проходных осетровых (сем. Acipenseridae) // Вопр. ихтиологии. 1978. Т. 18 Вып. 4 (111). С. 719–734.
4. Баранникова И.А., Баюнова Л.В., Саенко И.И. Динамика половых стероидных гормонов у осетра *Acipenser gueldenstaedtii* при различном состоянии гонад в начале анадромной миграции в Волгу // Вопр. ихтиологии. 1997. Т. 37. № 3. С. 400–406.
5. Баранникова И.А., Баюнова Л.В., Дюбин В.П., Саенко И.И., Семенкова Т.Б. Содержание кортизола в сыворотке крови и функция интерреналовой железы в жизненном цикле осетра *Acipenser gueldenstaedtii* // Вопр. ихтиологии. 2000. Т. 40. № 3. С. 379–388.
6. Баранникова И.А., Баюнова Л.В., Саенко И.И., Семенкова Т.Б. Содержание стероидных гормонов в сыворотке крови осетра *Acipenser gueldenstaedtii* при нарушениях репродуктивной функции по сравнению с нормальным циклом // Вопр. ихтиологии. 2002. Т. 42, № 2. С. 221–224.
7. Ващенко М.А. Загрязнение залива Петра Великого Японского моря и его биологические последствия // Биол. моря. 2000. Т. 26. № 3. С. 149–159.
8. Дуркина В.Б. Морфологические изменения в интерреналовой железе полосатой камбалы *Pleuronectes rinnifasciatus* (Pleuronectidae) из Амурского залива Японского моря в течение репродуктивного цикла // Вопр. ихтиологии. 2002. Т. 42. № 1. С. 141–144.
9. Дуркина В.Б. Массовое разрушение овариальных фолликулов и его особенности у полосатой камбалы *Pleuronectes rinnifasciatus* из Амурского залива Японского моря // Вопр. ихтиол. 2003. Т. 42. № 2. С. 286–288.
10. Межнин Ф.И. Интерреналовая ткань налима *Lota lota* (L.) во время нереста // Вопр. ихтиологии. 1975. Т. 15. Вып. 2 (91). С. 311–316.

11. Межнин Ф.И. Интерреналовая и супрареналовая железы и тельца Станниуса окуня в нерестовый период // Научные доклады высшей школы. Биологические науки. 1977. Т. 11. С. 62-69.

12. Межнин Ф.И. Интерреналовая железа в филогенезе низших позвоночных. // Успехи совр. биол. 1980. Т.89. Вып. № 2. С. 253-265.

13. Моисеев П.А. Промысловые камбалы Дальнего Востока. Владивосток: Примиздат, 1946. 61 с.

14. Персов Г.М. Дифференцировка пола у рыб. Л.: Изд-во ЛГУ, 1975. 148 с.

15. Поляков В.И., Максимович А.А. Морфометрическое исследование ультраструктур клеток интерреналовой ткани горбуши в период нерестовой миграции // Цитология. 1980. Т. 22. № 8. С. 907-913.

16. Сакун О.Ф., Буцкая Н.А. Определение стадий зрелости и изучение половых циклов рыб. Мурманск: Изд-во ПИНО, 1968. 47 с.

17. Шарова, Ю.Н., Кауфман З.С., Лукин А.А. Оогенез рыб Европейского Севера России при техногенном загрязнении. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2003. 130 с.

18. Bry C. Plasma cortisol levels in female rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at the end of reproductive cycle: relationship with oocyte stages // Gen. Comp. Endocrinol. 1985. V. 57. № 1. P. 47-52.

19. Bry C. Plasma cortisol profiles of female rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at the end of the reproductive cycle: temporal relationship with 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone-levels, oocyte maturation, and ovulation, based on daily samplings of individual fish // Gen. and Comp. Endocrinol. 1989. V. 74. № 2. P. 253.

20. Cook A.F., Stacey N.E., Peter R.E. Perioviulatory changes in serum cortisol levels in the goldfish, *Carassius auratus* // Gen. Comp. Endocrinol. 1980. V. 40. № 4. P. 507-510.

21. Cross J.N., Hose J.E. Evidence for impaired reproduction in white croaker (*Genyonemus lineatus*) from contaminated areas off Southern California // Mar. Environ. Res. 1988. V. 24. № 1-4. P. 185-188.

22. Fuller J. D., Scott D. B. C., Fraser R. The reproductive cycle of *Coregonus lavaretus* (L) in Loch Lomond, Scotland, in relation to seasonal changes in plasma cortisol concentration // J. Fish Biol. 1976. V. 9. P. 105-117.

23. Hirose K., Ishida R. Effects of cortisol and human chorionic gonadotropin (HCG) on ovulation in ayu *Plecoglossus*

altivelis (Temminck and Schlegel) with special respect to water and ion balance // *J. Fish Biol.* 1974. V. 6. № 5. P. 557-564.

24. Hontela A., Rasmussen J.B., Audet C., Chevalier G. Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1992. V. 22. P. 278-283.

25. Hontela A., Daniel C., Rasmussen J.B. Structural and functional impairment of the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish exposed to bleached kraft mill effluent in the St Maurice River, Quebec // *Ecotoxicology*. 1997. V. 6. P. 1-12.

26. Hontela A. 1998. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: *in vivo* and *in vitro* assesment // *Environmental Toxicology and Chemistry*. V. 17. № 1. P. 44-48.

27. Jalabert B. *In vitro* oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pike (*Esox lucius*) and goldfish (*Carassius auratus*) // *J. Fish. Res. Can.* 1976. V. 33. № 5. P. 974-988.

28. Jiang J.-q., Young G., Kobayashi T., Nagahama Y. Eel (*Anguilla japonica*) testis 11 β -hydroxylase gene is expressed in interrenal tissue and its product lacks aldosterone synthesizing activity // *Molecular and Endocrinology*. 1998. V. 146. P. 207-211.

29. Lamba V.J., Goswami S.V., Sundararaj B.I. Circannual and circadian variations in plasma levels of steroids (cortisol, estradiol-17 β , estrone, and testosterone) correlated with the annual gonadal cycle in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch.). // *Gen. and Comp. Endocrinol.* 1983. V. 50. № 3. P. 205-225.

30. Morrison P. F., Leatherland J. F. and Sonstegard R. A. Plasma cortisol and sex steroid levels in Great Lakes Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum) in relation to fecundity and egg survival // *Comp. Biochem. Physiol.* 1985. V. 80A. № 1. P. 61-68.

31. Peter R. E., Hontela A., Cook A. F., Paulencu C. R. Daily cycles in serum cortisol levels in the goldfish: effects of photoperiod, temperature, and sexual condition // *Can. J. Zool.* 1978. V. 56, N. 11. P. 2443-2448.

32. Pickering A.D., Christie P. Changes in the concentrations of plasma cortisol and thyroxine during sexual maturations of the hatcheryreared brown trout, *Salmo trutta* L. // *Gen. and Comp. Endocrinol.* 1981. V. 44, № 4. P. 487-496.

33. Scott A.P., MacKenzie D.S., Stacey N.E. Endocrine changes during natural spawning in the white sucker, *Catostomus commersoni*. II. Steroid hormones // *Gen. and*

Comp. Endocrinol. 1984. V. 56. № 3. H. 349-359.

34. van Overbeeke A.P., McBride J.R. Histological effects of 11-ketotestosterone, 17 α -methyltestosterone, estradiol, estradiol cypionate, and cortisol on the interrenal tissue, thyroid gland, and pituitary gland of gonadectomized sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). // J. Fish. Res. Canada. 1971. V. 28. № 1. P. 477-484.

35. Young G., Brown C. L., Nishioka R. S., et al. Histopathology, blood chemistry, and physiological status of normal and moribund striped bass (*Morone saxatilis*) involved in summer mortality ('die-off') in the Sacramento-San Joaquin Delta of California // J. Fish. Biol. 1994. V. 44. P. 491-512.

**CONDITION SEXUAL AND INTERRENAL GLANDS
AT STRIPED FLOUNDER *PLEURONECTES
PINNIFASCIATUS* FROM THE AMUR GULF
OF THE JAPANESE SEA**

V.B.Durkina

*Institute of biology of the sea DVO RAS, 690041
Vladivostok*

It is known, that anthropogenous pollution has damaging an effect on functionally interconnected with each other fish glands - sexual and interrenal. The extremely limited data available in the literature allow to assume, that low reproductive characteristics at fishes may be defined by their activity steroid interrenal tissues. In present article the data are generalized on a condition of interrenal gland and reproductive system at striped flounder *Pleuronectes pinnifasciatus* from Amur bay (sea of Japan) at which during three spawning seasons mass destruction of mature sexual products is observed. Amur bay is one of the most polluted in Peter the Great bay of sea of Japan. It is shown, that at a flounder damage of oocytes at all stages of a reproductive cycle comes to light. One of the reasons of formation of poor-quality sexual cells the striped flounder may have exhaustion of steroidogenic tissues.

**БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ СЕГОЛЕТКОВ КЕТЫ
(ONCHORHYNCHUS KETA (WALBAUM)) И КИЖУЧА
(ONCHORHYNCHUS KISUTCH (WALBAUM))
ПРИ СМЕНЕ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ**

Любаев В.Я.¹, Микулин А.Е.², Старостина Ю.В.,
Самсонова М.В., Лаптева Т.И.³

1 - ООО «Салмо»; 2 - МГУТУ, 113149, Москва,
ул. Болотниковская, 15; 3 - МПГУ

Исследованы изменения биохимического состава тела кеты (*Onchorhynchus keta* (Walbaum)) и кижуча (*Onchorhynchus kisutch* (Walbaum)), отличающихся разной степенью готовности к смолтификации по данным анализа содержания глюкозы, гликогена, липидов, общего белка. У не готовых к смолтификации сеголеток кижуча за сутки пребывания в морской среде установлено резкое снижение на 30-40% массы тела, содержание глюкозы в печени (на 60-70%) при незначительном повышении ее в крови. Определены количественные характеристики содержания гликогена и глюкозы в печени сеголеток кижуча, коррелирующие с выживаемостью рыб при выдерживании их в морской воде

ВВЕДЕНИЕ

В период смолтификации – подготовки к новым по солености условиям обитания - у анадромных видов рыб происходят изменения, затрагивающие водно-солевой обмен [1, 2, 7]. Нами было установлено, что при переходе молоди кижуча из пресной воды в соленую ее масса уменьшается [4].

Цель настоящей работы - исследовать характер влияния смены среды обитания из пресноводной на морскую на биохимический состав молоди тела кеты и кижуча, отличающихся разной степенью готовности к смолтификации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сбор материала проводили на Охотском лососевом рыбозаводном заводе ООО «Салмо» на юго-востоке острова Сахалин в 2002 г. Биохимический состав тканей сеголеток оценивали по содержанию глюкозы, гликогена, общих липидов, белков. Исследование содержания глюкозы и гликогена проводили у мальков кеты и кижуча в период их содержания в пресной воде и после пересадки в морскую воду. В

процессе проведения экспериментов молодь из пресной и морской воды периодически взвешивали с точностью до 0,001 г, перед взвешиванием молодь в сачке встряхивали 5 раз для удаления воды из ротовой и жаберной полостей. Все эксперименты проведены при температуре воды 7°C.

Для изучения биохимического состава тела экспериментальных рыб замораживали целиком при температуре -24°C и в таком виде доставляли в лабораторию для последующей камеральной обработки. От тушки мальков на льду отделяли печень, которую использовали для определения содержания в ней глюкозы и гликогена. Навеску печени гидролизовали в 40%-ном растворе NaOH на кипящей водяной бане. Гликоген осаждали этанолом с последующим отделением на центрифуге К-24 при 2000-2500 об./мин в течение 15 минут. Полученный осадок растворяли в воде для количественного определения содержания гликогена колориметрическим орциновым методом по Хорейши [8]. В качестве внутреннего стандарта использовали коммерческий препарат гликогена фирмы «Биолар». Интенсивность окрашивания определяли на спектрофотометре СФ 26 при длине волны 670 нм.

Глюкозу определяли орто-толуидиновым методом [8]. Навеску ткани фиксировали десятикратным объемом 5% ТХУ, добавляли 3 мл орто-толуидинового реактива и 10 мин выдерживали на кипящей водяной бане. Пробы охлаждали и фотометрировали против контроля при 590 нм на спектрофотометре СФ 26. Количество глюкозы в пробе определяли с помощью калибровочной кривой, для построения которой использовали растворы глюкозы с концентрацией от 0,01 до 0,7 мг/мл (рис. 1).

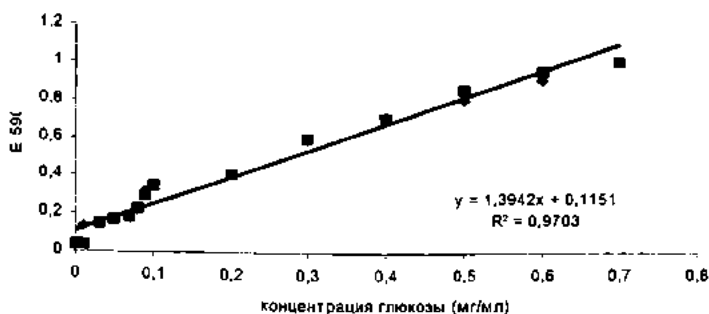


Рис. 1. Калибровочная кривая для определения свободной глюкозы по орто-толуидиновому методу.

В полевых условиях у экспериментальных рыб определяли содержание глюкозы в крови с помощью глюкометра One Touch Basic Plus. Кровь у сеголеток кеты и кижуча брали из хвостовой артерии сразу же после отрезания хвостового стебля.

Экстракцию липидов из сырой ткани проводили смесью хлороформ-метанол по Фолчу [11] в модификации В.И. Лапина и Е.Г. Черновой [3]. Для этого образцы гомогенизировали, смешивали с раствором Фолча, фильтровали через бумажный фильтр, жидкую фазу собирали в мерную пробирку, а твердую - помещали в ступку и дважды экстрагировали дополнительные количества липидов смесью хлороформ-метанол. К объединенному хлороформ-метаноловому экстракту добавляли необходимое количество воды так, чтобы соотношение хлороформ-метанол-вода было равно 1:1:1 и оставляли на 24 ч, в течение которых достигалось извлечение липидов хлороформом, а метанол и другие примеси диффундировали в воду. Жидкая фаза в делительной воронке разделялась на два слоя: нижний - хлороформенный, содержащий липиды, а верхний - водно-метаноловый, содержащий все не липидные фракции. Количество липидов определяли весовым методом в хлороформной фракции после ее выпаривания и последующего высушивания до постоянной массы при 105 °С.

Объем водно-метаноловой фракции измеряли и определяли в ней содержание углеводов и небелкового остатка. Количественное определение растворимых углеводов проводили в аликвоте (1 мл) водно-метаноловой фракции по методу Хагедорна-Иенсена [6]. Оставшуюся часть водно-метаноловой фракции выпаривали, а затем высушивали при 105 °С до постоянной массы.

Остаток ткани после удаления хлороформ-метаноловой фракции подсушивали в фарфоровых чашках на воздухе, а затем - до постоянного воздушно-сухого веса при 40 °С. Часть воздушно-высушенной ткани использовали для определения полисахаридов. Для этого навеску воздушно-сухого образца (около 200 мг) экстрагировали трехкратным объемом 70%-ного этанола в течение 30 мин, центрифугировали на рефрижераторной центрифуге К-24 при 5000g в течение 60 мин. Супернатант использовали для определения растворимых углеводов по методу Хагедорна-Иенсена.

Навеску воздушно-сухого материала ткани доводили до абсолютно-сухого состояния при 105 °С. Полученный сухой обезжиренный остаток принимали за общий белок [5, 9, 10].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменение массы тела и содержания глюкозы в крови сеголеток кеты в пресной воде и после пересадки в морскую.

Существует мнение, что при длительном подращивании кеты в пресной воде при определенных размерах она теряет способность к смолтификации [1, 2, 12, 13, 14]. Нами показано, что сеголетки кеты выдерживают тест на смолтификацию в воде соленостью 35‰, оставаясь живыми в течение более двух суток. Исследованы изменения их массы при голодании, как в пресной воде, так и в морской (рис. 2). Отмечено, что в морской воде различные экземпляры молодки кеты по-разному изменяют свою массу тела. Общей закономерностью является меньшая потеря массы тела в процессе голодания в морской воде по сравнению с пресной.

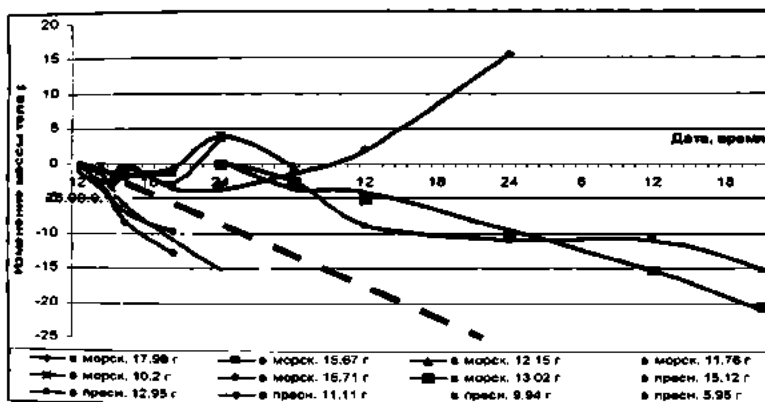


Рис. 2. Изменение массы тела сеголетков кеты в процессе голодания в пресной и морской (35‰) воде. *Примечание.* Выше прерывистой линии - в морской воде; ниже - в пресной. Значками обозначены среда выдерживания и исходная масса рыбы.

При пересадке сеголетков кеты в морскую воду они сохраняют высокий уровень содержания глюкозы в их крови (рис. 3). При этом отмечено два максимума увеличения содержания глюкозы в крови: через 5 часов и через 1,5 суток с момента пересадки рыб в морскую воду.

Нами осуществлено сравнение изменения общего биохимического состава тела сеголетков кеты и кижуча при пере-

садке их из пресной воды в морскую. В экспериментах были использованы заведомо готовые к смолтификации переростки сеголетков кеты средней массой около 14 г и не готовые к смолтификации сеголетки кижуча средней массой 5,5-6 г. До начала эксперимента они предварительно были выращены на датском корме SGP - 514 Aller Aqua.

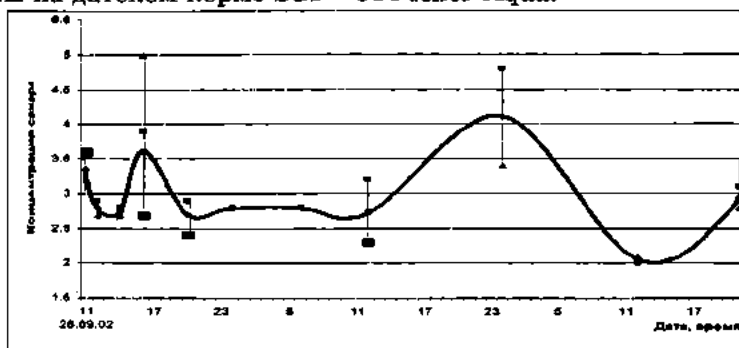


Рис. 3. Изменение содержания глюкозы в крови сеголетков кеты при выдерживании их в морской (35‰) воде.

Биохимический состав тканей сеголетков кеты и кижуча

Как видно из таблицы 1, сеголетки кеты и кижуча при выращивании их в пресной воде отличаются между собой не только по массе тела, но и по ряду биохимических показателей. Так сеголетки кижуча, несмотря на больший процент содержания белка в теле по сравнению с кетой, имели меньшую обводненность тела, низкие глюкозы в крови (на 60% меньше), гликогена и общего белка в мышцах.

Пересадка сеголеток кеты из пресной воды в морскую не сказалась на жизнеспособности этих рыб. Однако в их теле снизилось содержание воды на 1,5-2,5%, а запас гликогена в теле рыб — на 43-50%, при этом содержание гликогена в печени и индекс печени у пересаженных в морскую воду достоверно не отличался от рыб, находившихся в пресной воде. Нет изменений и в массе печени. Расход гликогена тела рыбы при смене среды обитания, видимо, связан с преобладанием его запаса именно в мышцах при содержании гликогена в печени у сеголеток кеты в пресноводный период их жизни, составляющем не более 25% от его содержания во всей рыбе. Содержание глюкозы в печени снизилось на 55-90%, оставаясь неизменным в теле рыб. Следует отметить, что при отсутствии питания этих рыб в морской воде уменьшение содержания глюкозы в их печени проис-

ходит практически линейно во времени (рис. 4). Какого-либо снижения уровней липидов и белка в теле кеты в процессе смены среды обитания нами не отмечено. Эти данные указывают, что основным энергетическим и осмотически активным веществом в процессе адаптации кеты к морской среде являются не липиды и аминокислоты, а глюкоза, и молодь кеты более приспособлена к переходу в морскую среду, чем молодь кижуча.

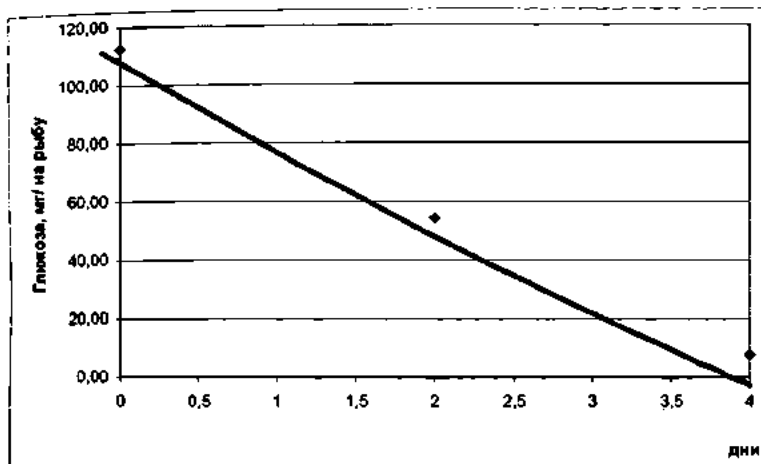


Рис. 4. Изменение содержания глюкозы в печени сеголеток кеты при выдерживании их в морской воде

У не готовых к смолтификации сеголеток кижуча за сутки пребывания в морской среде установлено резкое снижение на 29,2% массы тела, а у погибших, исходно имевших более мелкие размеры и среднюю массу тела в пресной воде 3,33 г, - почти на 40%. Одновременно с этим отмечено снижение содержания влаги и глюкозы (на 60-70%) в печени при незначительном повышении ее в крови рыб. В свою очередь, у только что погибших в морской воде сеголеток кижуча зафиксировано резкое (до 50%) падение уровня белка и гликогена.

Полученные результаты позволяют полагать, что эффективность смолтификации и последующей адаптации молодки рыб к обитанию в морской среде зависят от особенностей физиолого-биохимического состояния смолтов и возможности обеспечения метаболических процессов источниками энергии в период перехода сеголеток из пресной воды в морскую.

Общий биохимический состав тушки (без внутренностей) сеголетков кеты и кижуча. Таблица 1

Вид рыбы	Эксперимент	Показатели	Масса рыбы, г	На 1 г сырой ткани					
				Влага, г	Липиды, г	Белок, г	Гликоген, мг	Глюкоза, мг	азот (аминокислоты), мкг
крупная кета	Контрольная кета в пресной воде	M	14.355	0.8276	0.0307	0.1385	0.6986	2.3790	263.9580
		min	1.2263	0.0016	0.0012	0.0019	0.0543	0.4421	34.0085
		max	9.2900	0.8200	0.0250	0.1270	0.4780	0.6600	78.3700
сеголетки	при кормлении: Датский корм: SGP – 514 Allerg Aqua	min	22.380	0.8390	0.0380	0.1460	0.9870	4.7400	495.3400
		M	14.990	0.8074	0.0280	0.1614	0.7140	2.6080	242.5100
		max	1.2211	0.0041	0.0032	0.0051	0.0354	0.2344	50.4308
крупная кета	Голодная, в морской воде (35%)	min	11.320	0.7950	0.0170	0.1440	0.6040	1.8000	92.3200
		M	18.400	0.8190	0.0340	0.1740	0.8060	3.1600	389.3500
		max	12.010	0.8160	0.0370	0.1445	0.4075	1.8150	360.3650
сеголетки	Голодная, в морской воде (35%)	M	0.0100	0.0030	0.0010	0.0025	0.0095	0.7750	71.6450
		max	с 26.09 (11:00) по 30.09 (10:00).						

		min	12.000	0.8130	0.0360	0.1420	0.3980	1.0400	288.7200
		max	12.020	0.8190	0.0380	0.1470	0.4170	2.5900	432.0100
квжуч, сеголетки	Накормлены. Из пресной воды.	M	5.4940	0.8080	0.0322	0.1585	0.4373	0.9336	193.9560
	Датский корм: SGP - 514 Aller Aqua	m	0.3484	0.0026	0.0025	0.0033	0.0310	0.1626	25.7383
		min	4.7300	0.7970	0.0220	0.1420	0.2950	0.3440	64.2900
		max	8.3700	0.8230	0.0500	0.1790	0.5670	1.6700	317.3800
квжуч, сеголетки	Голодная, в морской воде (35%)	M	3.8911	0.7798	0.0605	0.1570	0.4357	2.0788	149.5550
	с 30.09 (18:00) по 1.10 (16:00) (живые)	m	0.2650	0.0033	0.0039	0.0023	0.0710	0.4432	21.2630
	После кормления в пресной воде	min	2.8100	0.7720	0.0460	0.1500	0.2600	0.3080	111.0100
	кормом: SGP - 514 Aller Aqua	max	5.1000	0.7940	0.0750	0.1620	0.7260	3.6750	245.9700
квжуч, сеголетки	Голодная, в морской воде (35%)	M	3.3350	0.7915	0.0525	0.1543	0.3430	1.4000	531.7125
	с 30.09 (18:00) по 1.10 (свеже погибшие)	m	0.3917	0.0083	0.0013	0.0094	0.0518	0.4822	86.4819
	После кормления в пресной воде	min	2.6900	0.7680	0.0500	0.1390	0.2110	0.4200	322.1500
	кормом: SGP - 514 Aller Aqua	max	4.4300	0.8060	0.0560	0.1810	0.4640	2.7300	685.2900

Таблица 2

Содержание гликогена и глюкозы в печени сеголетков кеты и кижуча

Вид рыбы	Эксперимент	Показатели	Масса рыбы, г	Масса печени, г	Индекс печени	Содержание гликогена в печени, (в мг на 1 г сырой ткани печени)	Содержание глюкозы в печени, (в мг на 1 г сырой ткани печени)
крупная кета, сеголетки	Контрольная кета в пресной воде при кормлении: Датский корм: SGP - 514 Aller Aqua	M	14.3550	0.2589	2.2710	62.0960	438.5030
		m	1.2263	0.0234	0.1084	18.4324	35.8128
		min	9.2900	0.1460	1.6077	12.5700	210.3400
		max	22.3800	0.3910	2.7594	191.5800	582.8600
крупная кета, сеголетки	Голодная, в морской воде с 26.09. (11:00) по 28.09. (21:00).	M	14.9900	0.2924	2.4574	58.9560	188.7700
		m	1.2211	0.0319	0.2619	9.0724	34.7156
		min	11.3200	0.2270	1.6231	23.6100	80.7700
		max	18.4000	0.3850	3.2377	75.0000	300.0000
крупная кета, сеголетки	Голодная, в морской воде с 26.09. (11:00) по 30.09. (10:00).	M	12.0100	0.2375	2.5926	58.1650	32.7350
		m	0.0100	0.0565	0.6296	11.6750	0.5950
		min	12.0000	0.1810	1.9629	46.4900	32.1400
		max	12.0200	0.2940	3.2222	69.8400	33.3300

квжуч, сеголетки	Накормлены. Из пресной воды.	M	5.4940	0.0845	1.9793	68.4210	668.7344
	Датский корм: SGP - 514 Aller Aqua	m	0.3484	0.0097	0.2198	11.6913	53.5620
		min	4.7300	0.0147	0.2817	19.4300	433.3300
		max	8.3700	0.1340	3.0405	128.4600	923.6800
квжуч, сеголетки	Голодная, в морской воде (35%)	M	3.8911	0.0725	2.0153	72.5783	237.1850
	с 30.09 (18:00) по 1.10 (16:00) (живые)	m	0.2650	0.0064	0.1899	10.8497	93.1518
	После кормления в пресной воде	min	2.8100	0.0520	1.1321	45.7900	0.0000
	кормом: SGP - 514 Aller Aqua	max	5.1000	0.0940	2.3669	117.2000	650.0000
квжуч, сеголетки	Голодная, в морской воде (35%)	M	3.3350	0.0555	2.1926	75.8425	0.0000
	с 30.09 (18:00) по 1.10 (свеже погибшие)	m	0.3917	0.0113	0.1736	12.8384	0.0000
	После кормления в пресной воде	min	2.6900	0.0350	1.7467	47.9500	0.0000
	кормом: SGP - 514 Aller Aqua	max	4.4300	0.0780	2.5157	110.1500	0.0000

Выявленные закономерности в изменении биохимического состава молоди рыб, увеличение содержания глюкозы в крови на первых этапах их пребывания в морской среде, снижение гликогена в теле рыб, являются характерными для реакции рыб на воздействие стресс-факторов по Селье и отражают развитие общего адаптационного синдрома.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Краюшкина Л.С., Левченко Н.Д. Развитие осморегуляторной функции в онтогенезе молоди кеты и стандарт рыбободной продукции // Тез. докл. 4-го Всесоюз. совещания по научно-техническим проблемам мариккультуры. Владивосток. 1983. С.61-62.

2. Краюшкина Л.С., Левченко Н.Д., Лызлова С.Н., Моисеенко С.Н., Никитина З.С., Южакова Г.А. Адаптационные особенности осморегуляторной системы молоди кеты в предмиграционный период // Тез. докл. 5-й Всесоюз. конф. по экологической физиологии и биохимии рыб. Ч.2. Киев: Наукова Думка. 1982. С.37-39.

3. Лапин В.И., Чернова Е.Г. О методике экстракции жира из сырых тканей рыб // Вопросы ихтиологии. 1970. Т. 10. Вып. 4 (63). С. 753-756.

4. Микулин А.Е., Любаев В.Я., Смирнов Б.П. Адаптационные возможности кижуча к соленой воде // Морфологические и физиологические особенности гидробионтов. М.: ВНИРО. 2001. С.44-52.

5. Миндер Л.П., Миндер Р.А. Пищевая и техническая ценность некоторых тресковых // Труды ПИНРО. 1967. Т.22. С.39-109.

6. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение. 1982. С.184-185.

7. Черницкий А.Г., Штерман Л.Е. Особенности осморегуляции мигрирующей молоди атлантического лосося *Salmo salar* L. // Вопросы ихтиологии. 1981. Т.21. Вып.3. С. 498-503.

8. Шатуновский М.И., Вельтицева И.Ф. Методы определения содержания углеводов в тканях рыб // Методика морфофизиологических и биохимических исследований рыб. Москва. 1972. С. 44-51.

9. Шульман Г.Е., Кокос Л.М. Особенности белкового роста и жиронакопления у черноморских рыб // Биология моря. 1968. №15. С.159-203.

10. Шульман Г.Е., Кокос Л.М. Содержание обезжиренного сухого вещества в теле некоторых черноморских рыб // Вопросы ихтиологии. 1971. Т.11. №2. С.339-344.

11. Folch J., Lees M., Stanley G. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues / J. Boil. Chem. 1957. V.226. P.497-509.

12. Iwata M., Hasegawa S., Hirano T. Decreased seawater adaptability of chum salmon (*Oncirhynchus keta*) fry following prolonged rearing in freshwater. Can.J. Fish. Aquat. Sci. 1982. V. 39, N3, p. 509-514.

13. Iwata M., Hirano T., Hasegawa S. Behavior and plasma sodium regulation of chum salmon during transition into seawater. Aquaculture. 1982. V. 28, N 1-2.

14. Iwata M., Komatsu S. Impotance of estuarine residence for adaptation of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) fry to seawater. Can. J. Fish. Aquat. Sci.. 1984. V. 41, N 5, p. 744-749.

**BIOCHEMICAL STRUCTURE OF YOUNG OF CHUM
(ONCHORHYNCHUS KETA (WALBAUM)) AND KOHO
(ONCHORHYNCHUS KISUTCH (WALBAUM))
AT CHANGE OF AN INHABITANCY**

*Lyubaev V.Ya., Mikulin A.E., Starostina J.V.,
Samsonova M.V., Lapteva T.I.*

Changes of biochemical structure of a body of a chum (*Onchorhynchus keta* (Walbaum)) and koho (*Onchorhynchus kisutch* (Walbaum)), distinguished by a different degree of readiness to smoltification are investigated according to the analysis of the maintenance of glucose, glikogene, lipides, the general protein. At not ready to smoltification of kohoyoung for day of stay in the sea environment sharp decrease(reduction) is established on 30-40 % of weight of a body, the maintenance of glucose in a liver (on 60-70 %) at its slight increase in blood. Quantitative characteristics of the maintenance of glikogene and glucose in a liver of koho young, fishes correlating with survival rate are determined at their keeping in sea water.

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ХРУСТАЛИКА ПЕСКАРЯ (*Gobio gobio*, *Gobio L.*)

Никифоров-Никишин А.Л., Никифоров-Никишин Д.Л.,
Симаков Ю.Г., Бородин А.Л.

*МГУТУ, каф. «Биоэкологии и ихтиологии», Москва,
ул. Болотниковская, 15*

В работе приводятся данные исследований гистологических и гистохимических особенностей строения хрусталика пескаря обыкновенного (*G/gobio, gobio L.*). Гистохимический состав тканей хрусталика определяли по содержанию гликопротеидов и нуклеиновых кислот: ДНК и РНК. С целью выявления механизмов защиты линзы глаза от различных факторов среды были проведены электронно-микроскопические исследования капсулы хрусталика пескаря. Установлено, что строение хрусталика пескаря обыкновенного практически не отличается от основного типа строения хрусталика позвоночных животных. Гликопротеиды в хрусталиках пескаря обыкновенного в основном локализованы в капсуле хрусталика глаза.

ВВЕДЕНИЕ

Эпителий хрусталика большинства рыб представляет собой монослой клеток с различной степенью дифференцировки. По характеру дифференциации клеток в эпителии хрусталика можно выделить три зоны [2]. Первая зона - центральная - представлена плоскими клетками, в месте контактов друг с другом имеющими амебодную форму. Вторая зона - герминативная. Здесь происходят клеточные деления, поверхность клеток при этом сокращается, и объем ядер уменьшается. Для этой зоны характерно наибольшее количество митозов. Третья зона - предэкваториальная. Клетки здесь приобретают шестиугольную форму и выстраиваются рядами. Непосредственно на экваторе клетки поворачиваются на 90° и удлиняются в сторону переднего и заднего полюсов, превращаясь в хрусталиковое волокно. Процесс образования хрусталиковых волокон происходит постоянно, в течение всей жизни животного [1, 3, 7].

Нами были проведены исследования хрусталика пескаря обыкновенного (*Gobio gobio, gobio L.*). Фиксация глаз рыб осуществлялась в смеси Карнуа (этанол и уксусная кислота в соотношении 3/1), затем хрусталики заливались в парафин и резались на микротоме (Лилли, 1969). Особенностью приготовления срезов хрусталиков рыб, как и других позвоночных, является наличие очень плотного ядра, которое выпадает при получении срезов. Для предотвращения этого используется несколько способов: либо нанесение слоя парафина на каждый срез, либо смачивание кисточкой с водой [5].

Для морфологического исследования хрусталиков рыб использовалась окраска гематоксилин-эозином [6].

Выявление углеводов основано, как правило, на методах общего анализа химических групп. Для определения гистохимического состава тканей хрусталика нами была использована модифицированная ШИК-реакция. С помощью этого метода выявляются все соединения, содержащие оксигруппы, которые в результате окисления метайодной кислоты могут превращаться в альдегидные группы. Однако в гистологических срезах практически лишь гликоген и гликопротеины, сохраняющиеся в достаточных количествах, могут быть выявлены с помощью ШИК реакции [9].

Метайодная кислота селективно окисляет и расщепляет углеродные связи не только в 1, 2-окси-, но также в 1-окси-2-амино-1-окси-2-алкиламино- и 1-окси-2-кетогруппах. В результате этого образуется одна кетогруппа или две альдегидные группы, как, например, в глюкозе. Альдегидные группы реагируют с реактивом Шиффа (фуксин сернистой кислотой) точно так же, как и в реакции Фельгена. Гликоген можно дифференцировать от гликопротеинов путем переваривания в амилазе или диастазе. Гликопротеиды приобретают красно-лиловое окрашивание. В некоторых случаях гликопротеиды могут маскироваться другими соединениями, в этом случае окраска грязно-красного цвета.

Для дифференцированного окрашивания ДНК и РНК нами использовалась окраска срезов хрусталика метиловым зеленым-пиронином по Браше [4]. Этот способ позволяет четко определить места локализации нуклеиновых кислот в структурах хрусталика.

Для изучения структуры капсулы хрусталика, с целью выявления механизмов защиты линзы глаза от различных факторов среды, нами были проведены электронно-микро-

скопические исследования, направленные на изучение ультраструктуры капсулы хрусталика пескаря. Помимо капсулы исследовались более глубокие слои хрусталика, такие как, эпителий хрусталика и волоконная часть хрусталика.

Для приготовления препаратов хрусталики фиксировались раствором глutarового альдегида, который характеризуется быстрым проникновением в ткани и ровной стабилизацией мембран в клетках. Продолжительность фиксации составила 4 часа при комнатной температуре. Обезживание материала проводили в спирте возрастающей концентрации - 50 %, 70 %, 90 %, 100 %. Для заливки материала использовались полиакриламидные смолы. Исследование полученных препаратов проводили с помощью электронного микроскопа с рабочим увеличением 5000; 7000; 10000. Для изучения хрусталика глаза использовали щелевую лампу ЦЛ-56 подходящую для биомикроскопии глаза различных животных.

При проведении гистологических и гистохимических исследований выбирались рыбы с видимым отсутствием каких-либо повреждений хрусталика, приблизительно одинаковой размерной группы. Также учитывалось нормальное физиологическое состояние гидробионтов для предотвращения искаженных результатов исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нами была проведена микрометрия основных частей хрусталика у 50 особей пескаря обыкновенного. Кора хрусталика у рыб с типичным строением этого органа занимает значительную часть от эпителиального слоя до центрального ядра более плотной части хрусталика. Данные микрометрии хрусталика пескаря представлены в таблице 1.

Исследование гистохимических препаратов хрусталика пескаря после проведения Шик-реакции показало, что основная масса гликопротеидов локализована в капсуле, которая окрашивается в характерный красно-лиловый цвет. Наличие большого количества гликопротеидов говорит о том, что через капсулу происходит активный обмен, так как эти вещества присутствуют во всех мембранных структурах выполняющих роль молекулярного барьера.

В хрусталиковых волокнах пескаря гликопротеиды присутствуют в незначительном количестве и замаскированы другими веществами, поэтому окраска этой части хрусталика несет фиолетовый оттенок.

Таблица 1

Микрометрия основных частей хрусталика пескаря
обыкновенного

Длина тела, см	Хрусталик, мм	Толщина капсулы хрусталика, мм	Кора хрусталика, мм	Ядро хрусталика, мм
7,0	2,2 ± 0,11	0,05 ± 0,01	0,97 ± 0,15	1,18 ± 0,21
7,5	2,2 ± 0,12	0,06 ± 0,01	0,96 ± 0,12	1,19 ± 0,18
8,0	2,4 ± 0,16	0,06 ± 0,02	0,99 ± 0,17	1,35 ± 0,16
8,5	2,4 ± 0,11	0,05 ± 0,01	0,97 ± 0,16	1,37 ± 0,21
9,0	2,4 ± 0,15	0,06 ± 0,02	0,99 ± 0,10	1,37 ± 0,13
9,5	2,6 ± 0,12	0,07 ± 0,01	1,03 ± 0,14	1,48 ± 0,17
10,0	2,6 ± 0,14	0,07 ± 0,05	1,02 ± 0,12	1,50 ± 0,22
10,5	2,7 ± 0,10	0,07 ± 0,02	1,03 ± 0,15	1,70 ± 0,17
11,0	2,8 ± 0,12	0,07 ± 0,02	1,03 ± 0,13	1,72 ± 0,21
11,5	2,9 ± 0,11	0,07 ± 0,01	1,03 ± 0,15	1,78 ± 0,22

Распределение нуклеиновых кислот в различных частях хрусталика пескаря

Для дифференцированного окрашивания ДНК и РНК в хрусталике рыб, срезы окрашивались по Браше. На гистохимических препаратах пескаря исследовалось распределение нуклеиновых кислот и выяснялась их роль в процессах клеточной дифференцировки.

В хрусталике пескаря основная масса ДНК сконцентрирована в ядрах хрусталикового эпителия, за счет дифференцировки которого идут процессы образования волокон и роста хрусталика. По Браше ядра эпителия окрашиваются в сине-зеленый цвет. Как и следовало ожидать, РНК распределена по всей цитоплазме эпителиальных клеток, на препаратах она выявляется красным цветом. Основные синтетические процессы в хрусталиках пескаря происходят в эпителиальном слое и коре, а в центральной - ядерной части хрусталика они отсутствуют или крайне замедлены. Такое распределение нуклеиновых кислот в хрусталике характерно для многих позвоночных животных.

Электронно-микроскопические исследования капсулы хрусталика пескаря показали, что она состоит из внеклеточного кристаллоподобного вещества, разделенного на отдельные зонулярные пластины. Капсула сравнительно тонкая, и ее структура характерна для других позвоночных животных. Ее образование происходит за счет секреции эпителиальных клеток, которые располагаются непосредственно под ней. Сравнительно простая структура капсулы хрусталика

пескаря говорит о том, что она не принимает участия в дифференцировке эпителиальных клеток, а ее роль сводится к пассивной защите хрусталика.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

У рыб основная масса хрусталика, как правило, имеет волоконное строение, а его рост происходит за счет дифференцировки клеток хрусталикового эпителия в хрусталиковые волокна. Этот процесс происходит в течение всей жизни животного и количество волокон постоянно увеличивается. Снаружи хрусталик покрыт капсулой неклеточного строения, состоящей из зональных пластин. Считается, что она образуется в результате секреторной деятельности хрусталикового эпителия. У пескаря обыкновенного толщина капсулы не значительна и составляет 0,05- 0,07 мм.

Основная масса хрусталика пескаря состоит из волокон шестигранной формы. Размеры волокон уменьшаются от периферии к центру хрусталика в результате сдавливания новыми слоями клеток. Одной из особенностей хрусталиковых волокон является потеря ядер, поэтому процессы регенерации и деления волокон в случае повреждения практически невозможны. Следует отметить, что такой тип строения является основным в ряду позвоночных животных, хотя в различных классах происходят незначительные изменения, которые не затрагивают механизма образования, и общего плана строения хрусталика [13].

Строение хрусталика пескаря обыкновенного практически не отличается от основного типа строения хрусталика позвоночных животных.

Гликопротеиды в хрусталиках пескаря обыкновенного в основном локализованы в капсуле хрусталика глаза. По всей видимости, их основная роль в хрусталике рыб заключается в регуляции проницаемости капсулы. В хрусталике глаза пескаря обыкновенного зона высокого содержания гликопротеидов ограничивается капсулой линзы глаза и эпителиальным слоем. Вероятно, что в не высоких концентрациях гликопротеиды присутствуют в волоконной части хрусталика пескаря, но они замаскированы другими веществами и на гистохимических препаратах не выявляются.

Роль нуклеиновых кислот в процессе дифференцировки хрусталиковых волокон, изменение их содержания в эмбриогенезе хрусталика изучена достаточно хорошо [10, 11, 12]. У пескаря ДНК выявляется в ядрах хрусталикового

эпителия, а РНК распределена в цитоплазме эпителиальных клеток. В волоконной части хрусталика отмечается слабо-розовый оттенок, возможно указывающий на наличие М-РНК. Такая локализация ДНК и РНК характерна для хрусталиков многих позвоночных животных [8]. Реакция хрусталика на воздействие повреждающих факторов однотипна: потеря ядер и регенерационных и митотических функций волокон.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аникин. Морфологическое обоснование индукции хрусталика глазной чашей // Труды 6-го Всесоюз. Съезда анатомов, гистологов и эмбриологов. Харьков, 1961. Т. 1. С. 511-513.
2. Гексли Дж., де Бер Р. Основы экспериментальной эмбриологии. М.-Л.: Биомедгиз, 1936. 467 с.
3. Макаева А.П. Эмбриология рыб. М.: Изд. МГУ, 1992. 216 с.
4. Пирс Э. Гистохимия. М.: Иностранная литература, 1962. 962 с.
5. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Иностранная литература, 1954. 718 с.
6. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: Руководство. М.: Медицина, 1996. 544с.
7. Симаков Ю.Г. Регенерация различных зон эпителия хрусталика после травматизации // Изв. АН СССР. Сер. биологическая. 1974. № 2. С. 295-298.
8. Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии. Л.: Медицина, 1971. 168 с.
9. Угрюмов М.В. Современные методы иммуоцитохимии и гистохимии // Итоги науки и техники. Сер. Морфология человека и животных. М.: ВИНТИ, 1991. Т. 15. 117 с.
10. Appleby D.W., Modak S.P. DNA degradation in terminally differentiating lens fiber cells from chick embryos // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977. № 4. P. 5579-5583.
11. Arruti C., Chaudun E., De Maria A., Courtois Y., Counts M.F. Characterization of eye-lens DNA: long term persistence of activity in post apoptotic lens fiber cells. // Cell Death Differ. 1995. № 2. P. 47-56.
12. Modak, S., Bloom. F.J. Terminal lens cell differentiation. Initiator activity of DNA during nuclear degeneration // Exp. Cell Res. 1970. № 62. P. 421-432.
13. Vrensen E., Graw J., DeWolf A. Nuclear breakdown

during terminal differentiation of primary lens fibers in mice: a transmission electron microscopic study // Exp. Eye Res. 1991. № 52. P. 647-659.

**HISTOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL FEATURES
OF A STRUCTURE OF A CRYSTALLINE LENS
OF THE GUDGEON (GOBIO GOBIO, GOBIO L.)**

**Nikiforov-Nikishin A.L., Nikiforov-Nikishin D.L.,
Simakov J.G., Borodin A.L.**

In work the data of researches histological and histochemical features of a structure of a crystalline lens of the gudgeon ordinary (*G.gobio, gobio L.*) are cited. Histochemical structure of tissues of a crystalline lens determined under the contents of glikoproteids nucleinic acids: DNA and RNA. With the purpose of revealing mechanisms of protection of eye lenses from various factors of environment were carried out electron microscopic researches of a capsule of a crystalline lens of the gudgeon. It is established, that the structure of a crystalline lens of the gudgeon ordinary practically does not differ from the basic type of a structure of a crystalline lens of vertebrate animals. Glikoproteids in crystalline lenses of the gudgeon ordinary basically are located in a capsule of a crystalline lens of an eye.

УДК 597-14

**ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ХРУСТАЛИКА
РОТАНА-ГОЛОВЕШКИ, PERCOTTUS GLEHNI,
DYBOWSKI, 1877**

**Никифоров-Никишин А.Л., Никифоров-Никишин Д.Л.,
Симаков Ю.Г., Бородин А.Л.**

*МГУТУ, каф. «Биоэкологии и ихтиологии», Москва,
ул. Болотниковская, 15*

В работе анализируются особенности строения хрусталика головешки-ротана (*Percottus glehni Dybowski 1877*) по данным гистологических, гистохимических и электронно-микроскопических исследований срезов хрусталика. Установлено, что хрусталик головешки ротана значительно отличается от обычного типа строения. Снаружи хрусталик рыб покрыт многослойной капсулой, между двумя слоями зону-

лярных пластин располагается слой аморфной массы. Показано, что основная масса хрусталика представлена симпластическими волокнами.

ВВЕДЕНИЕ

Основная масса хрусталика большинства рыб представлена волокнами, которые плотно прилегают друг к другу и являются вытянувшимися клетками эпителия, дифференцированными в одном направлении. Капсула хрусталика окружает его со всех сторон и является бесклеточной мембраной, состоящей из тонких пластинок [3]. Считается, что она секретируется эпителием хрусталика. Закладка капсулы происходит в эмбриональном периоде, когда эпителий покрывает весь хрусталик и простирается на его заднюю поверхность [1]. При повреждении капсулы и эпителия хрусталика их восстановление совершается путем утолщения капсулы в месте повреждения вследствие пролиферации клеток эпителия. Особенностью капсулы хрусталика является то, что она происходит из одного типа клеток [2, 3, 15]. Электронно-микроскопическими исследованиями было показано, что капсула позвоночных животных состоит из отдельных зональных пластин, а ее структура повторяет строение некоторых кристаллов [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Головешка ротан (*Percottus glehni*, Dybowski, 1877) отличается высокой резистентностью к неблагоприятным воздействиям, что позволило ему широко распространиться в водоемах Европейской части России. Случаи поражения хрусталика головешки ротана не отмечались, что позволяет предположить наличие специализированных механизмов защиты хрусталика от повреждений.

Фиксация глаз рыб осуществлялась в смеси Карнуа (этанол и уксусная кислота в соотношении 3/1), затем хрусталики заливались в парафин и резались на микротоме [4]. Особенностью приготовления срезов хрусталиков рыб, как и других позвоночных, является наличие очень плотного ядра, которое выпадает при получении срезов. Для предотвращения этого используется несколько способов: либо нанесение слоя парафина на каждый срез, либо смачивание кисточкой с водой [8]. Для морфологического исследования хрусталиков рыб использовалась окраска гематоксилин-эозином [9].

Для определения гистохимического состава тканей хрусталика нами была использована модифицированная ШИК-реакция. С помощью этого метода выявляются все соединения, содержащие оксигруппы, которые в результате окисления метайодной кислоты могут превращаться в альдегидные группы. Однако в гистологических срезах практически лишь гликоген и гликопротеины, сохраняющиеся в достаточных количествах, могут быть выявлены с помощью Шик-реакции [12]. Метайодная кислота селективно окисляет и расщепляет углеродные связи не только в 1, 2-окси-, но также в 1-окси-2-амино-1-окси-2-алкиламино- и 1-окси-2-кетогруппах. В результате этого образуется одна кетогруппа или две альдегидные группы, как, например, в глюкозе. Альдегидные группы реагируют с реактивом Шиффа (фуксин сернистой кислотой) точно так же, как и в реакции Фельгена. Гликоген можно дифференцировать от гликопротеинов путем переваривания в амилазе или диастазе.

Для дифференцированного окрашивания ДНК и РНК нами использовалась окраска срезов хрусталика метиловым зеленым-пиронином по Браше [6]. Этот способ позволяет четко определить места локализации нуклеиновых кислот в структурах хрусталика.

Для изучения структуры капсулы хрусталика, с целью выявления механизмов защиты линзы глаза от различных факторов среды, нами были проведены электронно-микроскопические исследования, направленные на изучение ультраструктуры капсулы хрусталика головешки ротана. Помимо капсулы исследовались более глубокие слои хрусталика рыб, такие как, эпителий хрусталика и волоконная часть хрусталика.

Хрусталики фиксировались раствором глутарового альдегида, который характеризуется быстрым проникновением в ткани и ровной стабилизацией мембран в клетках. Продолжительность фиксации составила 4 часа при комнатной температуре. Обезвоживание материала проводили в спирте возрастающей концентрации - 50 %, 70 %, 90 %, 100 %. Для заливки материала использовались полиакриламидные смолы. Исследование полученных препаратов проводили с помощью электронного микроскопа с рабочим увеличением 5000; 7000; 10000. Для изучения хрусталика глаза использовали щелевую лампу ШЛ-56 подходящую для биомикроскопии глаза различных животных.

При проведении гистологических и гистохимических исследований выбирались рыбы с видимым отсутствием ка-

ких-либо повреждений хрусталика, приблизительно одинаковой размерной группы. Также учитывалось нормальное физиологическое состояние гидробионтов для предотвращения искаженных результатов исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

У взрослых особей головешки ротана хрусталик глаза имеет принципиально иное строение, чем у других костистых рыб. Форма хрусталика полностью сферическая, скорее всего, она поддерживается за счет внутреннего тургорного давления. При прокалывании хрусталика иглой его содержимое изливается наружу в виде гелеобразной массы. При изготовлении цитологических препаратов на капсуле хрусталика клеток эпителия не наблюдается.

Капсула хрусталика ротана значительно толще, чем у других видов костистых рыб и составляет 1/12-1/15 диаметра его хрусталика. При снятии капсулы на её внутренней стороне обнаружена радиальная исчерченность. На гистологических препаратах видно, что она состоит из трех слоев. В некоторых случаях на её поверхности имеются ярко выраженные зубчики. Отмечается неоднородность строения капсулы.

Уникальной особенностью хрусталика ротана головешки является то, что непосредственно под капсулой начинается слой хрусталиковых волокон, а клетки эпителия отсутствуют. Предварительные исследования показали, что основная масса хрусталика головешки ротана хорошо растворяется в глицерине, по всей видимости, в состав псевдоволокон входит большое количество гликопротеинов. Ядро хрусталика в глицерине не растворяется и состоит из типичных хрусталиковых волокон с нерастворимыми кристаллинами. На препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином видно, что волокна корковой части значительно крупнее волокон других видов рыб.

Нами была проведена микрометрия основных частей хрусталика у 50 особей головешки ротана. Кора хрусталика у рыб, с типичным строением этого органа, занимает значительную часть от эпителиального слоя до центрального ядра более плотной части хрусталика. У головешки ротана эта зона менее четко дифференцирована, и определить размер ядра хрусталика можно только после растворения коры хрусталика в глицерине. Данные микрометрии хрусталика ротана представлены в таблице 1.

Таблица 1

Микрометрия основных частей хрусталика головешки ротана

Длина тела, см	Хрусталик, мм	Толщина капсулы хрусталика, мм	Кора хрусталика, мм	Ядро хрусталика, мм
6,0	2,7 ± 0,15	0,18 ± 0,03	0,90 ± 0,21	1,62 ± 0,35
7,0	2,9 ± 0,17	0,24 ± 0,05	0,92 ± 0,15	1,74 ± 0,41
7,5	3,3 ± 0,20	0,22 ± 0,04	0,92 ± 0,12	2,16 ± 0,36
8,0	3,3 ± 0,16	0,23 ± 0,06	0,90 ± 0,18	2,17 ± 0,23
8,5	3,5 ± 0,18	0,26 ± 0,03	0,93 ± 0,17	2,31 ± 0,43
9,0	3,6 ± 0,19	0,27 ± 0,02	0,95 ± 0,19	2,38 ± 0,37
9,5	3,6 ± 0,23	0,31 ± 0,06	0,97 ± 0,13	2,24 ± 0,42
10,0	3,7 ± 0,21	0,28 ± 0,03	0,98 ± 0,16	2,44 ± 0,41
10,5	3,7 ± 0,15	0,28 ± 0,03	0,98 ± 0,19	2,44 ± 0,32
11,5	3,8 ± 0,22	0,26 ± 0,05	0,96 ± 0,15	2,36 ± 0,37

Распределение гликопротеидов в хрусталике головешки ротана имеет ряд особенностей. Так как капсула хрусталика у него многослойна и имеет значительную толщину, то количество гликопротеидов в ней повышено. На гистохимических препаратах, окрашенных на гликопротеиды, четко выявляются отдельные слои капсулы. Для капсулы головешки ротана характерно ярко лиловое окрашивание. Наиболее четко гликопротеиды у ротана выявляются в центральных частях хрусталика, и их количество снижается от периферии к центру. Помимо продольной исчерченности, капсула головешки ротана обладает еще радиальной, толщина которой соизмерима с толщиной отдельных волокон. Эти отличия позволяют предположить, что именно капсула играет важную роль в дифференцировке хрусталиковых волокон головешки ротана и участвует в процессах роста хрусталика.

Распределение нуклеиновых кислот в различных частях хрусталика ротана головешки

Для дифференцированного окрашивания ДНК и РНК в хрусталике рыб, срезы окрашивались по Браше. На гистохимических препаратах ротана головешки исследовалось распределение нуклеиновых кислот и выяснялась их роль в процессах клеточной дифференцировки.

Исследование распределения нуклеиновых кислот в хрусталике головешки ротана позволяет предположить, что механизм роста и дифференцировки хрусталиковых волокон у этого вида рыб существенно отличается от такового у других видов низших позвоночных.

Отсутствие эпителия хрусталика компенсируется образо-

ванием многоядерных псевдоволокон. Концевые участки псевдоволокон содержат от 6 до 8 ядер, а РНК распределена по периферии симпласта, где происходит активный синтез белка. Рост хрусталика скорее всего происходит за счет гипертрофии симпластических волокон хрусталика, а не за счет возникновения новых волокон в результате цитодифференцировки из эпителия хрусталика, как это наблюдается в линзе глаза у других позвоночных. Косвенно это подтверждается наличием внутреннего тургорного давления.

Электронно-микроскопическое исследование капсулы хрусталика

Многослойная капсула ротана головешки при электронно-микроскопическом исследовании выглядит следующим образом. Наружный слой представлен зоналярными пластинами, под которыми располагается слой однородного строения, далее следуют опять типичные зоналярные пластины. Под капсулой сразу начинаются хрусталиковые волокна - симпласты, которые в наружных слоях имеют нечеткие геометрические формы. Типичная упорядоченная структура проявляется в более глубоких слоях. Хрусталик головешки ротана можно дифференцировать на большее количество слоев, хотя их границы достаточно размыты.

Более глубокие слои хрусталика головешки ротана имеют четкое геометрическое строение, хотя они не соответствуют границам симпластических волокон. По всей видимости, геометрическая структура представляет собой артефакт, который сохраняет строение типичных хрусталиковых волокон до их преобразования в симпласты.

Обсуждение результатов исследований

В результате нашей работы было выявлено, что хрусталик головешки ротана значительно отличается от обычного типа строения.

Снаружи хрусталик головешки ротана покрыт многослойной капсулой. Данные электронной микроскопии показали, что между двумя слоями зоналярных пластин располагается слой аморфной массы [11].

По всей видимости, капсула играет решающую роль в защите хрусталика от повреждений. Известно, что головешка ротан может выдерживать обмерзание наружных покровов тела, при этом повреждение зрительной системы не

возникает, скорее всего, этому способствуют высокая эластичность капсулы хрусталика и высокое содержание гликопротеидов, которые выполняют роль антифриза, так как температура их замерзания ниже температуры замерзания воды. Возможно, у других рыб, обитающих в условиях низких температур, также выработался подобный механизм защиты зрительной системы. Капсула головешки ротана является непреодолимым барьером для проникновения паразитов. Капсула хрусталика головешки ротана обладает высокой способностью к регенерации.

Основная масса хрусталика представлена симпластическими волокнами, размер которых постоянно увеличивается. Наличие живых активных клеток, вероятно, позволяет хрусталику головешки ротана более лабильно реагировать на изменения условий среды и дает более широкие возможности регенерации клеток в случае их повреждения. Возможно, что секреторная деятельность многоядерных клеток выше, чем у однослойного хрусталикового эпителия других рыб, тогда одной из важнейших функций симпластических клеток является продуцирование вещества капсулы. По всей видимости, симпластические волокна являются вторичными образованиями, так как центральное ядро представлено типичными хрусталиковыми волокнами. Смена строения хрусталика скорее всего происходит на первом году жизни рыбы, на это указывает значительный размер хрусталикового ядра.

Возможно, что хрусталиковые симпласты не являются конечным этапом цитодифференцировки клеток хрусталика ротана. Так как размеры ядра постоянно увеличиваются, вероятно, что с многоклеточными клетками происходят изменения, и они приобретают волоконное строение.

Гликопротеиды в хрусталиках головешки ротана в основном локализованы в капсуле хрусталика глаза. По всей видимости, их основная роль в хрусталике рыб заключается в регуляции проницаемости капсулы.

У головешки ротана наиболее высокое содержание гликопротеидов наблюдается в капсуле. В основной массе хрусталика гликопротеиды также выявляются, это можно объяснить тем, что в симпластических волокнах процессы обмена и роста идут весьма активно. Гликопротеиды также могут играть роль антифриза и предохранять хрусталик от разрушения кристаллами льда в случае его замерзания. Возможно, что они также препятствуют проникновению паразитов в хрусталик глаза. В целом основной функцией этих химических соединений в хрусталиках рыб можно счи-

тать участие в процессах активного транспорта веществ из среды глаза в хрусталик.

Роль нуклеиновых кислот в процессе дифференцировки хрусталиковых волокон, изменение их содержания в эмбриогенезе хрусталика изучены достаточно хорошо [13, 14, 16]. В хрусталике глаза головешки ротана локализация нуклеиновых кислот отличается от распределения в таких других низших позвоночных животных. ДНК присутствует в ядрах симпластических волокон, а РНК распределена на дистальном конце клетки. Наличие нескольких ядер, по всей видимости, необходимо, чтобы обеспечить синтез веществ в цитоплазме крупного симпластического волокна. Высокое содержание РНК указывает на то, что процессы белкового синтеза протекают весьма активно [5].

Можно ожидать, что при нарушении целостности хрусталика его регенерация может происходить в результате как деления клеток, так и за счет восстановления поврежденных участков волокна. Это подтверждается экспериментальным травмированным хрусталика головешки ротана. Уже через 2 суток никаких видимых повреждений в щелевую лампу не наблюдается. Капсула хрусталика восстанавливается также крайне быстро [10].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боджер Ч. Современная эмбриология. - М.: Мир, 1971, 446 с.
2. Гирберт С. Биология развития. - М.: Мир, 1993, 228 с.
3. Гудвин Б. Аналитическая физиология клеток развивающихся организмов. М.: Мир, 1979, 285 с.
4. Лилли Р. Патологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1969, 645 с.
5. Никифоров-Никишин Д.Л. Гистохимия хрусталика некоторых видов рыб // Мат. VII научно-практич. конф. «Инновационные технологии в пищевой промышленности третьего тысячелетия». М.: МГТА, 2001, Вып. 6, том 1, с. 22-24.
6. Пирс Э. Гистохимия. М.: Иностранная литература, 1962, 962 с.
7. Ровенских Ю.А. Растровая электронная микроскопия нормальных и опухолевых клеток. М.: Медицина, 1979, 150 с.
8. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Иностранная литература, 1954, 718 с.
9. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: Руководство. М.: Медицина, 1996, 544с.

10. Симаков Ю.Г., Никифоров-Никишин Д.Л. Исследования воздействия ультразвука на пространственную ориентацию рыб и процессы регенерации эпителия хрусталика // Пищевая промышленность на рубеже третьего тысячелетия. Мат. VI-ой Междун. научно-практич. конф. М.: МГТА, 2000, с. 241.

11. Симаков Ю.Г., Никифоров-Никишин Д.Л. Гистологическое и электронно-микроскопическое строение капсулы хрусталика рыб // Мат. VII научно-практич. конф. «Инновационные технологии в пищевой промышленности третьего тысячелетия». М.: МГТА, 2001, Вып. 6, том 1, с. 21-22.

12. Угрюмов М.В. Современные методы иммуноцитохимии и гистохимии // Итоги науки и техники. Серия «Морфология человека и животных». М.: ВИНТИ, 1991, Т. 15, 117 с.

13. Appleby D.W., Modak S.P. DNA degradation in terminally differentiating lens fiber cells from chick embryos / Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, № 4, p. 5579-5583.

14. Arruti C., Chaudun E., De Maria A., Courtois Y., Counts M.F. Characterization of eye-lens DNA: long term persistence of activity in post apoptotic lens fiber cells. // Cell Death Differ. 1995, № 2, p. 47-56.

15. Harding C.A., Thayer M.N. DNA synthesis and cell division in the cultured ocular lens // Invest. Ophthalmol. 1964, V. 3, № 3, p. 302-313.

16. Modak S., Bloom. F.J. Terminal lens cell differentiation. Initiator activity of DNA during nuclear degeneration // Exp. Cell Res. 1970, № 62, p. 421-432.

FEATURES OF A STRUCTURE OF A CRYSTALLINE LENS RATAN-BRANDS, PERCOTTUS GLEHNI, DYBOWSKI, 1877.

Nikiforov-Nikishin A.L., Nikiforov-Nikishin D.L.,
Simakov J.G., Borodin A.L.

Moscow State University of Technology and Management

In work features of a structure of a crystalline lens of a brand - ratan (Percottus glehni Dybowski 1877) are analyzed according to histological, histochemical and electron microscopic researches of cuts of a crystalline lens. It is established, that the crystalline lens of a brand ratan considerably differs from usual type of a structure. Outside the crystalline lens of fishes is covered with a multilayered capsule, between two layers zonular plates the layer of amorphous weight settles down. It is shown, that the great bulk of a crystalline lens is submitted by simplasticheskimi fibres.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ХРУСТАЛИКЕ РЫБ ПРИ ДИПЛОСТОМОЗЕ

Никифоров-Никишин А.Л., Симаков Ю.Г., Бородин А.Л.
МГУТУ, каф. «Биоэкологии и ихтиологии», Москва,
ул. Болотниковская, 15

В работе проводится сравнительный анализ воздействия диплостомоза на морфо-функциональное состояние хрусталика молоди карпа *Cyprinus carpio* L. и обыкновенного пескаря *Gobio gibus* (L.). Показана зависимость патологических нарушений хрусталика под влиянием паразита *Diplostomum spathaceum* от вида рыб. Проведенные исследования позволили вскрыть механизм устойчивости хрусталика пескаря к метацеркариям за счет образования капсулы вокруг паразита.

ВВЕДЕНИЕ

Основной причиной помутнения хрусталика рыб, помимо загрязнения водной среды, являются паразиты *Diplostomum spathaceum*. Наиболее часто хрусталик поражается личинками трематод рода диплостом *Diplostomum*. Эти паразиты не являются видоспецифичными и могут поражать большое количество видов рыб [4, 6]. Возбудители паразитической катаракты отмечены для многих рыб (125 видов): карповых, лососевых и др. Среди растительноядных рыб особенно восприимчивы белый амур, белые и пестрые толстолобики [1]. В настоящее время обнаружено 19 видов диплостом, которые локализуются в глазах рыб и часто служат причиной потери зрения, катаракты или массовой гибели молоди рыб [1].

Метацеркарии сосальщиков рода *Diplostomum* локализуются в глазах рыб, большей частью в хрусталике, стекловидном теле, а также между склерой и ретиной. Тело метацеркария овальное, прозрачное, размером до 0,5 мм. На переднем конце располагается ротовая присоска, от которой отходят 2 ствола кишечника, заканчивающихся слепо на заднем конце тела на уровне экскреторного пузыря. Рядом с ротовой присоской видны ушковидные выросты. Примерно в середине тела находится брюшная присоска, за которой располагается довольно крупный железистый орган Брандеса. В теле зрелых метацеркарий можно заметить известковые тельца, которые располагаются на концах раз-

ветвленных каналов выделительной системы. Число и расположение известковых телец служит систематическим признаком при определении видовой принадлежности метацеркария.

Взрослые паразиты обитают в кишечнике рыбообразных птиц, чаще чайковых, реже уток. Первыми промежуточными хозяевами служат моллюски сем. *Limnaeidae*, вторыми - рыбы. Птицы заражаются паразитом, поедая инвазированных рыб. Церкарии паразита проникают в рыбу через ее покровы и, попадая в кровеносные сосуды, с током крови заносятся в глаза. Однако церкарии могут проникать в глаз и непосредственно через роговицу [5].

Взаимодействие метацеркарий с хрусталиком рыб практически не изучено, но указывается, что гидратация волокон и капсулы хрусталика отражается на химическом составе мукополисахаридов, которые выполняют роль цементирующего вещества волокон хрусталика [5, 11]. Также имеются сведения, что рыбы различных видов не одинаково реагируют на поражение диплостомами. Наиболее чувствительными к (инвазии) метацеркариям диплостом считаются радужная форель и сиговые рыбы [3]. Мы для анализа взяли карпа и пескаря, у последнего вида паразитическая катаракта не развивается даже при значительном проникновении метацеркарий в хрусталик. Целью нашей работы является сравнительный анализ воздействия диплостомоза на хрусталик рыб чувствительных и устойчивых к нему и выявление механизмов, способствующих сохранению прозрачности линзы глаза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Из рыб нами для исследования были выбраны: пескарь обыкновенный (*Gobio gobio* L.), и карп (*Cyprinus carpio* L.). Сеголетки карпа (100 штук) и взрослые пескари (100 штук) отлавливались в водоемах Московской области (Дмитровский и Железнодорожный районы).

Фиксация глаз рыб осуществлялась в смеси Карнуа (этанол и уксусная кислота в соотношении 3/1), затем хрусталики заливались в парафин и резались на микротоме [7]. Особенностью приготовления срезов хрусталиков рыб, как и других позвоночных, является наличие очень плотного ядра, которое выпадает при получении срезов. Для предотвращения этого используется несколько способов: либо нанесение слоя парафина на каждый срез, либо смачивание

кисточкой с водой [8].

Для морфологического исследования хрусталиков рыб использовалась окраска гематоксилин-эозином [10]. Для прижизненного изучения хрусталиков использовали биомикроскопию глаза. Нами для изучения хрусталика глаза использовалась щелевая лампа ЩЛ-56 хорошо подходящая для исследования глаза различных животных, в том числе и рыб [12]. Прижизненное изучения хрусталика позволяет оценить оптические свойства хрусталика в целом, определить начало патологических состояний, когда прозрачность хрусталика еще сохраняется, и выявить их причины [9].

Результаты исследований

В результате биомикроскопии глаза с помощью щелевой лампы ЩЛ-56 удалось выявить следующие отклонения:

- В глазу отмечается 1-3 паразита, но хрусталик в норме.
- При наличии 1-3 паразитов отмечаются оптические неровности на капсуле хрусталика.
- При наличии 1-4 метацеркарий наблюдаются отслоения ядра хрусталика от коры.
- Наличие на хрусталике 1-4 паразитов приводит к частичной катаракте (начальные стадии помутнения коры хрусталика).
- При наличии 5 и более метацеркарий наблюдаются пигментные пятна на радужной оболочке, помутнение коры хрусталика, четкое отслоение коры от ядра, со сдвигом ядра вверх.

Проведенный анализ биомикроскопических данных хрусталика показывает, что оптические отклонения чаще наблюдаются при наличии паразита в левом глазу карпа, чем в правом. Данные биомикроскопии приведены в таблице 1.

Таблица 1
Оптические изменения в хрусталике сеголеток карпа при наличии в глазу метацеркарий диплостом (в % от выборки, 100 шт.)

Показатель	Правый глаз	Левый глаз	Хрусталик
Количество метацеркарий от 1 до 4, %	40,0	47,0	57,0
Метацеркарий более 5, %	-	7,2,0	46,0
Отслоение ядра, %	7,1	12,0	19,2
Начальная катаракта, %	5,0	11,0	16,0
Поражение капсулы, %	7,0	9,0	15,0
Глаза без метацеркарий, %	-	-	25,6
Нормальный хрусталик при наличии паразита, %	12,0	12,3	24,3

У карпа даже незначительное количество диплостом в глазу приводит к потере прозрачности хрусталика. При 2-4 паразитах наблюдаются следующие аномалии: воспаленные роговицы глаза, гидратация коры и волокон хрусталика, развитие ядерной катаракты. Наличие более 10 паразитов приводит к полной потере прозрачности хрусталика, что вызывает нарушение ориентации рыбы и ее гибель. Паразитарное поражение хрусталика сопровождается процессами повреждения роговицы и других частей зрительной системы. Пескарь оказался более устойчивым к поражению хрусталика паразитами. При количестве метацеркарий диплостом менее 10 хрусталик сохраняет прозрачность. Более 20 паразитов в хрусталике приводят к частичной потере прозрачности, которая, по всей видимости, носит обратимый характер. Большое количество паразитов дает в щелевую лампу картину «звездного неба», причем основная масса паразитов локализуется вокруг твердого ядра хрусталика. В таблице 2 приведены данные биомикроскопии 200 особей карпа и пескаря.

Таблица 2

Характер поражения хрусталика карпа и пескаря обыкновенного в зависимости от количества паразитов

Карп (<i>Cyprinus carpio</i> L.)		Пескарь обыкновенный (<i>Gobio gobio</i> L.)	
Количество паразитов, шт.	Характер поражения хрусталика	Количество паразитов, шт.	Характер поражения хрусталика
2	Нарушение капсулы хрусталика. Гидратация коры и волокон.	2	-
2-4	Отслоение ядра. Начальная катаракта.	2-4	-
4-8	Помутнение всей массы хрусталика.	4-8	-
Более 10	Необратимые изменения хрусталика, воспаление роговицы глаза	10-15	-
		15-20	У отдельных особей отмечено нарушение капсулы хрусталика
		Более 20	Незначительное нарушение прозрачности хрусталика

Помимо этого исследовали взаимодействие хрусталика пескаря с метацеркариями диплостом на гистологических препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином.

В результате исследований удалось выявить новый, ранее

не известный, способ реагирования хрусталика на инвазию паразитами. На препаратах видно, что поврежденные волокна хрусталика не теряют прозрачности по всей длине, а фрагментируются вокруг метацеркария в виде капсулы, ограничивая дальнейшее помутнение.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный анализ биомикроскопических данных хрусталика показывает, что оптические отклонения чаще наблюдаются при наличии паразита в левом глазу карпа, чем в правом. Мы не находим пока биологических закономерностей, объясняющих это явление. Наибольший процент поражения хрусталика (19 %) при наличии единичных метацеркарий в глазу - это отслоение ядра хрусталика, при этом волокна ядра и коры хрусталика остаются еще достаточно прозрачными. Визуальное наблюдение хрусталиков рыб с этими поражениями не позволяет выявить отмеченной аномалии, она проявляется только при исследовании с помощью щелевой лампы.

Исследования динамики патологических процессов в хрусталике рыб в течение 30 дней показывают, что помутнение развивается медленно и, видимо, занимает несколько месяцев, прежде чем появляются новые оптические отклонения в хрусталике.

Присутствие метацеркарий диплостом приводит к поражению хрусталика в целом, даже если паразиты встречаются в единичных экземплярах. У некоторых особей оптические свойства хрусталика при наличии паразитов не меняются (24,3 % обследованных хрусталиков). Отклонения ядра хрусталика при локализации паразита на переднем полюсе указывает на наличие метаболитов метацеркарий, которые, видимо, действуют на мукополисахариды, играющие роль цемента для хрусталиковых волокон [11].

В результате наших исследований изучался механизм устойчивости к поражению хрусталика паразитами у 2 видов рыб. Наиболее чувствительным к инвазии метацеркариями оказался карп. Даже незначительное количество паразитов у годовиков карпа вызывало необратимые нарушения прозрачности хрусталика, что, вероятно, связано с отсутствием механизмов защиты от паразитов [2].

У пескаря нами был открыт неизвестный ранее механизм реакции хрусталика на заражение паразитами. Капсула хрусталика у этого вида рыб не является препятствием для

инвазии паразитами. Однако волоконная часть хрусталика не теряет прозрачности даже при поражении 15-ю метацеркариями диплостом. Вокруг паразита хрусталиковые волокна фрагментируются, не теряя прозрачности по всей длине. Вероятно, это обусловлено низкой чувствительностью тканей хрусталика к заражению личинками трематод *D. spathaceum*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная работа позволила вскрыть механизм устойчивости хрусталика пескаря к проникшим в него метацеркариям, за счет образования капсулы вокруг паразита. Не исключено, что капсулу образует сам паразит в ответ на вещества, выделяемые волокнами хрусталика рыб, эволюционно приспособленных к проникновению метацеркарий в линзу глаза. Подобный механизм у карповых и лососевых рыб, видимо, отсутствует, и проникновение в хрусталик более четырех личинок может привести к катаракте.

Данная работа заставляет обратить внимание на частые случаи поражения хрусталиков рыб, используемых в лабораторных исследованиях, поэтому при проведении экспериментов на хрусталике требуются предварительная биомикроскопия перед началом опыта и отбор рыб с хрусталиком без оптических аномалий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бауер О.Н., Мусселиус В.А., Стрелков Ю.А. Болезни прудовых рыб. - 2-е изд., перераб. и доп. М.: Легкая и Пищевая промышленность, 1981. 320 с.
2. Винников Я.В., Бородина И.П. Материалы по морфологическому анализу движения глаз // В сб. Труды 4-го совещания по физиологической оптике. М.-Л., 1958. С. 394-397.
3. Гинецинская Т.А. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция. Л.: Наука, 1968. 406 с.
4. Догель В.А. Общая паразитология. Л.: Изд. ЛГУ, 1962. 461 с.
5. Иванов Ю.Н., Симаков Ю.Г., Никифоров-Никишин Д.Л., Хрущева Т.Г. Компьютерное моделирование энергетических взаимодействий между хрусталиком рыб и метацеркариями диплостом // Материалы. конф. «Водные экосистемы и организмы». М.: МГУ, 2000. С. 20-21.

6. Канаев А.И. Ветеринарная санитария в рыбоводстве. М.: Агропромиздат, 1985. 280 с.
7. Лилли Р. Патологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1969. 645 с.
8. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Иностранная литература, 1954. 718 с.
9. Рославцев А.В., Урмахер Л.С. Прибор для исследования глаза в инфракрасных лучах // Труды 4-го съезда офтальмологов УкрССР. Киев, 1964. С. 253-255.
10. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: Руководство. М.: Медицина, 1996. 544с.
11. Симаков Ю.Г., Никифоров-Никишин А.Л., Кулаев С.Н. Исследование клеточных структур гидробионтов методами оптоэлектроники // Водные биоресурсы, воспроизводство и экология гидробионтов, М.: ВНИПРХ, 1993. Вып. 67. С. 120-123.
12. Wall T. Methods of examination of the fish lens // Int. Conf. "Diseases Fish and Shellfish" Rhodes, 19-24 Sept., 1999. Book Abstr. Rhodes. 1999. P. 6.

MORPHOLOGICAL AND HISTOLOGIC CHANGES IN A CRYSTALLINE LENS OF FISHES AT DIPLOSTOMOSIS

Nikiforov-Nikishin A.L., Simakov J.G., Borodin A.L.
Moscow State University of Technology and Management

In work the comparative analysis of influence of diplostomosis on a morpho-functional condition of a crystalline lens of young carp *Cyprinus carpio* L. and ordinary gudgeon *Gobio gibus* (L) will be carried out. Dependence of pathological infringements of a crystalline lens under influence of parasite *Diplostomum spathaceum* from a kind of fishes is shown. The carried out researches have allowed to open the mechanism of stability of a crystalline lens of the gudgeon to metacercaries due to formation of a capsule around of the parasite.

**ПРИЧИНЫ И УСЛОВИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ
ВСПЫШКИ АЛИМЕНТАРНО-ТОКСИЧЕСКОЙ
ПАРОКСИЗМАЛЬНОЙ МИОГЛОБИНУРИИ
В ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ**

Размашкин Д.А., Бурундукова Т.С.

*г. Тюмень, Государственный научно-производственный
центр рыбного хозяйства*

В статье обсуждаются причины вспышки алиментарно-токсической миоглобинурии среди людей, кошек и собак в 2000 году в Тюменской области. Приводятся результаты исследования, согласно которым к вспышке заболевания приводит поедание животными токсичных рыб из озер с неблагоприятной гидрологической и токсикологической обстановкой. Одним из вероятных источников накопления токсинов в рыбах являются ядовитые растения затопляемых участков, в частности, хвощ речной. Исследованы клиническая и патологоанатомическая картины токсикоза у животных.

В 2000 г. в Тюменском районе наблюдалась вспышка алиментарно-токсической пароксизмальной миоглобинурии (АТПМ) среди людей, кошек и собак. Источником токсикоза был серебряный карась, отлавливаемый в осушительных каналах и озерах западной части Тарманского болотного массива [1, 2].

Вспышке предшествовало значительное повышение уровня воды после предшествующих маловодных лет.

Весенний 2000 г. максимальный подъем воды в озере Среднее Тарманское уже в начале апреля был на 199 см выше условного нулевого уровня. Наблюдалось затопление прилегающих к Тарманским озерам болот и пониженных после добычи торфа площадей с отметками 60,2 м и ниже над уровнем моря.

В 2001 году из-за затяжной весны и обильных осадков в июне и июле уровень воды в оз. Среднее Тарманское изменялся плавно и во второй декаде мая достиг 175 см выше условно нулевого уровня. Минимальный уровень был в первой декаде октября – 161 см. Существенного затопления прилегающих к озерам низменных участков не происходило.

Весной 2002 г. уровень воды в этом озере в апреле был 188 см; максимальный уровень – 191 см 14 мая. В этот период уровень воды в озере Большое Тарманское достиг 60,41 м над уровнем моря. Обстановка в водоемах неблаго-

получного района по уровням воды была близка к показателям 2000 г. Происходило значительное затопление прилегающих к озерам болот и низменных площадей. Уже в конце апреля 2002 г. наблюдался подъем воды в болоте выше берегов отдельных осушительных каналов и затопление площадей с уровнем 60,2 м и ниже.

Подобный высокий уровень воды в оз. Среднее Тарманское был отмечен и в период до начала осушительных работ и добычи торфа в этом районе (197 см, 14-19 мая 1966 г.) [3]. При таком уровне воды происходило затопление прилегающих к Тарманским озерам болот, но тем не менее вспышка АТПМ в районе этих озер не возникла.

В указанный период годовой ход уровня воды в оз. Среднее Тарманское был плавным и без резких подъемов и спадов. В 1966 г. продолжительность стояния уровня воды на Тарманском болотном массиве на высоте средней поверхности болота (СПБ) и выше ее была продолжительной (в зависимости от микроландшафта болот от 163 до 228 дней). Длительное стояние высоких уровней воды на болоте свидетельствовало о том, что уклоны водной поверхности в этот период были ничтожно малы и существенного поверхностного стока воды с болот в озера не происходило [3].

Интенсивный поверхностный сток воды с прилегающих к озерам болот, как на осушенные при добыче торфа площади, так и в озера, стал возможен только после создания каналов осушительной системы и добычи торфа в районе Тарманских озер. По-видимому, когда происходило преимущественно фильтрационное стекание болотных вод в озера, токсические вещества из речного хвоста поступали в водоемы в незначительном количестве, не способном вызвать токсичность рыб.

В весенний период 2003 г. максимальный уровень воды по водпосту на озере Среднее Тарманское был в первой декаде мая 175 см. В дальнейшем происходило постепенное снижение уровня воды с периодическими очень незначительными его повышениями после обильных осадков. В третьей декаде октября средний уровень воды в озере составил 145 см.

Максимальный уровень воды в озере был ниже по сравнению с 2000 годом на 24 см и по сравнению с 2002 годом - на 16 см. При таком подъеме воды не происходило затопление прилегающих к озерам болот и осушенных в прошлом площадей.

В связи со снижением уровня воды в озерах произошло и

понижения уровня воды в болотах? на площади водосбора этих водоемов происходил сток болотных вод в озера, в основном за счет ее фильтрации.

Изменения гидрологической обстановки, судя по результатам биопроб на кошках для обнаружения токсических веществ, вызывающих АТПМ, отразились на эпизоотическом состоянии неблагополучных по токсикозу водоемов [4]. Если в 2000 г. токсичными были караси из осушительных каналов к югу от озер Тарманской группы, а также из озер: Большое Тарманское, Среднее Тарманское, Копанец, Шайтанское, то в октябре 2001 г. по озеру Большое Тарманское был получен отрицательный результат, при проведении биопробы по оз. Среднее Тарманское признаки интоксикации у кошек появились только на 33 сутки с начала скармливания рыб, гибель не отмечена. В 2002 г. после весеннего паводка выраженные положительные результаты биопроб на кошках при скармливании им карасей были получены по всем ранее неблагополучным водоемам. Все кошки, получавшие рыбу из осушительных каналов, оз. Большое Тарманское и оз. Копанец, погибли. В опытах по оз. Среднее Тарманское и оз. Шайтанское погибли соответственно 2 и 1 кошка; выраженная клиника АТПМ отмечена у всех опытных животных [4]. Таким образом, в 2002 г. по сравнению с 2001 г. произошло усиление токсичности карасей в ранее неблагополучных по АТПМ водоемах. В 2003 г. весной был получен положительный результат биопробы на кошках с использованием рыбы из каналов осушительной сети (3 животных погибло). Хотя уровень воды в озерах Тарманского очага был достаточно низким, летом этого же года получены положительные результаты биопроб в связи с сохранением токсичности рыб с выраженной клиникой АТПМ при скармливании экспериментальным животным токсичных карасей из озер Среднее Тарманское и Копанца, гибель кошек не отмечена.

Одним из вероятных источников накопления токсина в рыбах являются ядовитые растения затопленных участков. При выборе ядовитого растения для проведения опытов по накоплению в рыбах токсина руководствовались следующими критериями:

- ядовитое растение должно являться массовым видом на затопляемых территориях и болотах водосбора;
- картина отравления животных ядовитым растением должна быть близка к клинике АТПМ.

На затопляемых в период паводка ранее осушенных бо-

лот из ядовитых растений наиболее распространенным видом являлся хвощ речной (*Equisetum fluviatile*), кроме того, клиника отравления хвощами лошадей довольно сходна с картиной АТПМ у кошек.

При АТПМ клинические признаки хорошо изучены у кошек. Заболевание развивается через 2-15 и более дней после начала кормления токсичной рыбой.

Животные становятся вялыми, малоподвижными, пугливыми, забиваются в темный угол. Затем нарушается движение задних конечностей, происходит паралич, распространяющийся на передние конечности. У животных наблюдается жажда, расширение зрачков, расстройство мочеиспускания. Моча прозрачная. Температура нормальная или слегка понижена. У некоторых наблюдается дрожание головы. В конечной стадии болезни температура тела снижается до 34°C, прекращается мочеиспускание.

С учетом этого были проведены опыты по накоплению токсина из хвоща в рыбах на основании биопроб на лабораторных мышах. Учитывая, что карась в неблагополучных по токсикозу каналах питался преимущественно детритом, хвощ размалывали и полученную массу помещали в аэрируемый аквариум. На субстрате из хвоща развивались сапрофитные бактерии, инфузории и коловратки. Эту массу использовали для кормления рыбы из благополучных по АТПМ водоемов в течении 2-3 мес., которую затем использовали для кормления экспериментальной группы мышей. Мыши контрольной группы получали рыбу из благополучных озер и Тюменского рыбопитомника.

Опытные группы животных получали ежедневно по 8-15 г мышц и внутренних органов токсичного карпа, контрольные — получали мясо карпа из благополучного по АТПМ водоема.

Признаки токсикоза у мышей опытных групп стали появляться с первых дней эксперимента. У них регистрировались: повышенная нервная возбудимость, неопрятность, взъерошенность волос, парез задних конечностей, покраснение ушей и хвоста, оцепенение в характерной позе «треугольника», гибель отдельных животных, а также отмечалось снижение массы тела на 16,7-38,8% от имевшейся в начале опыта, расширение зрачков на $\frac{1}{2}$ и более диаметра радужной оболочки, прищуривание глаз, кровоизлияния по ходу хвоста, полнокровие печени и почек, мелкие кровоизлияния в легких и почках, у некоторых животных — неравномерная окраска тканей печени и переполнение мочой мочевого пузыря. При гистологическом исследовании внут-

ренных органов подопытных мышей были выявлены значительные патоморфологические изменения, преимущественно в нервной системе, скелетной мускулатуре, почках, печени. В скелетной мускулатуре наблюдались набухания отдельных волокон, очаги контрактур, участки глыбчатого распада. У всех мышей отмечена утрата поперечной исчерченности миоцитов, ядра их — набухшие, бледно окрашенные, у некоторых миоцитов в состоянии кариолизиса. В миокарде желудочка также наблюдали подобные изменения. В пирамидальных клетках головного мозга отмечен хорошо выраженный перичеселлюлярный отек, ядра отдельных клеток пикноморфные или в виде теней. У колбовидных клеток мозжечка разная форма, отдельные клетки в состоянии плазмолиза или кариорексиса. В большинстве клубочков почек кровеносная сеть и капилляры обоих слоев резко налиты. Эпителий проксимальных канальцев в состоянии выраженной зернистой дистрофии, просвет их сужен, заполнен дистрофически измененными клетками и детритом. В дистальных канальцах отмечаются белковые цилиндры. Балочное строение печени отдельных участков нарушено. Сосуды резко расширены, ядра гепатоцитов в состоянии пикноза, рексиса или лизиса. У двух мышей отмечены некротические участки из 2-3 гепатоцитов.

Был проведен также опыт для выяснения клиники и патологоанатомической картины токсикоза у белых мышей, возникающей при непосредственном воздействии на них токсических веществ, содержащихся в хвоще речном. Данная экспериментальная работа носила поисковый характер.

В начале эксперимента мышей опытной группы кормили сухарями из пшеничного хлеба, пропитанного отваром хвоща и повторно высушенными. При приготовлении отвара одну часть размолотого хвоща заливали таким же количеством воды и кипятили. После отстаивания полученный отвар фильтровали и использовали для пропитывания сухарей.

Мыши опытной группы получали по 15г сухарей на особь в день, пропитанных отваром хвоща, контрольная группа — в таком же количестве сухари без пропитывания их отваром. В ходе опыта сухари давали по мере их потребления в опытной и контрольной группах. Обе группы получали воду без ограничений.

На указанном рационе мышей содержали 29 дней.

В этот период у отдельных мышей периодически отмечались клинические признаки токсикоза: повышенная возбу-

димось, стремление спрятаться, взъерошенность волос; у двух мышей отмечено передвижение прыжками, у одной - кратковременный парез (на следующий день мышь вела себя в пределах нормы). Не произошло существенных изменений средней массы мышей в опытной и контрольной группах (средняя масса мышей в начале опыта - 29,25 г, через 29 дней - 29,9г; в контроле соответственно 27,0 и 27,15г).

В дальнейшем для усиления воздействия токсинов хвоща в рацион мышей опытной группы добавили по 1г в день на животное сена хвоща, а воду заменили профильтрованным водным настоем этого растения.

После перехода на указанный рацион признаки токсического воздействия хвоща на мышей опытной группы усилились. Наблюдались парезы и параличи задних конечностей, расширение зрачка на \times и более диаметра радужной оболочки, прищуривание глаз, у трех из четырех мышей в терминальной стадии токсикоза отмечено оцепенение в характерной для клиники у мышей при АТПМ позы треугольника. После перехода на указанный рацион 3 особи погибли (на 8, 11 и 18 сутки), и одна мышь, находящаяся в терминальном состоянии, была усыплена серным эфиром на 25 сутки. За второй период опыта, к моменту гибели, мыши опытной группы потеряли в среднем 17,7% массы тела, масса мышей контрольной группы увеличилась в среднем на 7,2%.

В опыте, где мышей кормили сухарями, пропитанными настоем хвоща, у подопытных мышей картина изменений сходна с таковой в предыдущем опыте, в котором мыши получали токсичную рыбу. Основные отличия заключаются в следующем: в миокарде сохраняется поперечная исчерченность, в печени отмечается деление гепатоцитов.

Учитывая, что при повышении уровня воды в озерах и на площади водосбора может происходить экстрагирование токсинов не только из хвоща, но и из других ядовитых растений, встречающихся на затопляемых площадях, представляет интерес моделирование токсичности рыб за счет использования таких растений. В частности, в зарослях хвоща речного в прибрежных участках и на болотах у озер неблагоприятного по АТПМ района довольно обычным видом является *Petasites frigidus* - петазитес холодный (белокопытник болотный). Сложноцветные этого вида содержат алкалоиды типа сенцианина и платифиллина, отравление которыми вызывает сердцебиение, расширение зрачков, возбуждение центральной нервной системы, задержку мочеот-

деления, одышку, судороги. Моделирование токсичности рыб путем накопления в них токсинов из петазитеса холодного проводилось по схеме, использованной при моделировании токсичности рыб, вызванной токсинами хвоща речного.

У мышей опытной группы уже на вторые сутки с начала их кормления токсичной рыбой появились признаки токсикоза: взъерошенные волосы, повышенная возбудимость, сменяющаяся в дальнейшем угнетенным состоянием. У одной особи отмечены кратковременные судороги задней конечности, из-за чего она при передвижении заваливалась набок, но такое состояние продолжалось менее одной минуты, а затем мышь передвигалась нормально. Одна мышь погибла к вечеру вторых суток опыта. Перед смертью задние конечности у нее были судорожно согнуты в тазобедренном и коленном суставах, а плюсны вытянуты вдоль хвоста. В дальнейшем мышей, находящихся в терминальном состоянии, усыпляли серным эфиром. Одна мышь усыплена на третьи сутки, две – на четвертые сутки и одна - на пятые сутки с начала опыта. У мышей в агональном состоянии наиболее характерным было судорожное сокращение мышц задних конечностей. Масса тела погибших мышей в среднем была на 15,7% меньше, чем в начале опыта. У мышей контрольной группы масса тела увеличилась к концу опыта на 10,4%. При вскрытии у погибшей и усыпленных особей отмечены переполнение кровью сосудов головного мозга, брюшины, кишечника, кожи, многочисленные кровоизлияния в стенке кишечника.

В данном опыте наблюдались несколько иные изменения в патоморфологической картине. В головном мозге отмечается перипеллюлярный отек, особенно выраженный в белом веществе. Цитоплазма нейронов стволовой части и двигательных нейронов в одном случае в состоянии слабо выраженной вакуольной дистрофии. Ядра и цитоплазма отдельных пирамидальных и колбовидных клеток бледные, набухшие. Ядра отдельных ганглиозных клеток в виде теней, и в них значительно снижено количество базофильной субстанции. В скелетной мускулатуре и миокарде в отдельных волокнах поперечная исчерченность слабо заметна или отсутствует. В проксимальных канальцах почек отдельные эпителиальные клетки с набухшей цитоплазмой и ядрами в состоянии пикноза и рексиса. В просвете таких канальцев – небольшие скопления гомогенной слабозозинофильной массы. Изменения в клетках печени отмечены в одном случае: гепатоциты с пикнотичными ядрами и мелкозернистой

цитоплазмой. Селезенка переполнена кровью, в ней увеличено содержание гемосидерина. В легких в 3-х из 5-ти случаев капилляры резко гиперемированы, наблюдаются кровоизлияния, а в межальвеолярной соединительной ткани наличие гемосидерина. В желудочно-кишечном тракте целостность слизистой ворсин сохранена, в главных клетках увеличена базофилия. Только в одном случае отмечен карипикноз и карирексис в слизистой толстого отдела кишечника, а в основании ворсин – незначительные некротические участки.

Таким образом, картина токсикоза у мышей, получавших карпа с экспериментально вызванной токсичностью за счет использования детрита из петазитеса холодного, существенно отличалась от наблюдаемой у белых мышей при отравлении токсинами хвоща речного.

В 2002 г. был проведен эксперимент на мышах с использованием токсичной рыбы из Тарманских озер и каналов осушительной системы. Клинические признаки у мышей начали проявляться с первых дней опыта. Были отмечены: угнетенное состояние, повышенная нервная возбудимость, отсутствие туалета, полиурия. Затем появились характерные для данного токсикоза признаки: передвижение прыжками, парезы и параличи задних конечностей, перемещение с опорой на плюсны, расширение зрачков на $\frac{1}{2}$ и более диаметра радужной оболочки, прищуривание глаз. У всех животных наблюдалось оцепенение в позе «треугольника». На 10 сутки погибла первая мышь, находящаяся в терминальном состоянии в позе «треугольника» в течение 4х суток. Остальные 4 мыши были декапитированы в терминальном состоянии на 12 сутки, они все находились в оцепенении в позе «треугольника». В терминальном стадии у мышей масса тела снизилась на 18%, а температура тела – до 32,8 °С. При вскрытии мышей опытной группы было обнаружено полнокровие печени и почек, застой крови в нижней части тела, отек и кровоизлияния в легких, у всех животных – изменение окраски участков печени и переполнение мочевого пузыря. При гистологическом исследовании внутренних органов подопытных животных в данном случае значительные изменения были выявлены в нервной системе, скелетной мускулатуре, почках, печени и легких. В головном мозге были отмечены периваскулярный и перичеллюлярный отек, у отдельных пирамидальных клеток – набухшая цитоплазма, ядра таких клеток в состоянии лизиса или пикноза. В скелетной мускулатуре наблюдались

значительные участки контрактур, глыбчатого распада, колбовидные набухания и фрагментации. Некоторые миоциты лишены поперечной исчерченности, ядра их – в состоянии лизиса. Подобные изменения отмечены и в миокарде. В почках выявлена зернистая дистрофия, капилляры резко налиты, значительная часть канальцев – в состоянии некробиоза. Балочное строение печени нарушено, гепатоциты – в состоянии зернистой дистрофии, отмечались участки из 3-5 гепатоцитов в состоянии некробиоза и некроза.

В 2002 г. планировалось проведение новых вариантов по моделированию токсичности рыб за счет их кормления детритом из речного хвоща, а также отравление их хвощем. Получение детрита из хвоща проводили по схеме, использованной при моделировании токсичности рыб, вызванной токсинами хвоща речного. Результаты этих работ в начальный период опыта существенно не отличались от результатов уже проведенных экспериментов по моделированию токсичности у рыб с применением детрита из хвоща. В аэрируемом аквариуме на размолотом хвоще успешно развивались сапрофитные бактерии, инфузории и коловратки. Полученный детрит начали скармливать рыбам. Затем, в результате многодневного прекращения аэрации воды в аквариуме, в котором подготавливали детрит хвоща, произошла гибель популяций аэробных бактерий, инфузорий и коловраток. В аквариуме начали развиваться личинки комара – *Culex ripiens ripiens* L; численность бактерий, способных развиваться в анаэробных условиях, была крайне низкой. При микроскопическом исследовании детрита были обнаружены только единичные экземпляры спирохет. Скармливание такого детрита рыбам не вызвало появления в них токсичности. Результаты биопроб на мышах по скармливанию такой рыбы были отрицательными. Попытки использовать для отравления мышей профильтрованный настой хвоща также были безуспешными.

Отрицательные результаты данных опытов интересны, так как они показали, что успешное накопление в гидробионтах водоемов токсинов из хвоща может проходить только в аэробных условиях. Наиболее благоприятные условия для этого возникают в период весеннего паводка при затоплении зарослей хвоща на прилегающих к водоемам территориях и площади водосбора.

Поскольку попадающий в водоем токсин, вызывающий АТПМ, воздействует не только на людей и домашних животных, потребляющих рыбу из неблагополучных водоемов.

В отдельных случаях отмечена гибель рыб, а также диких животных и птиц [3]. В связи с этим целесообразно рассмотреть вопрос, в какой мере отразилось неблагополучие по АТПМ Тарманских озер на рыбах и рыбообразных птицах неблагополучного района.

Массовая гибель рыб в озерах не наблюдалась. О воздействии на рыб токсинов, вызывающих АТПМ, можно было судить на основании обратного расчета темпа роста карася серебряного из озера Среднее Тарманское. По результатам этих расчетов (Табл. 1) оказалось, что темп роста сеголеток после начала вспышки АТПМ в 2000 г. был ниже по сравнению с сеголетками 1999 г. ($P < 0,05$). У сеголеток относительно благополучного по уровню воды 2001 г., когда намечилось улучшение эпизоотической обстановки по АТПМ, темп роста увеличился по сравнению с 2000 г. ($P < 0,05$). Эта зависимость сохранилась и по двухлеткам серебряного карася.

Таблица 1
Расчетные средние размеры карасей серебряных озера Среднее Тарманское 1999-2003 г.г.

Поклоение серебряного карася от переста, г.	Средние размеры рыб, см				
	1999	2000	2001	2002	2003
1999	6,167±0,44	8,813±1,12	11,645±1,01	13,648±1,2	15,560±0,97
2000	-	3,823±0,29	6,280±0,32	9,688±0,31	11,600±0,30
2001	-	-	5,658±0,44	8,755±1,32	11,480±1,29

По результатам изложенных опытов можно сделать вывод о том, что хвощ речной в данном случае является первоисточником накопления токсинов в рыбах неблагополучного по АТПМ района, в других случаях, по-видимому, может быть вызван другими видами не менее ядовитых растений, например, хвощем болотным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Размашкин Д.А., Бабушкин А.А., Митрофанова Т.С. Условия возникновения вспышки алиментарно-токсической пароксизмальной миоглобинурии в Тюменской области // Тезисы докладов 8 съезда Гидробиологического общества, т. 2. - Калининград, 2001. - С 166-167
2. Митрофанова Т.С. Об этиологии алиментарно-токсической пароксизмальной миоглобинурии в Тюменской обла-

сти//Проблемы воспроизводства, кормления и борьбы с болезнями рыб при выращивании в искусственных условиях. Материалы научной конференции 14-18 октября 2002 г.- Петрозаводск.-2002.-С. 148-153

3. Болота Западной Сибири, их строение и гидрологический режим / Под редакцией К.Е. Иванова, С.М. Новикова.-Л.: Гидрометеиздат, 1976.-448 с.

4. Алиментарно-токсическая пароксизмальная миоглобинурия. Методика определения в рыбе токсических веществ, вызывающих алиментарно-токсическую пароксизмальную миоглобинурию (АТПМ) у человека и животных, на белых мышцах. Утверждена Департаментом ветеринарии Минсельхоза России 22 октября 2003 года.- Тюмень, 2003.-4 с.

THE REASONS AND CONDITIONS OF OCCURRENCE OF FLASH OF ALIMENTARY TOXIC PAROXYSMAL MIOGLOBINURIA IN THE TYUMEN AREA

Razmashkin D.A., Burundukova T.S.

*Tyumen, the State research-and-production centre of a fish
facilities*

In article the reasons of flash alimentary-toxic mioglobinuria among people, cats and dogs in 2000 in the Tyumen area are discussed. Results of research according to which in flash of disease results eating animals of toxic fishes from lakes with unsuccessful hydrological and toxicological conditions are resulted. One of probable sources of accumulation of toxin in fishes are poisonous plants of flooded sites, in particular, a horsetail river. Clinical and pathoanatomical pictures of a toxicosis at animals are investigated.

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В СИСТЕМЕ ПАРАЗИТ – ХОЗЯИН НА ПРИМЕРЕ *LIGULA INTESTINALIS* (CESTODA, PSEUDOPHYLLIDEA) – *ABRAMIS BRAMA* (L.)

Н.И.Силкина, В.Р.Микряков

Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанова РАН,
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н

Проведено сравнительное исследование состояния показателей перекисного окисления липидов в тканях у плероцеркоидов *Ligula intestinalis* и промежуточного хозяина - леща *Abramis brama L.* - по данным анализа уровня общих липидов (ОЛ), содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА) и общей антиокислительной активности (ОАА). Показана зависимость исследованных признаков от размера паразита. Длинные паразиты отличались от мелких более высоким уровнем МДА и интенсивностью ОАА. Установлен повышенный уровень МДА и низкие величины ОАА у инвазированных рыб по сравнению с неинвазированными.

ВВЕДЕНИЕ

Плероцеркоиды *Ligula intestinalis* (Cestoda, Pseudophyllidea) обитают в полости тела карповых рыб, являющихся их промежуточным хозяином, и оказывают супрессивное влияние на показатели роста, развития и гаметогенеза, вызывают нарушение функциональных свойств, обеспечивающих функционирование иммунной системы, индивидуальную целостность организма в онтогенезе [8; 9; 10; 11; 13; 14; 15; 17; 19; 29; 30; 34]. Происходящие в организме инвазированных рыб изменения, вызванные плероцеркоидами *L. intestinalis*, связаны с нарушениями ряда жизненно важных функций организма хозяина, в том числе и функций иммунной системы, и его физиологического состояния [16]. Негативное воздействие паразитов на рыб отражается снижением темпов роста, упитанности, массы тела, редукцией гонад, снижением индекса печени и ее жирности, изменением всех видов обмена: пластического, энергетического и генеративного, сдвигом картины крови и др. Инвазия рыб плероцеркоидами сопровождается нарушением липидного обмена, усилением свободнорадикальных и перекисных процессов, дефицитом образования структур

антиоксидантной защиты [7; 16; 25; 26; 27; 31]. Вместе с тем, многие вопросы в системе *L. intestinalis* - рыба, связанные с нарушением липидного обмена обоих партнеров, следует считать слабо разработанными [4; 7; 23; 24; 35; 36]. В доступной литературе отсутствуют сведения об особенностях перекисного окисления липидов (ПОЛ) и общей антиокислительной активности (ОАА) как у плероцеркоидов *L. intestinalis*, так и у рыб. Между тем, знание этого вопроса представляется весьма важным в деле понимания механизмов взаимной адаптации обоих партнеров и характера влияния паразитов на организм хозяина в процессе подготовки червя к обитанию в окончательном хозяине (рыбоядных птицах).

В связи с этим целью данной работы было изучение особенностей ПОЛ и антиокислительной защиты (АЗ) у плероцеркоидов *Ligula intestinalis* (Cestoda, Pseudophyllidea) разной длины и выяснение влияния паразитов на состояние липидной системы организма их промежуточных хозяев - лещей *Abramis brama* (L.) Рыбинского водохранилища.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили плероцеркоиды *Ligula intestinalis* (Cestoda, Pseudophyllidea) и ткани пораженных и непораженных лигулидами рыб *Abramis brama* (L.) - половозрелых самцов в возрасте 8+. Сбор материала проводили на Рыбинском водохранилище. Плероцеркоиды разделили на 3 группы, различающиеся длиной тела: в I-ю группу включили червей размером до 80 мм, во II-ю - до 200 мм и в III-ю - до 420 мм. Липиды из тканей плероцеркоида и их хозяев (сыворотки крови и печени) экстрагировали по способу Фолча [33]. ПОЛ и ОАА определяли в гомогенатах тканей лигулид и их хозяев общепринятыми методами. Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА) - одного из конечных продуктов перекисного окисления. Концентрация МДА определялась на основе учета количества продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой и дающих с ней окрашенный комплекс. Интенсивность окрашивания определяли спектрофотометрически по изменению максимума поглощения при 532 нм [1]. Общую антиокислительную активность биологического материала (ОАА) устанавливали по кинетике окисления восстановленной формы 2,6-дих-

лорфенолиндофенола кислородом воздуха в присутствии и отсутствии тканевых экстрактов. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 510 нм [20]. Данные обработаны методом вариационной статистики с использованием пакета прикладных данных «Excel 97», применяя *t*-тест Стьюдента с последующей оценкой различий при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что паразиты, извлеченные из полости тела рыб, отличались как размерами, которые колебались от 80 до 420 мм, так и содержанием продуктов ПОЛ и антиокислительной активностью (табл.1). В тканях червей небольшой длины содержание общих липидов составило 870 мг%, тогда как у особей III группы данный показатель находился на уровне 920 мг%. Интенсивность накопления продуктов перекисного окисления липидов также изменялась: у особей II группы количество МДА превышало таковое I группы на 15.5%, а у червей III группы - в 1.9 раза. С увеличением размера *L. intestinalis* отмечено также возрастание ОАА: у червей II группы - на 3%, а у III-ей - на 21.9% по сравнению с особями I группы. Высокий уровень содержания общих липидов, обнаруженный у длинноразмерных плероцеркоидов, видимо, обусловлен интенсификацией процессов ПОЛ и ОАА. Накопление липидов в теле плероцеркоида с увеличением длины, вероятно, связано с повышением окислительных процессов в связи с нарастанием массы тела личинок и их подготовкой к созреванию для перехода на половозрелую стадию развития в организме окончательного хозяина. Антиокислительный статус червя связан с разным потреблением кислорода тканями организма в целом при его росте и развитии. Для каждого периода роста характерно определенное соотношение процессов ПОЛ и АЗ, поскольку окислительные и антиоксидантные системы, являющиеся важными звеньями и составляющими гомеостаза организма, способны хорошо защищать организм от последствий колебания неблагоприятных факторов среды [2; 3; 6; 19]. Наличие высокого содержания липидов у плероцеркоидов, видимо, обусловлено необходимостью обеспечения и поддержания окислительных реакций в процессах их роста.

По данным проведенных исследований у личей одного возраста и пола выявлены существенные отличия исследо-

важных показателей липидного обмена у непораженных рыб и при заражении их *L. intestinalis*, причем отличия были выражены сильнее у рыб, являющихся хозяевами паразитов большей длины (табл.2). Уровень общих липидов в сыворотке крови лещей, имеющих червя до 80 мм, достоверно не отличался по сравнению с интактными. Напротив, у рыб, в полости тела которых выявлены черви большого размера, содержание липидов в сыворотке крови было больше на 25.5%. В печени лещей с небольшим червем (80 мм) накапливалось общих липидов на 7.2%, а в печени рыб с червем длиной 420 мм – на 15.6% больше, чем у интактных.

Таблица 1

Показатели липидов у плероцеркоидов *L. intestinalis* (M±m)

Показатели	I группа	II группа	III группа
Общие липиды, мг%	870±35	905±30	920±30*
МДА, нмоль/г	0.84±0.03	0.92±0.11*	1.61±0.14*
ОАА, л.мл ⁻¹ .мин ⁻¹	3.97±0.76	4.09±0.45	4.84±0.94*

Примечание. M – среднее арифметическое; m – ошибка среднего;
* – достоверно относительно червей I группы.

Таблица 2

Содержание ОЛ, МДА и интенсивность ОАА у инвазированных и неинвазированных лещей (M±m)

Показатели	Лещ незараженный	Лещ, пораженный <i>L. intestinalis</i>	
		Длина червя 80 мм	Длина червя 420 мм
Общие липиды, мг%:			
в сыворотке крови	920±35	915±40	1155±35*
в печени	1465±20	1570±35*	1695±25*
МДА, нмоль/г:			
в сыворотке крови	0.881±0.05	1.172±0.04*	1.436±0.07*
в печени	7.325±0.845	9.843±0.23*	12.911±0.85*
ОАА сыворотки крови, л.мл ⁻¹ .мин ⁻¹	(2.62±0.04)×10 ⁻³	(1.89±0.07)×10 ^{-3*}	(2.34±0.08)×10 ^{-3*}

Примечание. M – среднее арифметическое; m – ошибка среднего;
* – достоверно относительно незараженных рыб.

В сыворотке крови и печени пораженных рыб отмечены достоверно более высокие значения содержания МДА по сравнению с таковыми у непораженных особей. У рыб, имеющих червя до 80 мм, концентрация МДА в сыворотке крови составляла 1.172 нмоль/г, у лещей с крупным плероцеркоидом - 1.436 нмоль/г, тогда как в контроле - 0.881 нмоль/г. В печени рыб уровень МДА составил соответственно 9.843 и 12.911 против 7.325 нмоль/г в контроле. Повы-

шенный уровень содержания МДА, обнаруженный в тканях рыб, имеющих более крупных паразитов, свидетельствует об интенсификации процессов ПОЛ, вызванных ростом червя и усилением силы стрессирующего влияния паразитов на хозяев.

Более интенсивные перекисные процессы в крови и печени пораженных рыб по сравнению с контролем коррелировали с пониженной антиокислительной активностью тканевой пораженных рыб. ОАА в сыворотке крови незараженных рыб равнялась 2.62×10^3 лмгл⁻¹мин⁻¹; у пораженных мелкими червями - 1.89×10^3 , тогда как у лещей обладающих червем длиной 420 мм этот показатель составил - 2.34×10^3 лмгл⁻¹мин⁻¹. Рост червя в теле хозяина сопровождался в организме рыб повышением ОАА. Обнаруженное снижение ОАА в тканях хозяина, имеющего крупного плероцеркоида свидетельствует, что под влиянием паразита у рыб снижается содержание антиоксидантов.

Поскольку роль липидов, выполняющих разнообразные функции в организме животных, весьма важна и многообразна, многие стороны липидного обмена у рыб в последние годы интенсивно изучаются [5; 12; 21; 22; 28]. Будучи основным источником энергии и важным компонентом биомембран у рыб, они участвуют в процессах адаптации к условиям среды и в процессах иммунитета [14; 15; 17]. Одним из важных сторон липидного обмена является перекисное окисление липидов (ПОЛ), присущее любому биологическому организму. ПОЛ – экзотермический химический процесс окислительной модификации нейтральных липидов и фосфолипидов [2]. Образование перекисных группировок происходит преимущественно в биологических мембранах эндоплазматического ретикулума, митохондриях и ядрах. Биологический смысл ПОЛ рассматривается, с одной стороны, как нормальный процесс биологического окисления перекисного типа, протекающий параллельно свободному окислению, сопряженному с фосфорилированием, с другой стороны, - как накопление промежуточных метаболитов и физиологически активных интермедиаторов в процессе образования свободных радикалов, альдегидов, кетонов, пероксидов, гидропероксидов, диеновых конъюгатов, с третьей стороны, - как защитный механизм организма на физиолого-биохимическом уровне в ответ на действие стрессорных и других неспецифичных для организма факторов. ПОЛ является активным метаболическим и регуляторным фактором. Развитие ПОЛ катализируется в основном разными

формами активного кислорода: супероксидным и гидроксильным радикалами, синглетным кислородом, пероксидами. При нормальных условиях ПОЛ осуществляется на определенном стационарном для каждого живого организма уровне, благодаря системе антиоксидантной защиты (АЗ), к которой относятся антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза, пероксидаза, глутатионпероксидаза, каталаза и др.), неферментные (α -токоферол, β -каротин, глутатион крови и др.) и низкомолекулярные соединения, образующие при взаимодействии с радикалами малоактивные вещества. Система АЗ у рыб препятствует накоплению продуктов ПОЛ в организме и обеспечивает их детоксикацию [6; 32]. В организме животных существует определенный баланс системы ПОЛ и общей антиоксидантной активности (ОАА). При воздействии экстремальных факторов равновесие в системе ПОЛ – ОАА смещается в сторону усиления ПОЛ [2].

Изменения в системе липидного метаболизма и окислительного гомеостаза, происходящие в организме пораженных *L.intestinalis* рыб, обусловленные активацией свободнорадикальных и перекисных реакций, приводят к серьезным нарушениям в жизнедеятельности организма хозяина [3; 18]. Полученные нами данные согласуются с данными других авторов, показавших усиление процессов ПОЛ в организме рыб, пораженных другими видами паразитов. Так, в частности, в работе Тойвонен с соавторами было показано, что у больных катарактой рыб содержание МДА в хрусталике глаза было повышено в 2 раза сравнительно со здоровыми [2]. В нашем исследовании выявлено, что усиление ПОЛ характерно также и для других тканей пораженного плероцеркоидом организма рыб (крови и печени). У пораженных плероцеркоидом рыб нами также отмечено повышение содержания МДА и снижение общей антиокислительной активности в сыворотке крови и печени.

Таким образом, анализ полученных результатов свидетельствует, что с ростом гельминта в его организме происходит изменение зоны равновесия окислительного гомеостаза. Кроме того, как следует из приведенных данных, инвазия *L.intestinalis* вызывает у рыб существенные изменения ПОЛ и ОАА в исследованных тканях. Негативное воздействие плероцеркоида на организм рыбы проявляется в интенсификации перекисных процессов и дефиците образования структур антиоксидантной защиты. Описанные выше изменения оказывают отрицательное влияние на жизненно важные функции тканей хозяина и его организм в целом.

Анализ данных, полученных на тканях зараженных и незараженных рыб, позволяет сделать вывод, что инвазия лещей плероцеркоидами *L.intestinalis* вызывает изменения в липидном обмене их тканей, а также в поддержании равновесного состояния окислительно-восстановительных процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. 1988. № 11. С.41-43.

2. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов в сыворотке крови хрящевых и костистых рыб Черного моря // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 1995. Т.31. № 1. С.14-20.

3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.

4. Высоцкая Р.У. Углеводный, липидный и аминокислотный состав некоторых гельминтов пресноводных рыб. Автореф. дис... канд. биол. наук. Петрозаводск, 1973. 18 с.

5. Гершанович А.Д., Лапин В.И., Шатуновский М.И. Особенности обмена липидов у рыб // Успехи соврем.биологии. 1991. Т.3. Вып.2. С.207-219.

6. Грубинко В.В., Леус. Ю.В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у рыб (обзор) // Гидробиол. журн. 2001. Т.37. № 1. С.64-78.

7. Гурьянова С. Д. Липидный состав отдельных тканей налима при заражении их гельминтами // Биохимия пресноводных рыб Карелии. Петрозаводск: Наука, 1980. С. 36-40.

8. Давыдов О.Н., Исаева Н.М. Паразиты рыб при воздействии токсикантов в природе и эксперименте (Обзор) // Гидробиол. журн. 1997. Т.33. № 3. С. 70-80.

9. Дубинина М.Н. Ремнецы фауны СССР. М.-Л.: Наука, 1966. 261 с.

10. Извекова Г.И. Некоторые аспекты паразито-хозяйнических отношений в системе *Ligula intestinalis* (Cestoda, Pseudophylidae) – лещ // Изв. РАН. Сер. Биол. 1999. № 3. С. 1-6.

11. Извекова Г.И. *Ligula intestinalis* (L.) (Cestoda, Pseudophylidae): некоторые аспекты углеводного обмена плероцеркоидов // Биол. внутр. вод. 2000. № 2. С. 101- 106.

12. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. Л.:Нау-

ка, 1981. 339 с.

13. Куперман Б.И., Жохов А.Е., Извекова Г.И., Таликина М.Г. Динамика зараженности лигулидами лещей волжских водохранилищ и паразитохозяйные отношения при лигулезе // Биол. внутр. вод. 1997. № 2. С.41-49.

14. Микряков В.Р. Закономерности функционирования иммунной системы пресноводных рыб: Автореф. дис. ...д-ра биол.наук. – М., 1984. 38 с.

15. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск, 1991. – 154 с.

16. Микряков В.Р., Силкина Н.И.. Иммуно-физиологическое состояние леща Рыбинского водохранилища при лигулезе // Итоги научно-практических работ в ихтиопатологии. Информ.бюлл. МИК. М., 1997. С. 79-80.

17. Микряков В.Р., Силкина Н.И.. Оценка последствий заражения леща плероцеркоидами *Ligula intestinalis* на иммунофизиологическое состояние хозяина // Итоги развития и современные проблемы гельминтологии в России. М.: Наука, 1999.

18. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб на воздействие некоторых абиотических факторов среды. Рук. деп. 15.02.2000, № 388-В00. 2000. 121 с.

19. Прайор У. Роль свободно-радикальных реакций в биологических системах // Свободные радикалы в биологии. М.: Наука, 1979. Т.1. С. 13-67.

20. Пронина С.В., Пронин Н.М. Взаимоотношения в системах гельминты-рыбы. М.: Наука, 1988. 176с.

21. Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиоксидительной активности биологического материала // Укр. биохим. журн. 1985. Т.57. № 3. С.50-52.

22. Сидоров В.С. Экологическая биохимия. Липиды. Л.: Наука. 1983. 240 с.

23. Сидоров В.С., Высоцкая Р.У., Смирнова Л.П., Гурьянова С.Д. Сравнительная биохимия гельминтов рыб: аминокислоты, белки, липиды. Л.,: Наука, 1989. 151с.

24. Силкина Н.И., Микряков В.Р. Особенности состава липидов *Ligula intestinalis* и некоторых тканей ее хозяина *Abramis brama* (L). // Итоги развития и современные проблемы гельминтологии в России. М.: Наука, 1999.

25. Силкина Н.И., Микряков В.Р. Характеристика перекисного окисления липидов и перекисного гемолиза эритроцитов у леща *Abramis brama* (L). Рыбинского водохранилища, зараженного *Ligula intestinalis* и карпа под влиянием

кадмия // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре. М.: Наука, 2000. С. 112-113.

26. Силкина Н.И., Микряков В.Р. Некоторые иммуно-физиологические аспекты взаимоотношений в системе паразит – хозяин на примере *Ligula intestinalis* (Cestoda, Pseudophyllidea) – лещ *Abramis brama* (L.). // Паразиты рыб: современные аспекты изучения. Тез. докл. конф., посвящ. памяти Б.И.Куперману Борок, 2003. С. 49.

27. Силкина Н.И., Микряков В.Р. Влияние *Ligula intestinalis* (Cestoda, Pseudophyllidea) на некоторые показатели липидного обмена у промежуточного хозяина *Abramis brama* (L.). // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. Тез. докл. Всерос. научно-практ. конф. Борок, 2003. С. 116-117.

28. Тойвоонен Л.В., Нефедова З.А., Калиман П.А. Содержание МДА в хрусталиках здоровых и больных катарактой рыб // VIII науч. конф. по экол. физиологии и биохимии рыб, Петрозаводск, сент-окт.1992 г.: Тез. докл. Петрозаводск. 1992. Т. 2. – С.133-134.

29. Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 1980. 238с.

30. Arne C., Owen R.W. Observations on a tissue response within the body cavity of fish infected with plerocercoid of *Ligula intestinalis* (L.) (Cestoda) // J. Fish Biol. 1970. V. 2. P. 35-37.

31. Barus V., Prokes M. Parasite load of *Ligula intestinalis* plerocercoids in adult bream, *Abramis brama* // Acta Universitatis Carolinae Biologica. 1995. V. 39. P. 127-134.

32. Bennet E.M., Behm C.A., Bryant C. The role of the host in the regulation of end-product formation in two strains of the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta* // Int. J. Parasitol. 1990. V. 20. № 7. P. 841-848.

33. Fiho W.D. Fish antioxidant defences – A comparative approach // Braz. J. Med. and Biol. Res. 1996. V. 29. № 12. P. 1735-1742.

34. Folch J., Lees M., Stanley G.N. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues // J. Biol. Chem. 1957. V. 226, № 3. P.497-509.

35. Taylor M., Hoole D. *Ligula intestinalis* (L.) (Cestoda: Pseudophyllidea) plerocercoid induced changes in the spleen and pronephrous of roach, *Rutilus rutilus* (L.) and gudgeon, *Gobio gobio* (L.) // J. Fish Biol. 1989. V. 34, № 4. P. 538-596.

36. Winston G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Compar. biochem. and Physiol. 1991. V. 100. № 1-2. P. 173-176.

**SOME PECULIARITIES OF PEROXIDATION LIPIDS
IN SYSTEM A PARASITEE – HOSTS AT EXAMPLE
OF LIGULA INTESTINALIS (CESTODA,
PSEUDOPHYLLIDEA) – ABRAMIS BRAMA (L).**

I.Silkina, V.R.Mikrjakov

*Institute for Biology of Inland Waters RAS, 152742 Borok,
Russia*

A comparative investigation of the tissue plerocercoids *Ligula intestinalis* also intermediate fish hosts (perch) – of bream *Abramis brama* over facts analysis on the he index common lipids (CL), production peroxid lipid (POL) - MDA, common antioxidant (CAA) are displayed. The dependence of investigations signs from size parasites demonstrated. At long parasites at little by more high level MDA and intense CAA distinguish oneself. During rise level MDA and low size CAA with invasion fishes comparatively on the health.

УДК 591.4

**ИНГИБИТОРЫ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ
В ХРУСТАЛИКАХ РЫБ И АМФИБИЙ**

Симаков Ю.Г., Никифоров-Никишин А.Л., Бородин А.Л.
*МГУТУ, каф. «Биоэкологии и ихтиологии», Москва,
ул. Болотниковская, 15*

В работе исследовалось воздействие ингибиторов митозов в эпителии хрусталика, как при непосредственном контакте хрусталиков донора и реципиента, так и при использовании гомогенатов хрусталика рыб и амфибий. Для исследования влияния растворимых фракций хрусталика на митотическую активность в эпителии хрусталика донора были взяты сеголетки радужной форели (*Salmo trutta gairdneri* (Richardson, 1836)). Анализ воздействия растворимых фракций хрусталика рыб и амфибий на пролиферационную активность в эпителии хрусталика радужной форели показывает, что растворимые фракции хрусталика содержат биологически активные вещества, подавляющие митозы во всех зонах цитодифференцировки. Установлено, что растворимые фракции хрусталика рыб сильнее подавляют митотическую активность в герминативной зоне, но не влияют на клеточную пролиферацию в той степени, как это наблюдается при действии фракций, полученных из гомогенатов хрусталика амфибий.

ВВЕДЕНИЕ

В классических экспериментах Стоун [10] показал, что нормальный хрусталик секретирует в переднюю камеру глаза ингибитор, способный к диффузии, который подавляет у тритонов развитие хрусталика. Позднее было выявлено, что хрусталиками позвоночных животных выделяется ингибитор, подавляющий митозы, который содержит γ -кристаллин и фактор, чувствительный к реактивам, блокирующим SH-группы [1, 11].

Развитие хрусталика идет за счет митотической активности в герминативной зоне эпителия и последующей дифференцировки эпителиальных клеток в хрусталиковые волокна [2]. В эпителии хрусталика находятся специфические белки, которые исчезают с началом дифференцировки [5]. Можно предположить, что полипептиды, выделяемые из эпителия хрусталика могут выступать в качестве стимулятора митозов, в то время как волоконная часть хрусталика содержит ингибиторы клеточной пролиферации.

Большинство работ по пересадке хрусталика и по подавлению Вольфовской регенерации подсаженным хрусталиком проведено на тритонах [6]. В отличие от проведенных ранее работ, мы решили исследовать воздействие подсаженного хрусталика рыб в переднюю камеру глаза лягушек на пролиферационную активность в эпителии хрусталика реципиента. Помимо этого, проведены эксперименты по ингибированию митотической активности в эпителии хрусталика радужной форели гомогенатами хрусталика карпа и травяных лягушек, через кровеносную и лимфатическую системы. Конечной целью этих работ является выявление ингибиторных свойств секретов хрусталиков рыб на митотическую активность эпителиальных клеток хрусталика реципиента.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперимент по влиянию растворимых фракций хрусталика и веществ, выделяемых из целого хрусталика, проводился на рыбах и амфибиях. Для исследования влияния растворимых фракций хрусталика на митотическую активность в эпителии другого хрусталика были взяты сеголетки радужной форели (*Salmo mykiss gairdneri* (Richardson, 1836)), содержащиеся в лабораторных условиях. В общей сложности в опыт было взято 35 рыб, из которых 5 были

контрольными, 15 особям вводился гомогенат хрусталика карпов, и 15 - гомогенат хрусталика амфибий (*Rana temporaria* L.).

Для получения гомогената хрусталика карпов было взято 5 карпов по 400 г, а для получения гомогената хрусталика лягушек - 10 особей в возрасте 4 года. Перед взятием материала особи забивались.

Хрусталики изымались из глаз и гомогенизировались на льду в ступке-гомогенизаторе с добавлением физраствора. Затем следовало центрифугирование при 2000 об/мин. В последующем гомогенат разбавлялся изотоническим раствором с учетом, что концентрация белка (по Лоури) составляла 20 мг/л. Сеголеткам внутримышечно вводилось по 0,25 мл растворенных фракций гомогената хрусталика, а контрольным особям форели вводился физраствор в том же количестве.

Через трое суток рыб забивали и готовили тотальные препараты эпителия хрусталика форели, окрашенные гематоксилином Майера [4]. Подсчет митозов проводился с помощью окулярной сеточки в полосе, охватывающей все зоны цитодифференцировки эпителия хрусталика от периферии до центра. Обсчитываемые поля эпителия захватывали центральную, герминативную и предэкваториальную зоны.

Для выявления взаимодействия целого хрусталика рыб с хрусталиком амфибий брали хрусталики (*Brachydanio rerio*), которые имплантировались в переднюю камеру глаза лягушек (*Rana temporaria* L.).

Для этого у данио после декапитации хрусталик изымался из глаза, помещался в физраствор и подготавливался для трансплантации. Затем под контролем бинокля тонко отточенным микроскальпелем у лягушки, находящейся под эфирным наркозом, по лимбу роговицы делался надрез, в который подсаживался хрусталик рыб так, чтобы передний полюс хрусталика рыб соприкасался с эпителием хрусталика лягушки. Через три дня рана затягивалась, и хрусталик рыбы оказывался полностью включенным в переднюю камеру амфибий. Продолжительность опыта составила 9 дней. Пересадка была проведена 14 лягушкам в правый глаз. По окончании опыта лягушки забивались, хрусталики рыб и амфибий изымались и из их эпителия готовились плоскостные препараты. Окрашивание препаратов осуществляли гематоксилином Майера с последующим определением митотического индекса (МИ) в отдельных зонах цитодифференцировки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние фракций хрусталика карпа на различные зоны цитодифференцировки эпителия хрусталика сеголеток радужной форели заключается в том, что в зонах дифференцировки меняется митотический индекс по сравнению с контролем (Табл. 2). На 3-й день после введения растворимых фракций хрусталика карпа в предэкваториальной зоне эпителия хрусталика форели отмечается полное подавление митозов. При действии гомогената митотический индекс в герминативной зоне эпителия хрусталика доходит до 1,3, и далее не возрастает на всем протяжении ростковой зоны. Отмечается резкая разница между контролем и опытом. В эпителии хрусталика рыб, получивших растворимые фракции, на периферии отмечается полное подавление митотической активности, в то время как в контроле можно найти отдельные митозы. Характерной особенностью является то, что в контроле четко выражена пролиферационная активность в герминативной зоне по сравнению с опытом. В герминативной зоне эпителия МИ равен 7,2, что примерно в 7 раз выше, чем в опытных хрусталиках. Данные о влиянии растворимых фракций хрусталика карпа на МИ в различных зонах цитодифференцировки эпителия хрусталика радужной форели представлены на рис. 1.

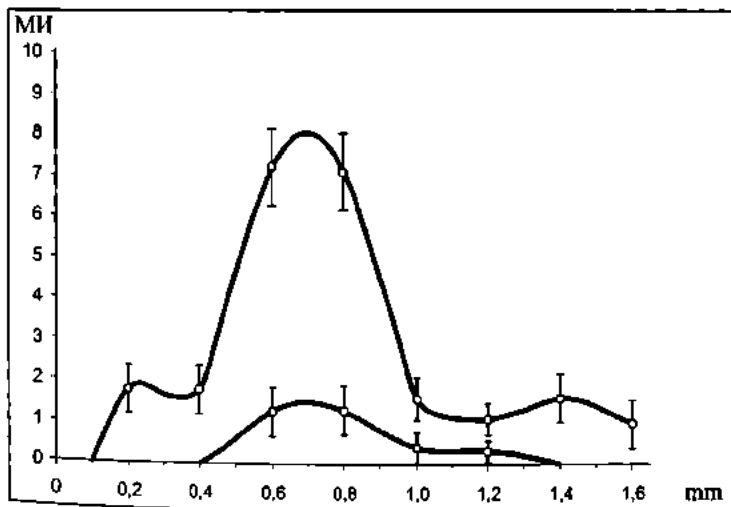


Рис. 1. Влияние гомогенатов хрусталика карпа на МИ в эпителии хрусталика радужной форели от периферии (0) до центра (1,6).

Сходное действие на пролиферационную активность в эпителии хрусталика радужной форели оказывают растворимые фракции, полученные из хрусталиков травяных лягушек (Табл. 1).

При общем сходстве воздействия можно отметить и отличия. Как и при действии фракций хрусталика карпа в предэкваториальной зоне эпителия хрусталика форели митотическая активность падает до нуля в зоне, расположенной в 0.2 мм по периферии эпителия. Затем идет возрастание МИ в герминативной зоне до 1.5, а затем идет постепенное понижение митотической активности, которая в центре достигает нуля. Создается впечатление, что лягушачьи фракции меньше подавляют митотическую активность по сравнению с фракциями хрусталика, полученными из рыб в герминативной зоне, но зато в центральной зоне фракции из хрусталика лягушек более активны по сравнению с фракциями веществ, полученных из хрусталика рыб. Данные о влиянии растворимых фракций гомогената хрусталика лягушек на МИ в различных зонах цитодифференцировки в эпителии хрусталика радужной форели представлены на рис. 2.

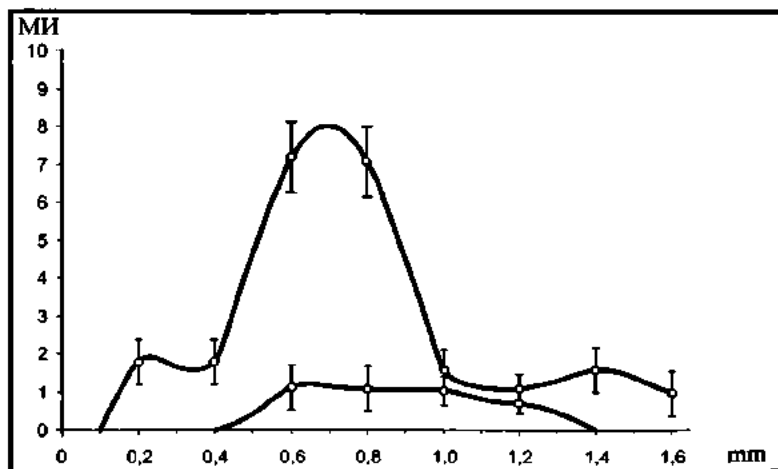


Рис. 2. Влияние растворимых фракций гомогената хрусталика лягушек на МИ в различных зонах цитодифференцировки в эпителии хрусталика радужной форели от периферии (0) до центра (1,6).

Таблица 1

Значения митотического индекса (МИ) в эпителии хрусталика радужной форели под влиянием гомогената хрусталика амфибий

Зоны дифференцировки (расстояние от периферии до центра), мм	Контроль, МИ	Митотический индекс (лягушачьи фракции), МИ
0,5	-	-
1,0	1,82 ± 0,55	-
1,5	1,68 ± 0,55	-
2,0	1,81 ± 0,56	-
2,5	4,62 ± 0,64	0,61 ± 0,34
3,0	7,19 ± 0,89	1,29 ± 0,55
3,5	8,01 ± 0,88	1,52 ± 0,55
4,0	7,11 ± 0,88	1,31 ± 0,56
4,5	4,58 ± 0,61	0,78 ± 0,43
5,0	1,62 ± 0,54	0,42 ± 0,32
5,5	1,19 ± 0,48	0,31 ± 0,29
6,0	1,11 ± 0,34	0,29 ± 0,22
6,5	1,32 ± 0,45	0,22 ± 0,20
7,0	1,58 ± 0,54	-
7,5	1,42 ± 0,54	-
8,0	1,03 ± 0,53	-

Экспериментальная пересадка хрусталика рыб амфибиям: влияние на клеточную пролиферацию

При пересадке хрусталика данио в переднюю камеру глаза лягушек наблюдалось заживление и эпителизация роговицы, а результаты воздействия подсаженного хрусталика просматривались на 9 день контакта. Хрусталик данио контактировал с передним полюсом хрусталика лягушек и вызывал некоторый лизис клеток эпителия в месте соприкосновения. Деструкция клеток эпителия в месте соприкосновения хрусталиков должна была бы вызвать увеличение митотической активности вблизи погибших клеток, либо в герминативной зоне. Для выяснения этого вопроса было проведено исследование эпителия хрусталика лягушек после завершения опыта. Эпителий подсаженного хрусталика данио обследовался только у трех рыб, и после того, как было выявлено наличие разрушения клеток эпителия под воздействием инструментов, которыми извлекался хрусталик глаза, дальнейшие исследования проводили только на эпителии лягушек (рис. 3).

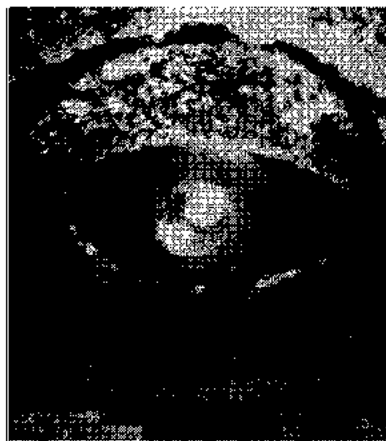


Рис. 3. Глаз лягушки с имплантированным хрусталиком данно на 9 день после пересадки.

Исследование тотальных плоскостных препаратов эпителия хрусталика лягушек показало, что в месте соприкосновения полюсов хрусталиков лягушки и рыбы отмечается отсутствие делящихся клеток. В тоже время следует отметить, что капсула хрусталика не повреждена и слабо окрашивается гематоксилином Майера.

Зона гибели клеток в центральной зоне эпителия на разных препаратах имела в диаметре от 0,5 до 0,7 мм. Анализ клеточной пролиферации в герминативной зоне показал, что на всех препаратах отсутствуют митозы и регенеративные процессы идут либо за счет миграции клеток, о чем говорит появление многослойного валика эпителиальных клеток по периферии контакта хрусталика рыбы и лягушки, либо за счет амитозов. Основная масса амитозов отмечена за валиком клеток, мигрирующих в сторону контакта хрусталиков.

Особенностью амитотических клеток в эпителии хрусталика лягушек было то, что границы клеток четко выявлялись. Подобные явления можно объяснить, скорее всего, ослаблением контактов между клетками эпителия и потерей выростов, обеспечивающих межклеточные контакты в малодифференцированных зонах эпителия хрусталика.

Таблица 2

Значения митотического индекса в эпителии хрусталика радужной форели под влиянием гомогената хрусталика карпа

Зоны дифференцировки (расстояние от периферии до центра), мм	Контроль, МИ	Митотический индекс (рыбы фракции), МИ
0,5	-	-
1,0	1,82 ± 0,55	-
1,5	1,68 ± 0,55	-
2,0	1,81 ± 0,56	-
2,5	4,62 ± 0,64	0,52 ± 0,33
3,0	7,19 ± 0,89	1,31 ± 0,56
3,5	8,01 ± 0,88	1,22 ± 0,54
4,0	7,11 ± 0,88	1,19 ± 0,55
4,5	4,58 ± 0,61	1,12 ± 0,41
5,0	1,62 ± 0,54	1,09 ± 0,32
5,5	1,19 ± 0,48	0,79 ± 0,31
6,0	1,11 ± 0,34	0,71 ± 0,23
6,5	1,32 ± 0,45	0,48 ± 0,19
7,0	1,58 ± 0,54	-
7,5	1,42 ± 0,54	-
8,0	1,03 ± 0,53	-

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ воздействия растворимых фракций хрусталика рыб и амфибий на пролиферационную активность в эпителии хрусталика радужной форели показывает, что растворимые фракции хрусталика содержат биологически активные вещества, подавляющие митозы во всех зонах цитодифференцировки. Ранее уже была отмечена в норме закономерность распределения митозов в эпителии хрусталика рыб в различных зонах цитодифференцировки [3, 4]. Сходные результаты были получены также другими исследователями на млекопитающих. Так на мышах было показано, что гомогенаты хрусталика мышей подавляют в эпителии хрусталика глаза других животных митотическую активность [1].

Проведенные нами опыты позволили также выявить особенности растворимых фракций хрусталика амфибий и рыб, заключающиеся в том, что ингибиторы митотической активности действуют однотипно на хрусталики рыб. Скорее всего, в растворимых фракциях хрусталика амфибий и рыб находятся сходные по молекулярному строению вещества, обладающие способностью ингибировать пролиферационную активность эпителиальных клеток. Мы не можем исключать и того факта, что на митотическую активность в раз-

личных зонах дифференцировки эпителия хрусталика влияют низкомолекулярные соединения, возможно даже в комплексе с высокомолекулярными соединениями. Во всяком случае, ингибиторы пролиферационной активности можно отнести к органоспецифичным в большей степени, чем к видоспецифичным.

Не смотря на общность действия ингибиторов митотической активности, полученных из хрусталиков амфибий и рыб, можно отметить некоторую разницу в их воздействии на клеточную пролиферацию эпителия хрусталика радужной форели. Так растворимые фракции хрусталика рыб сильнее подавляют митотическую активность в герминативной зоне, но не влияют на клеточную пролиферацию в той степени, как это наблюдается при действии фракций, полученных из гомогенатов хрусталика амфибий.

Пересадку хрусталика начали осуществлять первоначально у хвостатых амфибий с целью выявления воздействия пересаженного хрусталика на Вольфовскую регенерацию [7, 8, 9].

При пересадке целого хрусталика в переднюю камеру глаза лягушек также отмечается универсальность действия ингибитора клеточной пролиферации, выделяемого из хрусталика рыб. Ранее было показано, что хрусталик, подсаженный в переднюю камеру глаза хвостатых амфибий, подавляет Вольфовскую регенерацию и рост собственных хрусталиков у тритонов. Это может быть связано либо с подавлением митотической активности в эпителии растущего хрусталика, либо с нарушением дифференцировки клеток эпителия в хрусталиковые волокна. Проведенные нами исследования показывают, что вещества, выделяемые из имплантированного в переднюю камеру глаза хрусталика, подавляют митотическую активность у бесхвостых амфибий, также как это происходит у хвостатых амфибий. К сожалению, в экспериментах, поставленных ранее исследователями, не проверялось действие веществ, выделяемых из подсаженных хрусталиков, на митотическую активность собственного хрусталика глаза. Эффект подавления роста хрусталика прекращался, если между растущим хрусталиком и подсаженным помещалась мембрана из синтетического материала, не пропускающая биологически-активных веществ. Дальнейшие биохимические исследования с использованием аппаратуры, анализирующей структуру выделяемых из хрусталика молекул, помогут идентифицировать природу ингибиторов пролиферационной активности, в ко-

которых отмечается резкая потребность, особенно в настоящее время, в медицине и промышленности. Ингибиторы митотической активности могут найти применение при терапии злокачественных опухолей.

Анализ клеточной пролиферационной активности в эпителии хрусталика лягушек с имплантированным хрусталиком рыб показывает, что после контакта с хрусталиком рыб полностью подавляется митотическая активность, а деление клеток идет за счет амитозов. Проведенные эксперименты указывают на высокую чувствительность клеток эпителия хрусталика к веществам, выделяемым из подсаженного хрусталика рыб. При этом не подавляются регенерационные механизмы, и эпителий стремится закрыть пораженную область любым путем, прибегая к клеточной миграции и к амитозу. Полученные результаты говорят о высокой органной специфичности ингибиторов митозов в хрусталике. Возможно, что сходное влияние проявится не только при взаимодействии хрусталиков низших позвоночных, но при взаимодействии хрусталиков низших и высших позвоночных, что может быть установлено при дальнейших исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балаж А., Блажек И. Эндогенные ингибиторы клеточной пролиферации. М.: Мир, 1982. 302 с.
2. Гильберт С. Биология развития. М.: Мир, 1995. Т. 3. 352 с.
3. Кауфман З.С. Эмбриология рыб. М.: Агропромиздат, 1990. 270 с.
4. Симаков Ю.Г. Влияние бензолных соединений на митотическую активность эпителия хрусталика радужной форели *Salmo gairdneri* Rich // Вопросы ихтиологии. 1982. Т. 22. Вып. 1. С. 139-144.
5. Смирский В.Н., Алейникова К.С., Михайлов А.Т. Специфические белки эпителия хрусталика глаз амфибий // Доклады РАН. 1999. Т. 365. № 5. С. 704-706.
6. Хадорн Э., Венер Р. Общая зоология. М.: Мир, 1989. 523 с.
7. Balinsky B.J. An Introduction to Embryology. Philadelphia, London, Toronto: W.B. Saunders, 1970. 345 p.
8. Braverman N., Cohen C., Korton A. Cytotoxicity of lens antisera to dissociated chick neural retina cell in tissue culture // J. Embryol. exp. Morph. 1969. V. 21. P. 391-406.

9. *Hadron E.* Experimentale Entwicklungsforschung an Amphibian // *Verstandliche Wissenschaft*. Berlin: Springer, 1970. V. 77. P. 125-147.

10. *Stone L.S.* Further experiments on lens regeneration in eyes of the adult newt, *Triturus viridescens* // *Anat. Rec.* 1954. 120. P. 599-624.

11. *Voaden M.J., Leeson S.J.* A chalone in the mammalian lens. Effect of bilateral adrenalectomy on the mitotic activity of the adult mouse lens // *Exp. Eye Res.* 1970. 9. P. 57-66.

INHIBITORS OF CELLULAR PROLIFERATION IN CRYSTALLINE LENSES OF FISH AND AMPHIBIANS

Simakov J.G., Nikiforov-Nikishin A.L., Borodin A.L.
Moscow State University of Technology and Management

In work influence of mitotic inhibitors in crystalline lens epithelium, as was investigated at direct contact of crystalline lenses of the donor and the recipient, and at use of crystalline lens homogenates of fishes and amphibians. For research of influence of soluble fractions of a crystalline lens on mitotic activity in a crystalline lens epithelium of the donor were taken the young fish of an iridescent trout (*Salmo mykiss gairdneri* (Richardson, 1836)). The analysis of influence of soluble fractions of a crystalline lens of fishes and amphibians on proliferatic activity in a crystalline lens epithelium of an iridescent trout shows activity, that soluble fractions of a crystalline lens contain biologically active substances overwhelming of mitosis in all zones of cytodifferentiation. It is established, that soluble fractions of a crystalline lens of fishes suppress mitotic activity in herminative zone more strongly, but do not influence on cellular proliferation in that degree as it is observed at action of the fractions received from homogenates of a crystalline lens of amphibians.

**НЕКОТОРЫЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
МОЛОДИ ПЛОТВЫ RUTILUS RUTILUS
(CYPRINIFORMES, CYPRINIDAE)
ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТОКСИКАНТОВ
НА СПЕРМИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ**

Ю.В.Чеботарева, М.Г.Таликина, Ю.Г.Изюмов
*Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина
РАН – ИБВВ РАН, Борок*

Определены число amitotически делящихся и двуядерных эритроцитов и лейкоцитарная формула у сеголетков плотвы после воздействия на сперму производителей хлорофосом, фенолом и N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (MNNG). Воздействие фенола и хлорофоса практически не отразилось на исследованных показателях. Обработка спермы MNNG привела к значительному повышению числа amitозов в эритроцитах периферической крови сеголетков, а также изменению лейкограммы и сдвигу возрастного состава нейтрофилов в сторону сегментоядерных элементов. Отмеченные изменения в морфологическом составе красной и белой крови сеголетков плотвы, по-видимому, говорят о наличии дегенеративных процессов в организме рыб, затрагивающих органы кроветворения, после воздействия нитрозогуанидина на спермии родителей.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в токсических условиях среды в организме рыб развиваются различные патологические изменения в структуре и функциях органов и тканей. Чувствительность рыб к воздействию токсикантов не одинакова на разных этапах онтогенеза [1]. Особенно важна оценка отдаленных последствий воздействия отравляющих веществ на рыб ранних этапов развития, так как в это время происходит закладка и становление жизненно важных функциональных систем организма.

В серии работ по оценке последствий воздействия ряда органических ядов на икру, свободные эмбрионы и личинки было показано, что токсиканты вызывают повышение смертности зародышей и сеголеток, снижение линейно-вещного роста, а также нарушения в развитии осевых структур и аномалии в развитии воспроизводительной системы.

Помимо этого, токсиканты нередко обладают и генотоксическим эффектом, приводя к повышению уровня аномальных митозов в сперматогониальных клетках семенников и числа микроядер в эритроцитах периферической крови [10, 11, 12].

Основываясь на предположении, что влияние токсикантов на морфогенетическую изменчивость рыб возможно не только через икру и зиготу, мы провели эксперимент по оценке отдаленных последствий воздействия ряда органических ядов на сперму производителей. В качестве химических агентов были использованы хлорофос и фенол, относящиеся к группе энзиматических промышленных ядов [17], а также N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (MNNG) - метилирующий агент прямого действия на ДНК [18,19]. У сеголетков плотвы после токсических воздействий на спермии родителей выявлены угнетение линейно-весаго роста, гистопатология паренхиматозных клеток печени, торможение гаметогенеза, а также повышение уровня хромосомных аберраций в делящихся сперматогониях [13,14].

При просмотре препаратов крови у ряда сеголетков был отмечено большое количество эритроцитов, находящихся в процессе амитотического деления. В связи с этим нами был проведен подсчет числа амитотически делящихся и двуядерных эритроцитов, а также определены соотношения молодых и зрелых клеток эритроидного ряда и лейкоцитарная формула крови. Картина крови сеголетков плотвы заинтересовала нас в связи с оценкой их физиологического состояния. Известно, что морфологические и биохимические показатели крови рыб в значительной степени отражают интенсивность обменных процессов [2,3,4]. Гематологические показатели дают возможность заметить начавшиеся изменения в организме рыб на ранней стадии [9], в том числе, часто являются первыми признаками интоксикации [8]. Настоящая работа посвящена результатам гематологического анализа сеголетков плотвы после воздействия токсикантов на спермии родителей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на прудовой базе Института биологии внутренних вод РАН в 2001 г. Опыт проводили по схеме, использованной в предыдущем исследовании [13]. Сперма, взятая от 11 текущих самцов плотвы, была перемешана. Для экспериментов использовали по 0,5 мл спермы, к ней добавляли по 0,5 мл физиологического раствора, содержа-

шего мутаген N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (MNNG, 30 и 7,5 мг/л), хлорофос (0,005 и 0,020 мг/л) или фенол (25 и 6,3 мг/л). В контрольном варианте к сперме добавляли 0,5 мл физиологического раствора. Через 20 мин. экспозиции при 10°C (нижний порог нерестовых температур для плотвы Рыбинского водохранилища - 8-9°C) интактной и обработанной токсикантами спермой осеменили зрелую икру, отцеженную от 5 самок. Через 15 мин икру поместили в стеклянные кристаллизаторы с речной водой. В период инкубации икры при температуре 14-17°C смену воды проводили дважды в сутки. После полного рассасывания желточного мешка личинок выпустили в пруды с естественной кормовой базой, где они находились с 12 мая по 10 сентября. Для приготовления мазков кровь брали из сердца живых рыб, затем мазки фиксировали в 96-градусном этиловом спирте в течение 15 минут. Препараты окрашивали по Романовскому-Гимза и просматривали под иммерсионным объективом. Число амитотических и двуядерных эритроцитов определяли на 1000 клеток, для определения соотношения молодых и зрелых эритроцитов подсчитывали 500 клеток. При определении лейкоцитарной формулы просматривали 200 лейкоцитов. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы «Statistica for Windows 5.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ.

В таблице 1 приведено число амитотически делящихся и двуядерных эритроцитов в периферической крови сеголетков плотвы в контроле и после токсических воздействий на сперму производителей. В большинстве вариантов воздействия число эритроцитов с амитозными ядрами составляет в среднем от 4 до 9 на 1000 клеток. Только лишь в случае обработки спермиев мутагеном значения этого показателя возрастают почти на порядок. При меньшей концентрации MNNG частота амитозов достигает $46,4 \pm 19,58$ на 1000 клеток, при более высокой - $98,6 \pm 36,64$. В обоих вариантах значительно повышенное число амитотически делящихся эритроцитов (от 119 до 397 на 1000 клеток) наблюдалось у отдельных рыб - у 4 из 23 сеголетков после воздействия MNNG с концентрацией 7 мг/л и 5 из 14 экземпляров после воздействия MNNG с концентрацией 15 мг/л.

Число двуядерных клеток во всех выборках незначительное (от 0,9 до 3,0 на 1000 клеток), однако этот показатель оказался достоверно выше у сеголетков после воздействия

фенола с концентрацией 6 и 25 мг/л.

Соотношения разных стадий зрелости эритроцитов в периферической крови сеголетков плотвы из разных экспериментальных вариантов приведены в таблице 2. Во всех случаях доля незрелых эритроцитов находится в пределах нормы — около 10% [9]. Различия между вариантами по приведенным показателям красной крови незначительные. Вместе с тем, в двух группах сеголетков (после воздействия на спермии хлорофоса с концентрациями 0,005 и 0,010 мг/л) количество базофильных эритроцитов было достоверно ниже, чем в контроле. Доля полихроматофильных эритроцитов была повышена у сеголетков после воздействия фенола (6 и 25 мг/л) и MNNG (15 мг/л). Общее количество молодых клеток красной крови по сравнению с контролем было выше у сеголетков в вариантах с воздействием на спермии фенола (6 и 25 мг/л) и MNNG (15 мг/л) и ниже в варианте с воздействием хлорофоса (0,005 мг/л).

Таблица 1

Число amitотически делящихся и двуядерных эритроцитов в периферической крови сеголетков плотвы после воздействия токсикантами на сперму производителей

Токсикант и его концентрация, мг/л	Число рыб, экз.	Число эритроцитов, %	
		Aмитотически делящихся	Двуядерных
Контроль	19	4,9±1,13	1,1±0,35
Хлорофос, 0,005	19	7,0±1,06	1,6±0,34
Хлорофос, 0,010	20	3,9±0,67	1,3±0,31
Хлорофос, 0,020	17	4,3±0,79	0,9±0,20
Фенол, 6,0	21	9,1±1,20	3,0±0,53*
Фенол, 25,0	18	5,6±0,73	2,4±0,54*
MNNG, 7,0	23	46,4±19,58*	1,3±0,31
MNNG, 15,0	14	98,6±36,64*	0,7±0,16

Примечание. * - здесь и в табл. 2-4 различия статистически значимы.

Таблица 2.

Соотношение стадий зрелости эритроцитов периферической крови сеголетков плотвы после воздействия токсикантами на сперму производителей

Токсикант и его концентрация, мг/л	Число рыб, экз.	Стадии зрелости эритроцитов, %		
		Базофильные	Полихроматофильные	Зрелые
Контроль	19	0,73±0,15	9,29±0,36	89,98±0,38
Хлорофос, 0,005	19	0,13±0,06*	7,64±0,40	92,24±0,43*
Хлорофос, 0,010	20	0,24±0,10*	8,79±0,48	90,97±0,45
Хлорофос, 0,020	17	0,64±0,15	9,67±0,46	89,69±0,52
Фенол, 6,0	21	0,70±0,15	12,51±0,55*	86,79±0,64*
Фенол, 25,0	18	1,0±0,08	11,57±0,56*	87,43±0,59*
MNNG, 7,0	23	0,42±0,28	8,78±0,71	90,80±0,67
MNNG, 15,0	14	0,70±0,18	11,69±1,44*	87,61±1,46*

Лейкоцитарные формулы крови сеголетков плотвы в контроле и после различных воздействий на сперму родителей представлены в таблице 3. Кровь сеголетков имеет лимфоидный характер. В ней присутствуют все основные группы лейкоцитов – лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и бластные клетки [2,4]. После обработки спермы производителей хлорофосом и фенолом изменений в лейкограмме не произошло. Напротив, обработка спермы MNNG вызвала достоверные изменения лейкоцитарной формулы. После воздействия MNNG с концентрацией 7 мг/л произошло увеличение числа лимфоцитов, доля моноцитов и нейтрофилов снизилась. MNNG с концентрацией 15 мг/л вызвал противоположный эффект – доля лимфоцитов снизилась, а нейтрофилов возросла (табл.3). Воздействие MNNG повлияло также на соотношение нейтрофилов различных стадий зрелости в периферической крови сеголетков (табл.4) – в обоих вариантах достоверно увеличилась доля сегментоядерных нейтрофилов. Заметный сдвиг возрастного состава нейтрофилов в сторону зрелых форм произошел в лейкоцитарной формуле тех рыб, у которых отмечалось большое количество amitotически делящихся эритроцитов.

Таблица 3

Лейкоцитарная формула периферической крови сеголетков плотвы в разных вариантах воздействия

Токсикант и его концентрация, мг/л	Число рыб, экз.	Лейкоцитарная формула, %				
		Бластные клетки	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы	Эозинофилы
Контроль	19	0	88.40 ± 0.97	2.10 ± 0.41	9.30 ± 0.83	0.090 ± 0.039
Хлорофос, 0.005	19	0.040 ± 0.042	88.80 ± 1.47	3.20 ± 0.43	8.20 ± 1.34	0
Хлорофос, 0.010	20	0	89.70 ± 1.02	2.10 ± 0.45	8.20 ± 0.86	0
Хлорофос, 0.020	17	0	89.50 ± 1.46	2.30 ± 0.49	8.10 ± 1.24	0
Фенол, 6.0	21	0	88.00 ± 1.26	3.20 ± 0.46	8.70 ± 1.15	0.030 ± 0.021
Фенол, 25.0	18	0	89.90 ± 1.74	1.80 ± 0.34	8.10 ± 0.58	1.100 ± 0.070
MNNG, 7.0	23	0.030 ± 0.033	92.50 ± 0.82*	0.70 ± 0.25*	6.60 ± 0.77*	0.020 ± 0.016
MNNG, 15.0	14	0	83.10 ± 1.35*	2.70 ± 0.58	14.00 ± 1.41*	0.050 ± 0.038

Таблица 4

Соотношение разных стадий зрелости нейтрофилов в периферической крови сеголетков плотвы после воздействия токсикантами на спермии производителей (%)

Токсикант и его концентрация, мг/л	Число рыб, экз.	Стадии зрелости нейтрофилов, %			
		Миелоциты	Метамиелоциты	Палочкоядерные	Сегментоядерные
Контроль	19	33,5±5,94	38,0±1,68	22,6±1,41	5,9±1,65
Хлорофос, 0,005	19	40,9±2,99	38,8±2,57	16,5±2,94*	3,7±1,20
Хлорофос, 0,010	20	38,3±1,90	40,6±1,71	17,2±1,47*	3,9±1,38
Хлорофос, 0,020	17	36,6±2,67	44,6±2,04*	14,5±1,87*	4,3±1,34
Фенол, 6,0	21	34,7±3,32	47,7±3,01*	13,7±2,05*	3,9±2,33
Фенол, 25,0	18	40,5±2,39	47,4±1,85*	10,7±1,45*	1,4±0,50
MNNG, 7,0	23	35,9±3,21	41,3±2,38	12,2±1,35*	10,5±3,10*
MNNG, 15,0	14	31,1±4,02	35,9±2,09	18,8±2,02	14,2±3,36*

ОБСУЖДЕНИЕ.

В проведенном нами эксперименте частота amitotических делений эритроцитов значительно повысилась у отдельных особей после воздействия MNNG на сперму производителей. Нитрозогуанидин является сильным мутагеном, однако достоверное повышение числа микроядер в эритроцитах периферической крови было отмечено только после воздействия на сперму MNNG с концентрацией 30 мг/л. Воздействие рассматриваемых в настоящей работе концентраций 7 и 15 мг/л MNNG не вызвало подобного эффекта [14].

Aмитоз эритроцитов периферической крови часто наблюдается у рыб при анемии, вызванной различными причинами — голоданием, недостатком кислорода, интоксикацией организма [6, 8, 9, 16]. Иногда амитоз рассматривают как адаптивную реакцию организма на напряженное состояние жизненно важных функциональных систем [5]. В частности, высокая приспособленность к дефициту кислорода и перенесению других неблагоприятных условий некоторых видов рыб объясняется, по мнению Н.Т.Ивановой [4], тем, что частые amitotические деления в нужный момент приводят к увеличению количества эритроцитов, а, следовательно, и увеличению общего объема гемоглобина, способствующего усилению дыхательных функций [4]. Однако большинство исследователей считает амитоз эритроцитов следствием патологических и дегенеративных процессов в организме рыб [2, 6, 8, 9]. Авторадиографические исследования клеток эритроидного ростка показали, что в amitotически делящихся эритроцитах прекращаются синтетичес-

кие процессы; это свидетельствует о приближении таких клеток к гибели [15].

Массовые амитозы эритроцитов у сеголетков после воздействия на спермии MNNG могли быть результатом недостаточного образования молодых клеток эритроидного ряда в кроветворных органах. Чтобы проверить это предположение, был проведен корреляционный анализ двух признаков — числа амитотически делящихся эритроцитов и количества незрелых элементов красной крови. Однако зависимость между этими признаками отсутствует. Эритропоэз у рыб с повышенным количеством амитотически делящихся эритроцитов в периферической крови идет с той же интенсивностью, что и у других рыб из данного варианта воздействия. На препаратах крови процесс амитоза отмечался как в зрелых клетках красной крови, так и в молодых. Вероятным результатом воздействия MNNG на спермии производителей могли быть нарушения процессов нормального деления ядер эритроцитов. Кроме того, массовые амитотические деления эритроцитов могут отражать развитие деструктивных процессов, как в органах кроветворения, так и в других органах и тканях рыб.

О развитии дегенеративных процессов в организме сеголетков после обработки спермиев MNNG говорят также изменения в количественном соотношении лейкоцитарных элементов в лейкограмме. Подобные изменения в крови рыб могут происходить под действием повышения температуры, ряда болезней, интоксикации организма [3, 4, 8]. В варианте с большей концентрацией MNNG снижение числа лимфоцитов произошло за счет увеличения количества нейтрофильных элементов. Усиление гранулоцитопозеза является частым и неспецифическим ответом организма рыб при изменении условий обитания [2, 3, 8, 9], при этом нередко возрастает также доля сегментоядерных нейтрофилов. Ускорение созревания нейтрофильных элементов обычно вызывается патологическими процессами в организме. Это связано с функцией нейтрофилов — освобождением организма от остатков разрушенных клеток и тканей [7]. Сдвиг соотношения стадий зрелости нейтрофильных элементов в сторону сегментоядерных нейтрофилов обнаружен нами у тех сеголетков плотвы, в крови которых отмечены многочисленные амитозы эритроцитов.

Таким образом, отмеченные нами изменения в морфологическом составе красной и белой крови сеголетков плотвы, по-видимому, говорят о наличии дегенеративных про-

цессов в организме рыб, затрагивающих органы кроветворения, после воздействия нитрозогуанидина на спермии родителей. Мы не исключаем, что патология крови у экспериментальных рыб в определенной мере отражает общетоксический эффект, проявившийся, в частности, в угнетении их линейно-весаго роста, и нарушениях гонадо- и гаметогебеза [14].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болезни рыб. Справочник. М.: Агропромиздат. 1989. 288 с.
2. Головина Н.А., Тромбицкий И.Д. Гематология прудовых рыб. Кишинев: «Штиинца». 1989. 158 с.
3. Гольдин В.М. Некоторые гематологические показатели рыб Камского водохранилища в связи с загрязнением промышленными стоками// Ученые записки Пермского государственного университета. 1975. № 338. С.123-131.
4. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1983. 79с.
5. Кнорре А.Г. Взаимоотношения митоза и амитоза в индивидуальном и историческом развитии организмов// Цитология. 1959. Т.1.№ 5.С.494-509.
6. Методические указания по гематологическому обследованию рыб в водной токсикологии. Л.: ГосНИОРХ. 1974. 40 с.
7. Микряков В.Р., Балабанова Л.В. Клеточные основы иммунитета рыб// Физиология и паразитология пресноводных организмов. Л.: Наука. 1979. С.105-125.
8. Моисеенко Т.И. Гематологические показатели рыб в оценке их токсикозов (на примере сига *Coregonus lavaretus*)// Вопросы ихтиологии. 1998. Т.38. № 3. С. 371-380.
9. Остроумова И.Н. Показатели крови и кроветворения в онтогенезе рыб// Изв. ВНИОРХ. Л. 1957. 64 с.
10. Таликина М.Г., Изюмов Ю.Г., Касьянов А.Н., Палченкова Г.А. Влияние токсических веществ в период эмбриогенеза на выживаемость, линейно-весовые показатели и формирование гонад сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* // Вопр. ихтиологии. 1999. Т. 39. № 3. С. 401-409.
11. Таликина М.Г., Изюмов Ю.Г., Чеботарева Ю.В. и др. Анализ изменчивости морфологических показателей, раннего гаметогенеза и мутагенного эффекта у молоди плотвы *Rutilus rutilus* после воздействия токсикантов на свободные эмбрионы // Вопр. ихтиологии. 2000. Т. 40. № 6. С. 816-825.
12. Таликина М.Г., Изюмов Ю.Г., Чеботарева Ю.В. Аберрантные митозы и гистопатология гонад у сеголеток плот-

вы *Rutilus rutilus* после токсических воздействий в эмбриональный и личиночный периоды развития // *Вопр. ихтиологии*. 2001а. Т. 41. № 2. С. 232-238.

13. *Таликина М.Г., Изюмов Ю.Г., Чеботарева Ю.В.* Реакция развивающейся молоди плотвы *Rutilus rutilus* и цитогенетические аномалии в зародышевых, половых и соматических клетках после обработки токсикантами зрелых спермиев // *Вопр. ихтиологии*. 2001б. Т. 41. № 6. С. 835-841.

14. *Таликина М.Г., Изюмов Ю.Г., Чеботарева Ю.В.* Отдаленные генотоксические ответы у сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* после воздействий органических ядов на спермии родителей // *Вопр. ихтиологии*. 2003. Т. 43. № 3. С.411-417.

15. *Хрущов Н.Г., Ланге М.А., Золотова Т.Е., Бессонов А.В.* Характеристика клеток эритроидного ростка у зеркального карпа (перспективы использования при оценке физиологического состояния рыб) // *Известия РАН. Серия биологическая*. 1993. № 1. С.83-87.

16. *Чухачев А.С., Кладас Е.Ю.* Аномалии ядра у двух видов рыб из прибрежной зоны северо-восточных районов Черного моря // *Тезисы докладов 1 Конгресса ихтиологов России*. Астрахань. Издательство ВНИРО. 1997. С.270.

17. *Щербаков Н.А.* Морфологические изменения, развивающиеся в органах рыб при привыкании к токсическим веществам // *Реакции гидробионтов на загрязнение*. М.: Наука. 1983. С. 113-116.

18. *Brooks T.M., Dean S.W.* Detection of gene mutation in skin, stomach and liver of Muta Mouse following oral or topical treatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin or 1-chloromethylpyrene: some preliminary observation // *Mutagenesis*. 1996. Т. 11. P. 529-532.

19. *Bunton T.E., Wolfe M.J.* Reactivity of tissue-specific antigens in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin-induced neoplasms and normal tissues from medaka (*Oryzias latipes*) // *Toxicol. Pathol.* 1996. Т. 24. N 3. P. 331-338.

SOME HAEMATOLOGICAL FEATURES OF ROACH (RUTILUS RUTILUS) FINGERLINGS UPON THE TOXICANT EFFECT ON THE SPERMIA OF SPAWNERS

Yu. V. Chebotareva, M. G. Talikina and Yu. G. Izyumov
Papanin's Institute for biology of inland waters RAS,
Borok, Yaroslavl region, Russia, 152742

The number of amitotically dividing and binuclear erythrocytes and the differential blood count in fingerlings of roach (*Rutilus rutilus*) upon treatment of the spawners' sperm

with chlorophos, phenol, and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) were determined. Phenol and chlorophos had almost no effect on the studied indices. The treatment of sperm with MNNG considerably increased the number of amitoses in erythrocytes of the peripheral blood of fingerlings, changed the leukogram, and shifted the age composition of neutrophils towards segmented cells. The recorded changes in the morphological composition of erythrocytes and leukocytes seem to attest to the presence of degenerative processes in the fish organism affecting hemopoietic organs after the effect of nitrosoguanidine on the parents' spermia.

УДК 628.394.17:665.6

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ
ВЕЩЕСТВ НА ШЕЛЬФЕ СЕВЕРО-ВОСТОКА
САХАЛИНА В 2002 ГОДУ**

Широков Д.А.

*ВНИРО 107140 Москва ул. В. Красносельская 17
shirokov@vniro.ru*

Анализируются данные исследований содержания тяжелых металлов: железа, марганца, меди, цинка, свинца, никеля, кадмия и нефтяных углеводородов в толще воды и донных отложениях на 17 станциях шельфовой зоны северо-востока Сахалина. Приводятся количественные характеристики исследуемых показателей и характер распределения их в толще воды и донных отложениях. Полученные данные не позволили выявить превышения уровня загрязненности тяжелыми металлами и нефтяными углеводородами по сравнению с данными мониторинговых наблюдений за последние десять лет, за исключением увеличения содержания свинца на разрезе оз. Иркимibu - море.

ВВЕДЕНИЕ

Широкомасштабное освоение минерально-сырьевых ресурсов и развертывание поисков добычи нефти и газа на сахалинском шельфе в настоящее время требуют постоянного мониторинга окружающей среды и биоты. Актуально это стало в связи с вводом в промышленную эксплуатацию первого в России морского нефтедобывающего комплекса на базе платформы «Моликпак». Целью работы является получение информации о фоновых концентрациях загрязняющих веществ на шельфе северо-восточного Сахалина.

Работа выполнялась в рамках программы ведомственного мониторинга водных биоресурсов и среды их обитания на шельфе северо-востока Сахалина, утвержденной Госкомрыболовством России в декабре 2001 г..

В период с 5 по 28 августа 2002 года были выполнены работы в шельфовой зоне северо-востока Сахалина на участке от мыса Елизаветы на севере до мыса Терпения на юге на 17 разрезах (рис.1). Исследования проводили на двух судах, один из которых (НИС «П.Гордиенко») работал на глубинах от 20 до 200 м., второй (ВТБ «Акванавт») – на мелководье на глубинах 5 - 20 м.

В шельфовой зоне на глубинах 20-200 м выполнена 81 станция, на мелководье с глубинами 5-20 м исследования проводились на 75 станциях, где были отобраны пробы воды, взвеси и донных отложений для определения металлов и нефтяных углеводородов.

Отбор проб морской воды на мелководье для изучения содержания металлов осуществлялся 10-литровым батометром; для нефтяных углеводородов - тefлоновым батометром объемом 2 л.

Отбор проб морской воды в шельфовой зоне на глубинах 20-200 м осуществлен с помощью батометрической секции "Rosset" с дистанционным управлением закрытия батометров.

Донные отложения на мелководье отбирали дночерпателем Фридингира водолазным методом, а в шельфовой зоне с глубинами 20-200 м – дночерпателем Ван-Вина.

Для определения тяжелых металлов в воде пробы фильтровали через мембранный фильтр фирмы Sartorius с диаметром пор 0,45-0,5 мкм. Полученные фильтраты подкисляли азотной кислотой (осч). Фильтры со взвесью (для определения в них тяжелых металлов) и подкисленные фильтраты хранились в холодильнике.

В лабораторных условиях ВНИРО были определены металлы в пробах воды электротермическим атомно-абсорбционным методом на приборе Квант-З.ЭТА (ПНД Ф 14.1:2:4..140-98 «Методика выполнения измерений массовых концентраций бериллия, ванадия, висмута, кадмия, кобальта, меди, молибдена, мышьяка, никеля, олова, свинца, селена, серебра, сурьмы, хрома в питьевых, природных и сточных водах методом атомно-абсорбционной спектроскопии»).

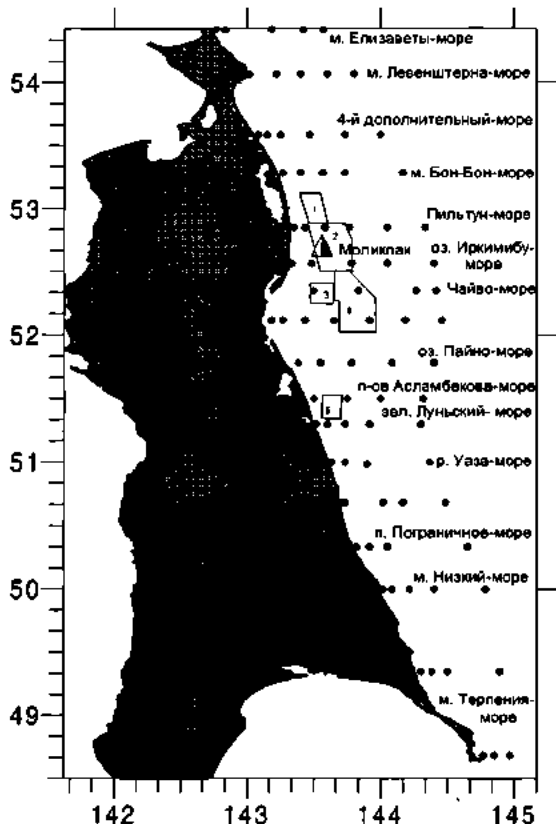


Рис. 1 Карта-схема расположения станций

Исторические: 1-Одоту; 2-Пильтун-Астаскок; 3-Чайво-море; 4-Артур-Датисам; 5-Луново.

При определении металлов и нефтяных углеводородов в пробах взвеси и донных отложениях руководствовались РД 52.10.556-95 «Методические указания. Определение загрязняющих веществ в пробах морских донных отложений и взвеси»

В судовой лаборатории определяли содержание нефтяных углеводородов в воде с глубин 20-200 метров флуориметрическим методом на приборе «Флюорат 02-2М» (ПНД Ф 14.1:2:4.128-98 «Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах природной, питьевой и сточной воды флуориметрическим методом на анализаторе жидкости Флюорат-02»). Для этого пробы экстрагировали очищенным гексаном сразу после их отбора.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Содержания всех исследованных металлов в пробах воды (железо, медь, марганец, цинк, никель, свинец, кадмий и хром) приведены в таблице 1. Отмеченные диапазоны колебаний металлов отражают естественный уровень их концентраций в морской воде [2] и не превышают установленные рыбохозяйственные нормативы, морской воде.

Таблица 1
Содержание металлов в морской воде (мкг/л) шельфа северо-восточного Сахалина, август 2002 г.

Металл	Диапазон концентраций*	Среднее
Fe	1,9-38	10,64
Mn	0,2-7,2	1,94
Zn	4,44-37,2	17,71
Ni	0,07-3,53	1,07
Pb	0,01-4,67	1,58
Cd	0,02-2,46	0,37
Cu	0,16-7,1	2,09
Cr	0,01-1,06	0,08

Примечание: * - концентрации в придонных и поверхностных горизонтах

Диапазон колебаний концентраций нефтяных углеводородов в поверхностных и придонных водах (глубины от 20 до 200 м) был невелик - от 4 до 20 мкг/л. Указанные уровни так же отражают естественные содержания нефтяных углеводородов в морской воде.

Результаты анализа количественного содержания взвеси в период исследования показали, что их содержание изменялось от 7 до 17 мг/л как на мелководье (5-20 м), так и в акваториях с глубинами 20-200 м.

В пробах взвешенного вещества определены уровни таких металлов, как железо, марганец, цинк, свинец и никель (табл. 2; рис. 2 – 6: для цинка, свинца, никеля). Как видно из данных таблицы, содержание железа, марганца, цинка и никеля в пробах взвеси на мелководье 5-20 м и на акватории с глубинами 20-200 м в поверхностных и в придонных горизонтах изменялось в сопоставимом диапазоне величин.

Иная картина обнаружена при определении свинца в пробах взвеси. Так в поверхностных водах на акватории с глубинами 20-200 м разброс величин содержания свинца во взвеси составил от 0,2 до 1,5 мкг/л, а на мелководье, начиная с 6-го разреза (разрез оз.Иркимибу-море после разреза

Пильтун-море), происходит увеличение концентрации свинца во взвеси до 140 мкг/л. Высокие концентрации свинца во взвеси на акватории с глубинами 5-20 м остаются таковыми вплоть до последнего исследованного разреза (рис. 3).

Таблица 2.
Содержание металлов в морской взвеси на шельфе северо-востока Сахалина, мкг/л., мелководье, август 2002г.

Металл	Диапазон концентраций (5-20 м.)	Среднее	Диапазон концентраций (20-200 м.)	Среднее
Fe	21,5-1320,7	258,9	10,7-422,3	79,4
Mn	1,4-19,3	3,9	1,1-6,32	2,4
Zn	0,24-11,6	3,1	0,28-7,56	2,1
Pb	0,32-626	46,3	0,13-2,71	0,8
Ni	0,08-2,08	0,6	0,01-0,5	0,2

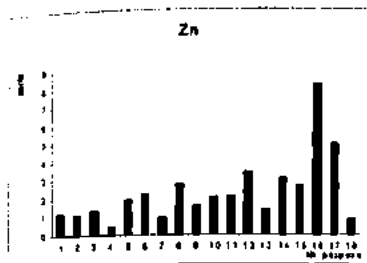
Содержание свинца во взвеси из придонного слоя воды на мелководье ниже, чем в поверхностном слое этой акватории, однако различия с шельфовой зоной (глубины 20-200 м) остаются (рис. 6).

В пробах донных отложений, которые представлены мелко- и среднезернистыми песками, исследованы уровни металлов и нефтяных углеводородов. Распределение изученных металлов в донных отложениях показано на рисунках 7-13.

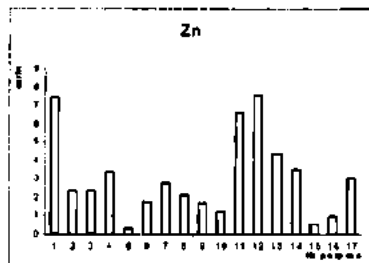
Уровни исследованных металлов в донных осадках находятся в пределах естественного фона, характерного для песчаных донных отложений (железо: 0,43% – 1,82%; марганец: 29,6 – 103,1; медь: 1,03 – 7,89; цинк: 11,9 – 40,3; свинец: 1,59 – 6,0; никель: 5,30 – 76,5; кадмий 0,1 – 0,8 мкг/г сухого веса).

В то же время, как видно из рисунков 7 – 13, имеются определенные акватории с повышенными (север восточного побережья) и очень низкими концентрациями таких элементов как цинк, медь, кадмий, марганец и железо в районе платформы Моликпак. Такое же низкое содержание металлов в этом районе наблюдали сотрудники ДВНИГМИ в 1998 году [6], что может быть связано с «...механической заменой донных отложений в районе установки платформы грунтом с другим гранулометрическим и химическим составом».

Содержание нефтяных углеводородов в донных отложениях шельфа Сахалина изменялось в пределах от 5,6 до 16,9 мкг/г сухого веса. По литературным данным [4] такие концентрации принято считать фоновыми.

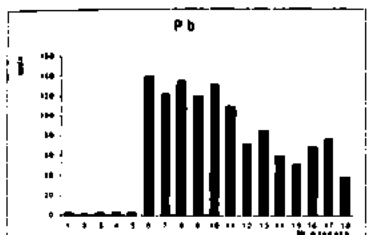


Прибрежная зона (глубина 5-15 м.)

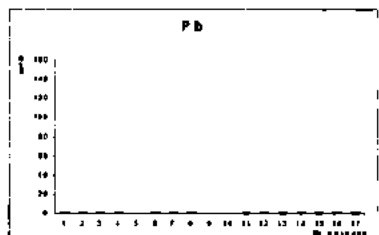


Морская зона (глубина 20-200 м.)

Рис. 2. Содержание металлов в морской взвеси (мг/л) на шельфе северо-востока Сахалина, август 2002 г., поверхностный слой.

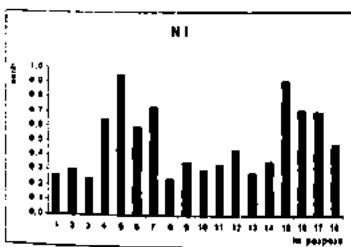


Прибрежная зона (глубина 5-15 м.)

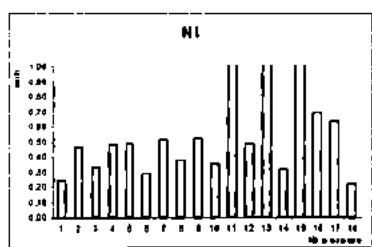


Морская зона (глубина 20-200 м.)

Рис. 3. Содержание металлов в морской взвеси (мг/л) на шельфе северо-востока Сахалина, август 2002 г., поверхностный слой.

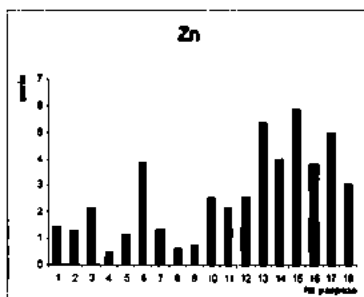


Прибрежная зона (глубина 5-15 м.)

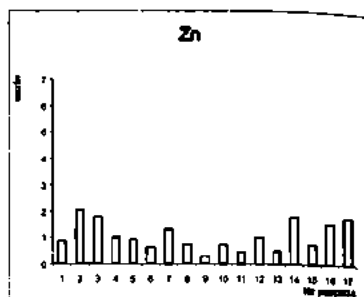


Морская зона (глубина 20-200 м.)

Рис. 4. Содержание металлов в морской взвеси (мг/л) на шельфе северо-востока Сахалина, август 2002 г., поверхностный слой.

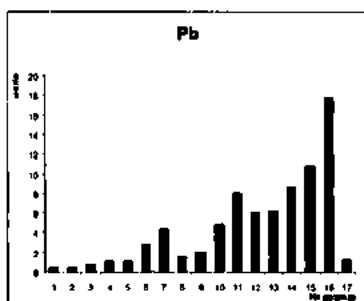


Прибрежная зона (глубина 5-15 м.)

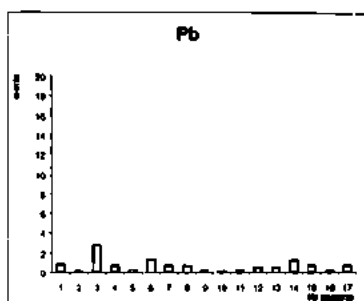


Морская зона (глубина 20-200 м.)

Рис. 5. Содержание металлов в морской взвеси (мкг/л) на шельфе северо-востока Сахалина, август 2002 г., придонный слой.



Прибрежная зона (глубина 5-15 м.)



Морская зона (глубина 20-200 м.)

Рис. 6. Содержание металлов в морской взвеси (мкг/л) на шельфе северо-востока Сахалина, август 2002 г., придонный слой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные содержания металлов в воде шельфа северо-востока Сахалина, отражая естественный уровень элементов в морской воде, хорошо согласуются с результатами исследований ВНИРО в Охотском море в июле-августе 1993 г. и июле-сентябре 1994 г. [1], а также с данными мониторинга ДВНИГМИ в 1998 года [6].

Концентрация нефтяных углеводородов в 20 мкг/л считается фоновой для вод Охотского моря [3]. Полученные концентрации в период исследования от 4 до 20 мкг/л соотносятся с этой величиной.

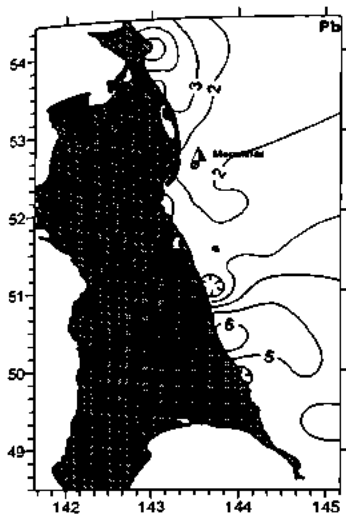


Рис. 7 Распределение свинца в донных отложениях

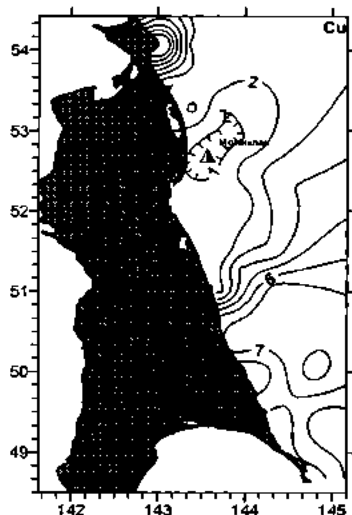


Рис. 8 Распределение меди в донных отложениях

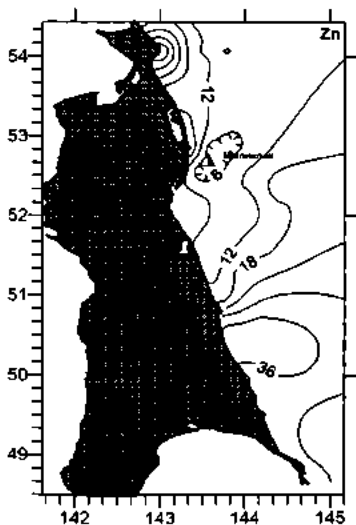


Рис. 9 Распределение цинка в донных отложениях

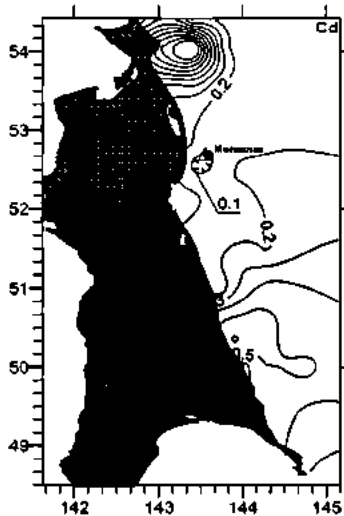


Рис. 10 Распределение кадмия в донных отложениях

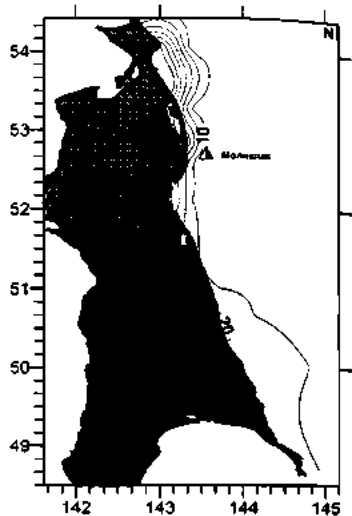


Рис. 11 Распределение никеля в донных отложениях

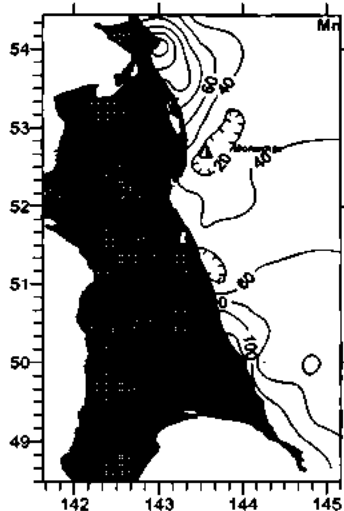


Рис. 12 Распределение марганца в донных отложениях

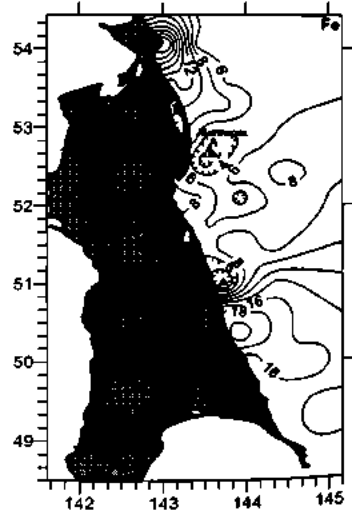


Рис. 13 Распределение железа в донных отложениях, п*1000

Таким образом, проведенные исследования на шельфе северо-восточного Сахалина показали, что такие вещества, как металлы и нефтяные углеводороды, содержатся в воде и донных отложениях в низких концентрациях, сопоставимых с данными мониторинговых исследований последних десяти лет. Поэтому указанный район исследований можно отнести к незагрязненным.

Повышенные концентрации свинца во взвеси на мелководных участках шельфа, скорее всего, связаны с терригенным поступлением загрязняющих веществ из рек и заливов на морское побережье. Тем более, что в отдельные заливы на севере шельфа загрязнены поступающими в них нефтяными углеводородами с речными водами. Там например, в заливах Уркт и Эхаби не выделяются рыболовные участки, поскольку там отмечается нефтяное загрязнение, рыба имеет запах нефти (по данным Департамента по рыболовству Администрации Сахалинской области, 2002 г.).

Известно так же, попадание во взвесь из атмосферы с аэрозольными частицами загрязняющих веществ, которые образуются при сжигании попутных нефтяных газов и взаимодействуя с атмосферной влагой и выпадают на поверхность суши и моря, формируя поля локальных и региональных загрязнений [5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горюнова В.В., Соколова С.А., Сторожук Н.Г. Содержание и распределение растворенных тяжелых металлов и нефтяных углеводородов в Охотском море // Комплексные исследования экосистемы Охотского моря. М.: ВНИРО, 1997. С. 179-188.
2. Израэль Ю.А., Цыбань А.В. (ред.) Обзор экологического состояния морей Российской Федерации и отдельных районов Мирового океана. М.: Гидрометеоиздат, 1993. 174 с.
3. Немировская И.А. Углеводороды воды, взвеси и донных осадков Охотского моря (распределение, формы, миграции, генезис) // Комплексные исследования экосистемы Охотского моря. – М.: ВНИРО, 1997. С.167-172.
4. Немировская И.А. Углеводороды в океане. Автореферат дис. на соискание ученой степени доктора геолого-минералогических наук. М. 2000. 48 с.
5. Патин С.А. Экологические проблемы освоения нефтегазовых ресурсов морского шельфа, М.: ВНИРО, 1997.
6. Ткалин А.В., Ройл Д.Дж., Сергушева О.О. Некоторые

**RESULTS OF RESEARCHES OF POLLUTING
SUBSTANCES ON A SHELF OF NORTHEAST OF
SAKHALIN IN 2002**

Shirokov D.A.

shirokov@vniro.ru

The data of researches of the contents of heavy metals are analyzed: iron, manganese, copper, zinc, lead, nickel, cadmium and petroleum hydrocarbons in thickness of water and ground adjournment at 17 stations of a shelf zone of northeast of Sakhalin. Quantitative characteristics of researched parameters and character of their distribution in thickness of water and ground adjournment are resulted. The received data have not allowed to reveal excess of a level of impurity by heavy metals and petroleum hydrocarbons in comparison with the data of monitoring supervision for last ten years, except for increase of the contents of lead on a cut of lake Irkimibu-sea.

Часть III. БОЛЕЗНИ РЫБ И ОХРАНА ЗДОРОВЬЯ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 597-12: 576.85

ВЕСЕННЯЯ ВИРЕМИЯ И ДРУГИЕ РАБДОВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ РЫБ: ОТ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ К МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДАМ ДИАГНОСТИКИ

И.С. Щелкунов

*ВНИИ пресноводного рыбного хозяйства
п. Рыбное Дмитровского р-на Московской обл., 141821,
vniiprh@dmitrow.ru*

Среди возбудителей вирусных болезней рыб рабдовирусы образуют группу наиболее опасных патогенов. В последнее время ясно прослеживается тенденция к глобализации их распространения. Ответным шагом на экспансию вирусов становится повсеместный переход научно-исследовательских лабораторий от иммунологических к молекулярно-генетическим методам диагностики, основанным на использовании полимеразной цепной реакции. Инструментарий молекулярной генетики демонстрирует непревзойденные возможности в тонком типировании вирусных штаммов и отслеживании их перемещений, изучении эпизоотологии и эволюции рабдовирусов рыб. Символизируя переход к новому этапу инфекционной ихтиопатологии, применяемые методы являются весомым вкладом в развитие международной системы мер по профилактике эпизоотий рыб в аквакультуре.

Весенняя виремия карпа (ВБК, SVC) – остро протекающая высококонтагиозная болезнь, вызываемая рабдовирусом SVCV (Spring viraemia of carp virus). По классификации Международного эпизоотического бюро (МЭБ) ВБК относят к категории особо опасных (декларируемых) болезней рыб. Она широко распространена в европейских странах с развитым карповодством [24] и является основной вирусной болезнью рыб в России. Хотя на сегодня в естественных условиях или в аквакультуре данная инфекция отмечена у рыб семи видов [23, 34], карп, *Cyprinus carpio* L., включая его декоративную форму (кои), выделяется своей повышенной восприимчивостью. Вспышки заболевания обычно происходят весной, спустя 2-3 недели после посадки рыб из зимовальных в нагульные пруды, и сопровождаются массовой гибелью (преимущественно годовиков - двух-

летков), достигающей 30-40%, а иногда и 70% [23, 69].

За последние 15-20 лет частота вспышек ВБК в Европе значительно снизилась [23]. Это обусловлено, по крайней мере, тремя факторами: повышением культуры рыбоводства в целом, введением с 1991 г. в странах Евросоюза более жестких мер борьбы с заразными болезнями в аквакультуре и катастрофическим сокращением объемов производства карпа в государствах бывшего Восточного блока, все еще не оправившихся от затяжного экономического кризиса [63].

В то же время участились случаи обнаружения возбудителя заболевания в новых географических регионах. Так, выделенный в 1991 г. в США (шт. Гавайи) от двух видов креветок рабдовирус в 1999 г. был идентифицирован как первый американский штамм вируса SVC [31]. В 2002 г. массовая эпизоотия (предположительно ВБК) имела место в фермерских хозяйствах Центрального Ирака [52]. Внимание к проблеме SVC усилилось и в связи с расширением международной торговли декоративными карповыми рыбами, которая сегодня стала весьма прибыльным бизнесом. В 2002 г. на территории американских штатов Северная Каролина, Вирджиния и Висконсин были зарегистрированы первые вспышки ВБК, связанные с импортом кои-карпа и золотой рыбки из стран Юго-Восточной Азии. А вскоре в американских архивных гистопатологических материалах 1989 года методами гибридизации *in situ* и RT-PCR был обнаружен генетический материал вируса SVC европейской подгруппы [16, 26, 62]. В Великобритании, начиная с 1998 г., SVCV неоднократно выделяли во время рутинных обследований импортируемых партий декоративных карповых рыб, поступающих из Юго-Восточной Азии. Кроме того, в последнее время от рыб разных видов там было выделено много новых рабдовирусных изолятов, перекрестно реагирующих в серологических реакциях как с SVCV, так и с антигенно-родственным ему рабдовирусом мальков щуки (PFRV) [51, 57]. Английские и американские изоляты SVCV «азиатского» происхождения по своим свойствам отличались от типичных европейских штаммов вируса [57, 66, Goodwin A.E., личное сообщение]. Удивительно, но фактов обнаружения SVCV непосредственно на азиатском континенте до сих пор не зафиксировано, и, по данным МЭБ, Азия по-прежнему считается свободной от этой инфекции [<http://www.oie.int>]. В России вирус ВБК был изолирован недавно от больных производителей карпа в Московской области, где прежде его не обнаруживали [49].

Схожим образом развивались события и с двумя другими МЭБ-декларируемыми рабдовирусными болезнями рыб – инфекционным некрозом гемопоэтической ткани лососевых (IHNV) и вирусной геморрагической септициемией (VHS). Их возбудители были обнаружены далеко за пределами прежних, хорошо известных ареалов. IHNV, до этого широко распространенный на Североамериканском континенте и встречавшийся в Японии, в 1987 г. был впервые выявлен в Европе [6, 13], а считавшийся исключительно европейским эндемиком вирус VHS в 1988 г. был изолирован в США от мигрирующих лососей, а затем и других рыб прибрежных вод Тихого океана [28, 39, 40].

До недавнего времени диагностика вирусных инфекций рыб базировалась исключительно на традиционных серологических методах с использованием поликлональных антител, «золотым стандартом» среди которых по-прежнему остается реакция нейтрализации. Следует признать, что с практической точки зрения эти методы недостаточно информативны. Отвечая своему предназначению – идентификация выделенного агента, они не позволяют устанавливать его происхождение. Данный вопрос всегда находился в компетенции эпизоотологии, но и ее классические подходы весьма часто оставляли его открытым. В то же время решения этой проблемы настоятельно требовала наметившаяся в последнее время тенденция глобального распространения инфекционных болезней, вызванная бурным ростом аквакультуры и расширением международной торговли ее объектами.

Постепенно обозначилась еще одна проблема: накапливались факты обнаружения «ускользающих от нейтрализации» изолятов VHS-, IHNV-, а затем и SVC-вирусов [2, 32, 43, Щелкунов, Щелкунова, неопубл. данные]. Появление таких изолятов отражало высокую мутационную изменчивость РНК-геномных вирусов [29, 56, 67] и в практическом плане грозило повышением частоты ложно-негативных диагнозов. Ситуация требовала привлечения новых методов для тонкой идентификации и типирования вирусных изолятов. Долго искать не пришлось: к тому времени некоторые из таких методов уже были разработаны и использовались для отбора репрезентативных изолятов с целью создания будущих вакцин.

Д. Леонг с соавторами [37], применив ДСН-ПААГ-электрофорез и радиоавтографию изотопомеченных белков вируса IHNV, показали вариабельность одиннадцати изученных вирусных штаммов по подвижности N- и G-белков, условно

разбив их по этому признаку на 4 группы. Хсу с соавторами [30] расширили эти исследования, разделив 71 североамериканский изолят IHNV на 5 электроферотипов. Авторы впервые отметили, что электроферотипы коррелировали с географией обнаружения изолятов, но не хронологией их выделения или видами рыб-хозяев. Выполненные позднее работы по типированию IHNV с помощью моноклональных антител показали еще более широкую вариабельность его изолятов. При этом антигенные варианты вируса также различались географией своего происхождения [68]. Познание особенностей фенотипической изменчивости вируса открывало путь для лучшего понимания его эпизоотологии. Однако подлинную вариабельность агента можно было оценить лишь в ходе изучения вариабельности его генома. Это стало возможным после введения в 1990-х г.г. в практику ихтиовирусологии методов молекулярно-генетического анализа. Толчком к началу таких исследований послужило неожиданное обнаружение VHS-вируса в США.

После первых работ Бернарда с соавторами [8, 9], показавших путем сравнения последовательностей N-гена, что европейский и американский штаммы VHSV, несмотря на антигенную схожесть, существенно отличаются друг от друга генетически и являются географически обособленными агентами, на обоих континентах развернулись исследования по генетическому типированию изолятов вируса. К тому времени среди них стала возрастать доля морских изолятов. Наступила эпоха «молекулярной эпизоотологии», продолжающаяся и поныне. Предметом ее исследования стало генетическое разнообразие и родство изолятов, базирующиеся на особенностях изменчивости генома вируса. Одним из её ключевых методов постепенно становится метод филогенетического анализа, позволяющий устанавливать географию происхождения вирусных изолятов, отслеживать пути их перемещения и эволюцию вируса. Рабдовирусам как группе наиболее значимых патогенов рыб было уделено основное внимание.

Ошима с соавторами [48] были первыми, кто провел групповой генетический анализ пяти американских и четырех европейских изолятов VHSV. Применяв метод T1-рибонуклеазного фингерпринтинга геномной РНК, авторы установили, что изоляты каждого из двух континентов образуют самостоятельную группу. Результаты работы подтвердили предположения, что американский штамм VHS вируса является эндемичным для региона северо-восточной Пацифики.

Появление автоматических секвенаторов и компьютерных программ для работы с нуклеотидными последовательностями и проведения филогенетического анализа значительно ускорило процесс. Количество изолятов, анализируемых в одном исследовании, стало исчисляться десятками. Серия работ, выполненных во Франции, Великобритании, Японии и США [5, 7, 28, 41, 54, 55, 58, 59], сделала прорыв в эпизоотологии инфекции. В результате филогенетического анализа было установлено существование пяти генотипов (геногрупп) вируса VHS (четыре европейских и один североамериканский), различавшихся географией зон циркуляции. Отмечена достаточно высокая генетическая стабильность вируса внутри зон, не зависимо от вида хозяина и времени выделения. Установлено существование четырех морских резервуаров инфекции, которые предположительно могли стать источником появления вируса в материковых водах.

Успех генетического анализа VHS-вируса был превзойден в работах с вирусом ИHN. Почти все они вышли из стен Западного рыбохозяйственного научно-исследовательского центра США (г. Сиэтл), и в каждой были изучены десятки и сотни изолятов ИHNV разного происхождения. Опираясь с соавторами [47], используя упомянутый выше метод фингерпринтинга, исследовали 26 изолятов, собранных на всем протяжении западной части Северной Америки от Аляски до Калифорнии. Результаты показали, что все они образуют единую генетическую группу, состоящую из четырех географически различающихся подгрупп. Курат с соавторами [35] впервые применили для оценки величины генетического разнообразия ИHNV метод зондовой антирибонуклеазной защиты вирусной РНК (RPA). Вскоре с его помощью у ИHNV было обнаружено существование большого числа генетических вариантов (гаплотипов) и установлен факт появления нового штамма, вызвавшего несколько вспышек заболевания [4]. RPA, использованный в качестве базового метода, в тандеме с филогенетическим анализом позволили разбить североамериканские изоляты вируса на гаплотипы и сиквенс-типы, кластеризовавшиеся в три генетические группы (U, M, L). Группа M в свою очередь состояла из четырех подгрупп. Выявленные геногруппы имели ясно выраженную географическую привязанность. Обоиими методами удалось зарегистрировать эволюцию гликопротеинового гена вируса (G-гена) за период в 36 лет. Наиболее быстро этот процесс протекал в зоне с высокоинтенсивной аквакульту-

рой (геногруппа М), хотя в целом скорость эволюции IHNV, по расчетам исследователей, была одной из самых низких при сравнении с другими РНК-геномными вирусами животных. Филогенетический анализ, выполненный на разных генах вируса, давал весьма схожие, если не идентичные, результаты. Корреляции генетических вариантов с видом рыб-хозяев установлено не было. Было показано, что внеамериканские изоляты вируса (японские, западноевропейские и российские) имеют североамериканское происхождение. Выявленная генетическая вариабельность IHNV значительно превосходила таковую, установленную ранее с помощью других использованных методов, включая метод моноклональных антител [19-22, 25, 36, 60, Kurath G., личное сообщение].

Прогресс в генетическом типировании вирусов VHS и IHNV значительно расширил знания в области молекулярной эпизоотологии этих инфекций. События с весенней виремией, как всегда, развивались с некоторым отставанием. Однако появление вспышек заболевания в США и необычных вирусных изолятов в Великобритании вновь подстегнуло интерес к этой инфекции. Понятно, что основное внимание было обращено на разработку методов молекулярной диагностики и типирования вирусных изолятов.

Традиционно диагностика ВВК базировалась на выделении вируса в культуре клеток и последующей идентификации в реакции нейтрализации. Эта процедура достаточно трудоемка и занимает от одной недели до месяца. Наряду с реакцией нейтрализации, МЭБ и Европейской Комиссией рекомендовано использование экспресс-методов - непрямо́й иммунофлуоресценции (ИФА) и твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) [42]. Реагенты для этих и иммунопероксидазного метода (IPA) на основе поликлональных и моноклональных антител производятся коммерческими фирмами Германии, Чехии и Бельгии. Однако, обладая экспрессностью, все три указанных серологических метода имеют один общий недостаток: они не обеспечивают надежной дифференциации вируса SVC от антигенно родственного ему рабдовируса мальков щуки (PFRV) [64], что безусловно необходимо, т.к. последний не является МЭБ-декларируемым агентом, и его обнаружение не влечет за собой наложения карантина.

В отличие от VHSV и IHNV, относящихся к роду *Novirhabdovirus* семейства *Rhabdoviridae* [65], вирус SVC наиболее близок к роду *Vesiculovirus*. Геном SVCV пред-

ставлен односторонней минус-цепью РНК, кодирующей пять структурных белков: 3'-N-P-M-G-L-5' (соответственно: нуклеопротеин, фосфопротеин, матриксный белок, гликопротеин и РНК-полимераза) [1]. Считается, что вирус имеет один серотип.

Изучение генома SVCV было начато еще четверть века назад [27, 33, 50] и продолжено в сравнительных исследованиях с другими рабдовирусами после весьма длительного перерыва [10, 11]. Ане с соавторами [3] использовали даные Бьёрклунда с соавторами [11] для создания зонда, комплементарного мРНК G-гена европейского референтного штамма Fijan вируса SVC и разработки на его основе метода RPA. Метод надежно отличал SVCV от PFRV и выявил существование у первого генетических вариантов (гаплотипов). Опираясь на опубликованные последовательности M- и G-генов SVCV [11, 33, M. Rossius, G-gene sequence, GenBank accession No. Z37505], Орешкова с соавторами [45, 46] предложили первые варианты методов дот-блот гибридизации и RT-PCR для выявления вируса в культуре клеток и патологическом материале от рыб, а Кутна с соавторами [34] разработали высокочувствительный метод детектирования вируса с помощью гнездовой обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-гПЦР). Но основные работы по созданию молекулярно-генетических методов диагностики инфекции велись в референтной лаборатории МЭБ по SVC (г. Веймут, Англия). Сотрудниками лаборатории впервые для данного вируса были разработаны методы полугнездовой ПЦР, гибридизации *in situ* и обратной гибридизации [15, 38, 53, 57]. Однако следует отметить, что, обладая набором важных достоинств, перечисленные выше методы не были свободны от ряда нежелательных элементов, ограничивающих их использование на практике. А именно: работали только в связке с методом культуры клеток, что удлиняло процедуру постановки диагноза (RPA, гибридизация *in situ* и дот-блот), требовали применения радиоактивной метки (RPA) или основывались на детектировании сравнительно высоковариабельных G- и M-генов вируса, что теоретически уменьшало скрининговые возможности методов (ПЦР-методы и обратная гибридизация).

В 2001 г. в GenBank были независимо депонированы две полные геномные последовательности референтного европейского штамма Fijan (синонимы: S 30, ATCC VR 1390) вируса SVC (accession numbers U18101, AJ318079) [1]. Стоун с

соавторами [57] использовали их при выборе праймеров для первого филогенетического исследования группы везикуловирусов рыб из 36 изолятов, включавших 15 изолятов SVCV из государств Европы, Китая и бывшего СССР. Компьютерный анализ ДНК-ампликонов средней части G-гена размером 550 пн позволил разделить исследованные изоляты на четыре геногруппы (I-IV). При этом изоляты SVCV вошли в геногруппу I, которая в свою очередь распадалась на четыре генетические подгруппы. Представителей каждой подгруппы, как правило, связывала общая география происхождения. Корреляции с видами рыб-хозяев установлено не было.

Основные выводы, вытекающие из результатов первого и пока единственного филогенетического анализа SVCV, в целом согласуются с таковыми, полученными в аналогичных исследованиях для вирусов VHS и IHN. Они подтверждают широкие возможности инструментария молекулярной генетики для тонкого типирования вирусных изолятов, отслеживания их перемещений, изучения эпизоотологии и эволюции рабдовирусов рыб. Особую ценность представляет использование этих возможностей в диагностической работе. Однако оно сдерживается нехваткой простых и надежных методов, доступных для освоения производственными лабораториями. Имеется лишь краткая информация о создании таких методов для типирования изолятов вирусов VHS и SVC [17, 53].

С учетом изложенного нами проведены исследования по разработке технологии ПЦР-детектирования SVC-инфекции и созданию на её основе несложных для практики методов молекулярно-генетического типирования вируса. Для выявления вируса SVC были разработаны методы ОТ-ПЦР и ОТ-пгПЦР с праймерами на консервативные участки гена нуклеопротеина (N-гена). Сравнение ампликонов фрагмента N-гена восемнадцати изолятов вируса показало возможность генетического типирования последних с помощью ПДРФ-анализа. Использование комплекса из пяти эндонуклеаз рестрикции позволило разделить 22 вирусных изолята на две основных (европейская и отечественная) и две промежуточных геногруппы. Типирование изолятов было возможным и с помощью штамм-специфичной ОТ-гПЦР с использованием праймеров, в последовательностях которых были учтены закономерные точковые мутации. Разработанные методы открывают путь для экспрессной молекулярно-генетической идентификации и типирования вируса весенней вире-

мии карпа непосредственно в тканях рыб, без его выделения на культуре клеток [Shchelkunov et al., в печати].

Список литературы

1. Ahne W., Bjurklund H.V., Essbauer S., Fijan N., Kurath G., Winton J.R. Spring viraemia of carp // *Dis. Aquat. Org.* - 2002. - V. 52. - P. 261-272.
2. Ahne W., Jorgensen P.E.V., Olesen N.J., Schafer W., Steinhagen P. Egtved virus: occurrence of strains not clearly identifiable by means of virus neutralization tests // *J. Appl. Ichthyol.* - 1986. V. 2. P. 187-189.
3. Ahne W., Kurath G., Winton J.R. A ribonuclease protection assay can distinguish spring viraemia of carp virus from pike fry rhabdovirus // *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* - 1998. V. 18. - P. 220-224.
4. Anderson E.D., Endelking H.M., Emmenegger E.J., Kurath G. Molecular epidemiology reveals emergence of a virulent infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus strain in wild salmon and its transmission to hatchery fish // *J. Aquat. Anim. Health.* - 2000. - V. 12. - P. 85-99.
5. Basurco B., Vende P., Monnier A.F., Winton J.R., de Kinkelin P., Benmansour A. Genetic diversity and phylogenetic classification of viral hemorrhagic septicemia virus // *Vet. Res.* - 1995. - V. 26. - P. 460-463.
6. Baudin-Laurencin F. IHN in France // *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 1987. V. 7. P. 104.
7. Benmansour A., Basurco B., Monnier A.F., Vende P., Winton J.R., de Kinkelin P. Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus // *J. Gen. Virol.* - 1997. - V. 78. - P. 2837-2846.
8. Bernard J., Bremont M., Winton J. Nucleocapsid gene sequence of a North American isolate of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus // *J. Gen. Virol.* - 1992. - V. 77. - P. 1011-1014.
9. Bernard J., Lecocq-Xhonneux F., Rossius M., Thiry M.E., de Kinkelin P. Cloning and sequencing the messenger RNA of the N gene of viral haemorrhagic septicaemia virus // *J. Gen. Virol.* - 1990. - V. 71. - P. 1669-1674.
10. Bjurklund H.V., Emmenegger E.J., Kurath G. Comparison of the polymerases (L genes) of spring viraemia of carp virus and infectious hematopoietic necrosis virus // *Virus Res.* - 1995. - V. 26. - P. 394-398.

11. Bjørklund H.V., Higman K.H., Kurath G. The glycoprotein genes and the gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viraemia of carp virus and hirame rhabdovirus: analysis of relationships with other rhabdoviruses // *Virus Res.* - 1996. - V. 42. - P. 65-80.

12. Bjørklund H., Lorenzen N., Vesely T., Shchelkunov I., Oreshkova S. Diagnostic methods and reference panel of reagents for detection and typing of fish viruses. EC FAIR CT-98-4064 Consolidated Report 1999-2001 / European Commission DG XIV. - Brussels, 2002.

13. Bovo G., Giorgetti G., Jorgensen P.E.V., Olesen N.J. Infectious haematopoietic necrosis: first detection in Italy // *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 1987. V. 7. P. 124.

14. Cozien J., Thiery R. Genetic and virulence comparison of French isolates of infectious haematopoietic necrosis virus / / Book of Abstracts of 11th Int. Conference of the EAFP "Diseases of Fish and Shellfish", 21-26 September 2003. - Malta, 2003. - O-2.

15. Dixon, P.F. *In situ* hybridization for the detection of spring viraemia of carp virus in fish tissue sections, using a polymerase chain reaction digoxigenin labeled probe // Workshop on Diagnostic Techniques with Special Emphasis on Carp Diseases. UK, 2-4 June 2003. - CEFAS Weymouth Laboratory, 2003.

16. Dixon P.F., Marcquenski S., Le-Deuff R.-M., Denham K.L., Sheppard A.M., Steedman L., Stone D.M., Way K. Use of *in situ* hybridization and the polymerase chain reaction to identify spring viraemia of carp virus and koi herpesvirus in fixed archive material // Book of Abstracts of 11th Int. Conference of the EAFP "Diseases of Fish and Shellfish", 21-26 September 2003. - Malta, 2003. - O-29.

17. Einer-Jensen K., Ahrens P., Lorenzen N. Genotyping of continental and marine VHS virus isolates by restriction fragment length polymorphism (RFLP) // Book of Abstracts of 10th Int. Conference of the EAFP "Diseases of Fish and Shellfish", 9-14 September 2001. - Dublin, Ireland, 2001. - P-269.

18. Einer-Jensen K., Bjørklund H., Oreshkova S., Shchelkunov I., Vesely T., Lorenzen N. Detection and typing of fish viruses / / *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* - 2002. - V. 22. - P. 158-165.

19. Emmenegger E.J., Kurath G. Genetic characterization of infectious hematopoietic necrosis virus of coastal salmonid stocks in Washington state // *J. Aquat. Anim. Health.* - 2002. - V. 14. - P. 25-34.

20. Emmenegger E.J., Meyers T.R., Burton T.O., Kurath G. Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska // *Dis. Aquat. Org.* - 2000. - V. 40. - P. 163-176.

21. Emmenegger E.J., Troyer R.M., Kurath G. Characterization of the mutant spectra of a fish RNA virus within individual hosts during natural infections // *Virus Res.* - 2003. - V. 96. - P. 15-25.

22. Enzmann P.-J., Kurath G., Garver K., Fichtner D., Bergmann S. Monophyletic origin of European IHNV strains from North American M-genogroup // *Book of Abstracts of 11th Int. Conference of the EAAP "Diseases of Fish and Shellfish"*, 21-26 September 2003. - Malta, 2003. - P. 54.

23. Fijan N. Spring viraemia of carp and other viral diseases and agents of warm-water fish. // *Fish Diseases and Disorders. V.3: Viral, Bacterial and Fungal Infections* / Woo P.T.K., Bruno D.W. (Eds.). - Oxon: CAB Intl., 1999. - P. 177-244.

24. Fijan N., Petrinc Z., Sulimanovic D., Zwillenberg L.O. Isolation of the viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp // *Vet. Arh.* - 1971. - V. 41. - P. 125-138.

25. Garver K.A., Troyer R.M., Kurath G. Two distinct phylogenetic clades of infectious hematopoietic necrosis virus overlap within the Columbia river basin // *Dis. Aquat. Org.* - 2003. - V. 55. - P. 187-203.

26. Goodwin A.E. First report of spring viraemia of carp virus (SVCV) in North America // *J. Aquat. Anim. Health.* - 2002. - V. 14. - P. 161-164.

27. Gupta K.C., Bishop D.H.L., Roy P. 5' terminal sequences of spring viraemia of carp virus RNA synthesized in vitro // *J. Virol.* - 1979. - V. 30. - P. 735-745.

28. Hedrick R.P., Batts W.N., Yun S., Traxler G.S., Kaufman J., Winton J.R. Host and geographic range extensions of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus // *Dis. Aquat. Org.* - 2003. - V. 55. - P. 211-220.

29. Holland J., Spindler K., Horodyski F., Grabau E., Nichol S., VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes // *Science.* - 1982. - V. 215. - P. 1577-1585.

30. Hsu Y.L., Endelking H.M., Leong J.C. Occurrence of different types of infectious hematopoietic necrosis virus in fish // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1986. - V. 52. - P. 1353-1361.

31. Johnson M.C., Maxwell J.M., Loh P.C., Leong J.C. Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses: snakehead rhabdovirus (SHRV) and

rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)/spring viraemia of carp virus (SVCV) // *Virus Res.* - 1999. - V. 64. - P. 95-106.

32. *Kim C.H., Winton J.R., Leong J.C.* Neutralization resistant variants of infectious hematopoietic necrosis virus have altered virulence and tissue tropism // *J. Virol.* - 1994. - V. 68. - P. 8447-8453.

33. *Kiuchi A., Roy P.* Comparison of the primary sequence of spring viraemia of carp virus M protein with that of vesicular stomatitis virus // *Virology.* - 1984. - V. 134. - P. 238-243.

34. *Koutna M., Vesely T., Psikal I., Hulova J.* Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR // *Dis. Aquat. Org.* - 2003. - V. 55. - P. 229-235.

35. *Kurath G., Higman K.H., Bjurklund H.V.* The NV genes of fish rhabdoviruses: development of RNase protection assay for rapid assessment of genetic variation // *Vet. Res.* - 1995. - V. 26. - P. 477-485.

36. *Kurath G., Troyer R.M., Emmenegger E.J., Einer-Jensen K., Anderson E.D.* Phylogeography of infectious hematopoietic necrosis virus in North America // *J. Gen. Virol.* - 2003. - V. 84. - P. 803-814.

37. *Leong J., Hsu Y.L., Endelking H.M., Mulcahy D.* Strains of infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus may be identified by structural protein differences // *Dev. Biol. Stand.* - 1981. - V. 49. - P. 43-55.

38. *Liu C.T.-Y., Schmidt N.T., Stone D.M.* Detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) in fish tissues by semi-nested RT-PCR // *Book of Abstracts of The Forth International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates, 12-15 May 1998* . - Weymouth, UK, 1998. - PP- 05.

39. *Meyers T.R., Winton J.R.* Viral hemorrhagic septicemia virus in North America // *Annu. Rev. Fish Dis.* - 1995. -V. 5. - P. 3-24.

40. *Meyers T.R., Short S., Lipson K.* Isolation of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) associated with epizootic mortality in two new host species of Alaskan marine fish // *Dis. Aquat. Org.* - 1999. - V. 38. - P. 81-86.

41. *Nishizawa T., Iida H., Takano R., Isshiki T., Nakajima K., Muroga K.* Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) based on partial G and P genes // *Dis. Aquat. Org.* - 2002. - V. 48. - P. 143-148.

42. OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals,

- 4th ed. - Paris: Office International des Epizooties, 2003.
43. Olesen N.J., Lorenzen N., Jorgensen P.E.V. Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies // Dis. Aquat. Org. - 1993. - V. 16. - P. 163-170.
44. Olesen N.J., Skall H.F., Kjaer T.E., Kippasto C., Johansson T., Bjurklund H. Characterization of European perch rhabdoviruses // Book of Abstracts of 10th Int. Conference of the EAAP "Diseases of Fish and Shellfish", 9-14 September 2001. - Dublin, Ireland, 2001. - P-267.
45. Oreshkova S.F., Shchelkunov I.S., Tikunova N.V., Shchelkunova T.I., Puzyrev A.T., Ilyichev, A.A. Detection of spring viraemia of carp virus isolates by hybridization with non-radioactive probes and amplification by polymerase chain reaction // Virus Res. - 1999. V. 63. - P. 3-10.
46. Oreshkova S.F., Tikunova N.V., Shchelkunov I.S., Ilyichev A.A. Detection of spring viraemia of carp virus by hybridization with biotinylated DNA probes // Vet. Res. - 1995. - V. 26. - P. 533-537.
47. Oshima K.H., Arakawa C.K., Higman K.H., Landolt M.L., Nichol S.T., Winton J.R. The genetic diversity and epizootiology of infectious hematopoietic necrosis virus // Virus Res. - 1995. - V. 35. - P. 123-141.
48. Oshima K.H., Higman K.H., Arakawa C.K., de Kinkelin P., Vestergaard Jorgensen P.E., Meyers T.R., Winton J.R. Genetic comparison of viral hemorrhagic septicemia isolates from North America and Europe // Dis. Aquat. Org. - 1993. - V. 17. - P. 73-80.
49. Pichugina T.D., Borisova M.N., Shchelkunova T.I., Shchelkunov I.S., Zavyalova E.A. First report of spring viraemia of carp virus at a fish farm in Moscow Province, Russia // Proceedings of Second Bilateral Conference Between United States and Russia on Aquatic and Marine Animal Health. Clarion Inn and Conference Center Shepherdstown, 21-28 September 2003. - Shepherdstown, West Virginia, 2003. - P. 20.
50. Roy P., Gupta K.C., Kiuchi A. Characterization of spring viraemia of carp virus mRNA species and the 3' sequence of the viral RNA // Virus Res. - 1984. - V. 1. - P. 189-202.
51. Rowley H., Graham D.A., Campbell S., Way K., Stone D.M., Curran W.L., Bryson D.G. Isolation and characterization of rhabdovirus from wild common bream *Abramis brama*, roach *Rutilus rutilus*, farmed brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Northern Ireland // Dis. Aquat. Org. - 2001. - V. 48. - P. 7-15.

52. *Shchelkunov I.S.* Report on results of FAO consultancy mission in Iraq aimed at identification and control of an acute epizootic in fish cultured in the national inland aquaculture, TEMP/INT/859/MSC / FAO. - Rome, 2002. - 12p.

53. *Sheppard A.M., LeDeuff R.-M., Stone D.M.* The use of reverse hybridization to discriminate between piscine vesiculovirus type viruses and to identify spring viraemia of carp virus (SVCV) subgroups // Book of Abstracts of 11th Int. Conference of the EAFF "Diseases of Fish and Shellfish", 21-26 September 2003. - Malta, 2003. - P-60.

54. *Snow M., Cunningham C.O., Melvin W.T., Kurath G.* Analysis of the glycoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within European marine environment // *Virus Res.* - 1999. - V. 63. - P. 35-44.

55. *Snow M., Raynard R.S., King J.A., Skall H.F., Olesen N.J.* Towards an effective management tool for marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) // Book of Abstracts of 10th Int. Conference of the EAFF "Diseases of Fish and Shellfish", 9-14 September 2001. - Dublin, Ireland, 2001. - P-271.

56. *Steinhauer D.A., Holland J.J.* Rapid evolution of RNA viruses // *Ann. Rev. Microbiol.* - 1987. - 41. - P. 409-433.

57. *Stone D.M., Ahne W., Denham K.L., Dixon P. F., Liu C.T.-Y., Sheppard A.M., Taylor G.R., Way K.* Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups // *Dis. Aquat. Org.* - 2003. - V. 53. - P. 203-210.

58. *Stone D. M., Way K., Dixon P.F.* Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) viruses from different geographic areas: a link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North Sea cod (*Gadus morhua* L.) // *J. Gen. Virol.* -1997. V. 78. P. 1319-1326.

59. *Thiery R., de Boisseson C., Jeffroy J., Castric J., de Kinkelin P., Benmansour A.* Phylogenetic analysis of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates from France (1971-1999) // *Dis. Aquat. Org.* - 2002. - V. 52. - P. 29-37.

60. *Troyer R.M., LaPatra S.E., Kurath G.* Genetic analysis reveals unusually high diversity of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout aquaculture // *J. Gen. Virol.* - 2000. - V. 81. - P. 2823-2832.

61. *Troyer R.M., Kurath G.* Molecular epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus reveals complex virus traffic and evolution within southern Idaho aquaculture //

63. *Varadi L., Blokhin S., Pekar F., Szucs I., Csavas I.* Aquaculture development trends in the countries of the former USSR area // Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand. 20-25 February 2000 / Subasinghe R.P., Bueno P.B., Phillips M.J., Hough C., McGladdery S.E., Arthur J.R. (Eds.). - Bangkok: NACA and Rome: FAO, 2001. - P. 417-429.

64. *Vestergaard-Jorgensen P.E., Olesen N.J., Ahne W., Lorenzen N.* SVCV and PFR viruses: serological examination of 22 isolates indicates close relationship between the two fish rhabdoviruses // Viruses of Lower Vertebrates / Ahne, W., Kurstak E. (Eds.). - Berlin: Springer-Verlag, 1989. - P. 349-366.

65. *Walker P.J., Benmansour A., Calisher C.H., Dietzgen R., Fang R.X., Jackson A.O., Kurath G., Leong J.C., Nadin-Davies S., Tesh R.B., Tordo N.* Family Rhabdoviridae // The 7th Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses / van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wikner, R.B. (Eds.). - San Diego: Academic Press, 2000. - P. 563-583.

66. *Way K., Denham K.L., Dixon P. F., Longshaw C.B., Sheppard A.M., Stone D.M.* Atypical spring viraemia of carp virus (SVCV) isolated from carp imported into the UK: evidence from phylogenetic analysis of partial gene sequences for a number of distinct sub-groups of SVCV // Book of Abstracts of 11th Int. Conference of the EAAP "Diseases of Fish and Shellfish", 21-26 September 2003. - Malta, 2003. - P-79.

67. *Winton J.R.* Evolution of fish rhabdoviruses // Proceedings of the OJI International Symposium on Salmonid Diseases. - Sapporo, Japan: Hokkaido University Press, 1992. - P. 88-95.

68. *Winton J.R., Einer-Jensen K.* Molecular diagnosis of infectious hematopoietic necrosis and viral hemorrhagic septicemia // Molecular Diagnosis of Salmonid Disease / Cunningham C.O. (Ed.); Reviews: Methods and Technologies in Fish Biology and Fisheries, Vol.3 / Nielsen J.L.(Series Ed.). - Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. - P. 49-79.

69. *Wolf K.* Fish Viruses and Fish Viral Diseases. - Ithaca, NY: Cornell University Press, 1988. -476 pp.

**SPRING VIREMIA AND OTHERS RHABDOVIRUS FISH
DESEASES: FROM IMMUNOLOGICAL
TO MOLECULAR-GENETIC METHODS OF
DIAGNOSTICS I.S.SHCELKUNOV**

*The All-Russia scientific research institute of a fresh-water
fish facilities*

*Rybnoye, Dmitrow on the Moscow region, 141821,
vniiprh@dmitrow.ru*

Among activators of virus illnesses of fishes the rhabdovirus form group of the most dangerous pathogenes. The tendency to globalization their distributions recently is clearly traced. Reciprocal step on expansion of viruses becomes universal transition of research laboratories from immunological to the molecular-genetic methods of diagnostics based on use of polymerase chain reaction. The toolkit of molecular genetics shows unsurpassed opportunities in thin typing viral strain and observation of their movings, studying epizootology and evolutions of fish rhabdoviruses. Symbolizing transition to a new stage of infectious ichthyopathology, used methods are the powerful contribution to development of the international system of measures on preventive maintenance of fish epizooties in aquaculture.

УДК 597-12:576.85

**ИНФЕКЦИОННЫЙ НЕКРОЗ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ
ТКАНИ (ИНН) В ПОПУЛЯЦИИ НЕРКИ
ONCORHYNCHUS NERKA (WALBAUM)
ОЗЕРА НАЧИКИНСКОЕ (КАМЧАТКА)**

Е.В. Бочкова, С.Л. Рудакова

*Камчатский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии (КамчатНИРО),
683000, Петропавловск-Камчатский, ул. Набережная, 18
E-mail: kamniroe@elizovo.kamchatka.ru*

В июле 2003 г. провели вирусологическое обследование половозрелой нерки *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), отловленной на естественном нерестилище озера Начикинское (бассейн р. Большая). В результате исследований на линии клеток ЕРС выделили вирусный патоген, идентифицированный как вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани (ИНВ). Распространение вируса в пробах достигало 100% в овариальной жидкости и 83,3% во внутренних органах. В начале нояб-

ря 2003 г. произошла массовая гибель мальков нерки в озере Начикинское. Проведенные исследования подтвердили наличие вируса ИHN. Титры вируса были высокими.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудителем инфекционного некроза гемопоэтической ткани является рабдовирус (сем. *Rabdoviridae*) рода *Lyssavirus*. У молоди рыб болезнь сопровождается тяжелым поражением органов гемопоэза, поэтому вызывающий ее патоген получил название вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани (Infectious hematopoietic necrosis virus - IHNV) [8]. Впервые болезнь описана в 50-х годах у нерки на рыбоводных заводах в штатах Вашингтон и Орегон на западном побережье США [20, 26]. В Японию, Францию, Италию, Германию, Китай, Корею инфекционный агент был занесен из Северной Америки в результате несоблюдения ветеринарно-санитарных мер при экспорте икры и рыбы [28]. В России болезнь зарегистрировали в 2000 г. в рыбопитомнике Московской области у радужной форели [21], а в 2001 г. вирус впервые был выделен на Камчатке у нерки из бассейна р. Большая [4].

По данным Аменда [9], после эпизоотии часть переболевших или устойчивых к заболеванию мальков становится бессимптомными вирусоносителями, нередко пожизненно. При этом инфекция переходит в субклиническую (латентную) форму. Вспышки болезни наблюдаются у проходной нерки, нерки-кокани, чавычи, кеты, радужной форели. Горбуша, кижуч и некоторые гольцы обладают низкой восприимчивостью к IHNV, но эти виды могут являться его носителями. Перечень видов рыб, чувствительных к IHNV, постоянно увеличивается. На рыбоводных заводах эпизоотии вызывают практически полную гибель мальков. В естественных условиях у молоди лососевых рыб очень трудно зарегистрировать и оценить масштабы смертности в результате вспышки вирусного заболевания: погибшие, больные и ослабленные мальки сносятся течением или становятся легкой добычей хищников. Кроме того, она может иметь локальный характер - плотность личинок и мальков в естественных водоемах более низкая, по сравнению с заводскими. В литературе встречается четыре упоминания об эпизоотиях ИHN в дикой природе. В Канаде заболевание зарегистрировано у молоди нерки в озере Чилко [27] и в притоке

р. Фрезер [24], у двухлетней нерки-кокани в озере Ковичен [23] и в США – у смолтов нерки в устье р. Хидден на Аляске [11].

Так как в 2001–2002 гг. у половозрелой нерки из бассейна р. Большая обнаружили носительство вируса некроза гемопоэтической ткани [4], то в 2003 г. особое внимание уделяли вирусологическому обследованию популяций нерки из бассейна этой реки. Озеро Начикинское расположено на юго-западном побережье Камчатки (бассейн р. Большая). Его размеры: длина – 4,9 км, наибольшая ширина – 2,1 км, средняя – 1,5 км, средняя глубина – 14 м, площадь – 7,54 км². По данным Е.М. Крохина и Ф. В. Крогиус [3], в бассейне р. Большая оно является единственным местом нереста весенней (ранненерестующей расы) нерки и одним из основных мест нереста летней (поздненерестующей).

Целью работы является: проведение вирусологического обследования популяции нерки из озера Начикинское, определение наличия и распространения IHNV, выявление возможных источников и путей распространения инфекционного агента.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовали 30 производителей (23 самки и 7 самцов) и 40 экземпляров молоди нерки, выловленных на нерестилищах озера Начикинское. Пробы у взрослых особей отбирали непосредственно на месте вылова, помещали во флаконы, наполненные средой Эрла с добавлением гентамицина (150 мг/л) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки и доставляли в лабораторию в контейнере со льдом. Прижизненно отбирали у рыб овариальную жидкость, при вскрытии – почку и селезенку. Пробы от 5 рыб объединяли в один пул. Всего получили 6 пулов внутренних органов (почка и селезенка) и 4 пула овариальной жидкости.

Молодь нерки отлавливали мальковым неводом, доставляли в лабораторию живыми в бидонах с водой и подачей воздуха из специального кислородного баллона. Для опыта мальков брали целиком, объединяя по 5 рыб в один пул. Всего исследовали 8 пулов.

Для выделения вирусных агентов использовали перевиваемую линию клеток ЕРС (эпидермальные новообразования большого оспой карпа), которую культивировали на питательной среде Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов. В среду добавляли 10% сыворотки

крови эмбрионов коров и гентамицин (50 мкг/мл). Культивирование линий клеток проводили по общепринятой методике [10].

Заражение проводили в 96-луночных микропанелях. Клеточную культуру инокулировали одновременно с посевом клеток в лунки, а затем инкубировали при температуре 15 °С. Для расчета титра и идентификации вируса использовали традиционные методы – реакцию титрования по Риду и Менчу и реакцию нейтрализации [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При визуальном осмотре живой молодежи нерки у единичных особей обнаружили кровоизлияния у основания брюшных плавников, бледные жабры, вздутое брюшко. Кроме того, у отдельных мальков отмечены потемнение кожных покровов и сколиоз. При вскрытии - селезенка увеличена, почка отечна, печень и почка бледные. На берегу обнаружили двух погибающих мальков с аналогичными признаками патологии. У производителей нерки внешних признаков патологии не наблюдали.

О наличии вирусной инфекции судили по разрушению клеточного монослоя после заражения - цитопатическому эффекту (ЦПЭ). Первые признаки ЦПЭ обнаружили на третий день после заражения клеток материалом, отобранным у погибающей молодежи нерки, на четвертый - у производителей. Развитие ЦПЭ началось с появления скоплений округлых клеток в форме гроздьев винограда. На седьмой день после заражения разрушение монослоя было практически полное в обоих опытах при всех разведениях. При перепассаже на свежие линии клеток ЦПЭ повторился в тех же пулах, что и при первом пассаже.

Идентификацию выделенного агента осуществляли в реакции нейтрализации кроличьей сывороткой с антителами к вирусам, поражающим лососевых рыб: инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) и инфекционного некроза поджелудочной железы (IPNV). После 14 дней наблюдения выяснили, что нейтрализация происходила только с антителами к первому вирусу, индекс нейтрализации (ИН) был выше 50. В остальных случаях реакция была отрицательной.

Размерно-весовые показатели обследованных рыб и титры вируса, выделенного при всех отборах проб, представлены в таблице.

Таблица

Размерно-весовые показатели и титры вируса IHNV (ТЦД₅₀/мл тестируемого материала), выделенного у нерки из озера Начи-кинское

Дата отбора	Размерно-весовые показатели: длина AD, см масса, г	Титр вируса, ТЦД ₅₀ /мл минимальный (максимальный)	
		Средние (размах колебаний)	Внутренние органы Овариальная жидкость
30.07.03 производители	56,0 2510,2	0,4x10 ^{7,2} (0,4x10 ^{8,2})	0,4x10 ^{6,4} (0,4x10 ^{7,8})
05.11.03 молодь	3,89 (2,50 - 5,40) 0,82 (0,28 - 1,66)	0,4x10 ^{8,6}	-

В водоемы бассейна р. Большая нерка начинает заходить в конце второй - начале третьей декады мая и заходит с некоторым перерывом до середины августа [1]. Начало хода ранней (весенней) нерки 25 мая, конец - 15 июня, а поздней (летней) - 23 июля и 15 августа соответственно [6]. Нерка весеннего хода нерестится в течение июля и первых чисел августа, а нерка летнего хода размножается до начала октября [7]. По данным Е.М. Крохина и Ф. В. Крогиус [3], весенняя красная заходит в большую воду во второй половине июня, до нереста, как и летняя, довольно долго находится в озере. Отбор проб в озере Начикинское проводили 30.07.03, то есть на пике нереста ранней нерки. В 2003 г. нерестилища в районе озера были переполнены, рыба погибала, не успев отнереститься. Выделение вируса в воду от инфицированных рыб с экскрементами и половыми продуктами, а также из органических остатков погибших особей приводило к накоплению патогенных частиц в водоеме. Кроме того, этому способствовали особенности нерестилищ - слабое течение воды, рыхлый грунт с примесью песка и ила. Встречаемость вируса во внутренних органах рыб, отобранных для исследования, составляла 83,3%, а в овариальной жидкости достигала 100%.

По данным Мулкахи с соавторами [15], высокое содержание вируса в воде во время нереста нерки при большой концентрации производителей сохраняется на нерестилище длительный период времени. Патоген остается жизнеспособным в пресноводных водоемах в течение нескольких месяцев. Также известно, что IHNV быстро и хорошо адсорбируется на органических грунтовых осадках [16]. Таким образом, накопление свободных вирионов в озере Начикинское создавало благоприятную обстановку для горизонтальной передачи вируса от половозрелых рыб-вирусоносителей

к незараженным особям, в том числе малькам.

Сообщение о массовой гибели молоди нерки в озере Начикинское поступило в лабораторию болезней рыб и беспозвоночных КамчатНИРО 3.11.03. Отбор проб провели 5.11.03. IHNV был выделен от двух погибающих мальков со слабо выраженными клиническими признаками. Титр вируса был высоким ($0,4 \times 10^{6.6}$ ТЦД₅₀/мл). Очевидно, вспышку заболевания зарегистрировали в самом разгаре, но погодные условия и сильное волнение на озере не позволили визуально оценить сложившуюся ситуацию. Акватория Начикинского озера достаточно большая. Умиравшую рыбу обнаружили в устье р. Табуретка, живую молодь из-за шторма отловили в доступном месте у противоположного берега. Кроме того, вирус некроза гемопозитической ткани можно выделить только от мальков, погибающих во время IHNV эпизоотии, или у половозрелых особей в период нереста [9]. Этим объясняется отсутствие ЦПЭ в пулах с пробами, отобранными у живых мальков.

IHNV термолабилен, заболевание обычно развивается при температуре воды от 3 до 15 °С, наиболее остро протекает при 10–12 °С. При отборе проб от молоди температура воды в озере была 2,2 °С. Эмбриональное и личиночное развитие нерки продолжается от 5 до 8 месяцев [7]. Выход личинок из грунта в камчатских водоемах происходит с января по сентябрь из-за различий в сроках нереста производителей и температурного режима нерестилищ [1]. Ф. В. Крогиус по результатам своих исследований предположил, что мальки весенней нерки на нерестилищах озера Начикинского начинают вылупляться в ноябре [3]. Очевидно, значительное варьирование размеров у сеголетков в нашей выборке (Табл.) объясняется разными сроками выклева.

Наиболее восприимчива к заболеванию молодь в течение 2-6 месяцев от начала рассасывания желточного мешка. Рыбы более старшего возраста (годовики-двухгодовики) болеют реже и легче. Чем меньше возраст рыб, тем выше вероятность развития у них заболевания, что связано с несовершенством иммунной системы у молодых рыб [5]. Лето 2003 г. было теплым, однако вспышка заболевания произошла только глубокой осенью. Никаких отклонений или повышенного отхода у молоди нерки на озере Начикинское летом или в начале осени отмечено не было. Инкубационный период IHNV при естественной инфекции и температуре воды 10–15 °С составляет 1–2 недели, при более низких температурах он, очевидно, более растянут по времени.

Хетрик с соавторами [14] обнаружили, что при температуре воды 3 °С период от экспериментального заражения IHNV до появления клинических признаков увеличивается примерно в три раза по сравнению с таковым при оптимальной температуре.

На наш взгляд вышеприведенные данные могут свидетельствовать о горизонтальной передаче вируса сеголеткам нерки от взрослых рыб-вирусоносителей через воду или объекты питания, аккумулирующие вирус. Вильямс и Аменд [27], описывая эпизоотию IHV у молоди нерки на озере Чилко в 1976 г., отмечали, что она произошла в год экстремально высокого возврата производителей на нерестилища, в связи с чем увеличилась смертность икры, личинок и молоди. 2001-2003 гг. отличались высоким уровнем нерестовых подходов нерки. Вероятно, высокая численность половозрелых рыб-вирусоносителей в Начикинском озере явилась одной из причин вспышки инфекционного некроза гемопоэтической ткани у мальков.

В случае вертикальной трансмиссии вспышка болезни, очевидно, возникла бы гораздо раньше и при оптимальных для развития IHNV условиях. Тем не менее, исключить полностью вероятность такого развития ситуации тоже нельзя. Как уже упоминалось выше, IHNV у нерки из бассейна р. Большая выделяли в течение трех лет. В 2001 и 2003 гг. у половозрелых рыб, отобранных для воспроизводства на лососевом рыбноводном заводе Озерки (ОЛРЗ), обнаружили асимптоматическое носительство этого вируса. ОЛРЗ расположен на р. Плотникова (одном из главных притоков р. Большая), которая вытекает из озера Начикинское. Возможно, IHNV циркулирует среди особей исследуемой популяции не первый год. До 2003 г. вирусологических обследований нерки из оз. Начикинское не проводили. Поэтому мы не можем утверждать, является ли носительство IHNV для нее обычным или же мы имеем дело с первым случаем.

Существует две основные гипотезы, объясняющие, почему IHNV можно изолировать только в конце жизненного цикла лососей:

– вирус может сохраняться в латентном состоянии у рыб, выживших после эпизоотии, и активизироваться только при половом созревании [9];

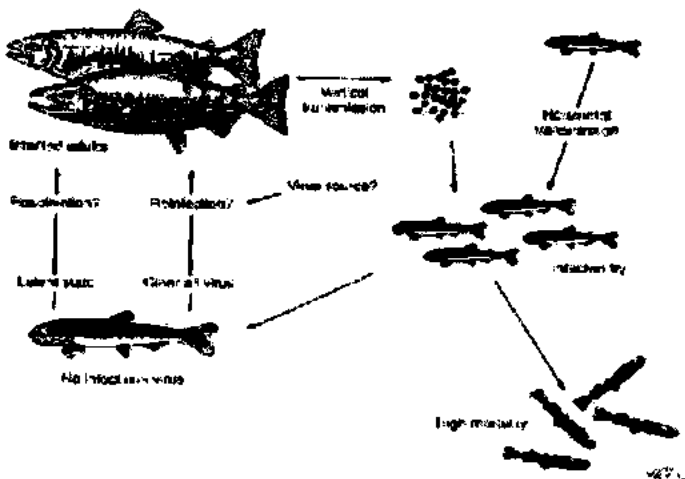
– изначально незараженная вирусом рыба может быть инфицирована перед или во время ее нерестовой миграции [12, 25], что предполагает наличие резервуара инфекции в окружающей среде или другом хозяине. Очевидно, в природе действуют оба этих механизма (рисунок) [28].

Как известно [13], ареал нагула в море у камчатской нерки совпадает с таковым североамериканской. В этих странах IHNV широко распространен и представляет собой серьезную проблему для заводского воспроизводства лососей. Вполне возможно, что данные популяции и являются первичным источником заражения для камчатской нерки. Также не исключено, что в океане существует какой-то общий резервуар инфекции.

Инфицирование вирусом некроза гемопоэтической ткани может произойти в процессе питания, в том числе при каннибализме. Как отмечал В.Ф. Бугаев [1], сеголетки нерки часто остаются на первую зимовку непосредственно на нерестилище или мигрируют в тихие прибрежные участки рек или в озера. Питаются мальки в основном личинками и имаго насекомых и мелкими ракообразными. У этой молодежи значительно увеличивается вероятность заражения вирусом через воду или пищу - мелкие ракообразные, которыми питаются сеголетки, могут инфицироваться за счет питания детритом. Также известен случай выделения вируса у поденок (*Callibaetis* sp.) [22]. В свою очередь личинок и мелких мальков поедает более крупная молодежь лососевых, в том числе нерки [7].

Основу пищи нерки в море составляют ракообразные, крылоногие моллюски, молодежь пелагических, батипелагических и донных рыб [2]. Мальки, ставшие вирусоносителями в пресных водоемах, как описано выше, мигрируют в море и становятся добычей других рыб, инфицируя их. Известно, что некоторые виды морских рыб, например, обыкновенный шайнер и американская длиннорылая колюшка, невосприимчивы к IHNV, но являются носителями вируса и формируют скрытый резервуар инфекции [5].

В 1997 г. Тракслер с соавторами [25] доказали, что выделить вирус у нерки в морской период жизни невозможно из-за присутствия в организме рыбы нейтрализующих его антител, но IHNV появлялся у рыб после захода в реки. Возможно, это происходит из-за того, что при возвращении в пресную воду на нерест рыба испытывает стресс, в результате которого иммунная система не может противостоять вирусу [17]. В период нереста доля вирусоносителей постепенно увеличивается, доходя до 100% у отнерестившихся рыб. При этом увеличивается вероятность вертикальной передачи вируса, то есть от родителей потомству, возможность которой впервые была продемонстрирована американскими учеными Мулкахи и Пасхо [18].



Механическими переносчиками вируса могут являться рыбацкие птицы и животные, а также кровососущие паразиты рыб. Мулкахи, Клейбор и Беттс [19] изолировали IHNV от пиявок (*Piscicola salmositica*) и копепод (*Salmincola sp.*), собранных с нерки, и отметили, что эктопаразиты могут служить переносчиками инфекции среди взрослых особей.

Исходя из вышеизложенных, данных можно утверждать, что возможность стать асимптоматическим носителем IHNV сохраняется у нерки на всех стадиях ее жизненного цикла от икринки до половозрелой особи. Циркуляция вируса в популяции рыб может не привести к вспышке инфекции, которая при этом переходит в латентную форму, но таким образом обеспечивается сохранение вирусносительства и передача вируса новым поколениям рыб.

В естественных популяциях нерки вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани играет роль фактора, регулирующего численность популяций, и, вероятно, поэтому на фоне увеличения численности нерки в бассейне реки Большая мы наблюдаем его распространение и высокие значения вирулентности. В природе соблюдается определенное равновесие, поэтому в естественных условиях последствия эпизоотий не настолько трагичны, как при искусственном воспроизводстве. На заводах наиболее эффективной мерой, препятствующей вертикальной передаче вируса, является обработка оплодотворенной икры раствором иодофора. В естественных водоемах невозможно провести какие-либо профилактические мероприятия и предотвратить развитие

эпизоотии. Снизить риск повышенного отхода молоди нерки от IHNV в природе можно только при правильном регулировании промысла, предотвращая тем самым переполнение нерестилищ.

ВЫВОДЫ

1. У производителей нерки из оз. Начикинское (бассейн р. Большая) выделен вирус инфекционного некроза гемопозитической ткани, относящийся к группе особо опасных и экономически значимых вирусных патогенов, включенных в сертификат при перевозке икры и живой рыбы во многих странах мира.

2. Большая плотность рыб и высокая концентрация вирусных частиц на нерестилищах озера Начикинское послужила причиной вспышки ИHN у сеголеток нерки. Инфицирование произошло горизонтальным путем. Жизнеспособность вируса в пресных водоемах и возможность его вертикальной и горизонтальной передачи могут обусловить в 2004 г повторную эпизоотию ИHN у молоди нерки в этом водоеме.

3. Целесообразно в дальнейшем проводить отбор мальков нерки в районе нерестилищ, неблагоприятных по IHNV, в период или после нереста производителей, что увеличит вероятность обнаружения эпизоотии в естественных популяциях молоди.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бугаев В.Ф.* Азиатская нерка (пресноводный период жизни, структура локальных стад, динамика численности). М.: Колос. 1995. 464 с.
2. *Карпенко В.И.* Ранний морской период жизни тихоокеанских лососей. М.: Изд-во ВНИРО. 1998. 165 с.
3. *Крохин Е.М., Крогиус Ф.В.* Очерк бассейна р. Большой и нерестилищ лососевых, расположенных в нем // Владивосток: ТИПРО. 1937. Т. 9. 156 с.
4. *Рудакова С.Л.* Некроз гемопозитической ткани у производителей нерки и предполагаемые источники инфекции // Вопр. рыболовства. 2003. Т. 4. № 1 (13). С. 93–102.
5. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. Ч. 1. М.: Отдел маркетинга АМБагро. 1998. 310 с.
6. *Семко Р.С.* Запасы западнокамчатских лососей и их промысловое значение // Изв. ТИПРО. 1954. Т. 41. С. 3–109.
7. *Смирнов А.И.* Биология, размножение и развитие ти-

хоккеанских лососей. М.: МГУ. 1975. 334 с.

8. Amend, D.F., W.T. Yasutake, and R.W. Mead. A hematopoietic virus diseases of rainbow trout and sockeye salmon // Trans. Amer. Fish. Soc. № 98 (4). 1969. P. 796-804.

9. Amend, D.F. Detection and transmission of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout // J. Wild. Dis. № 11(4). 1975. P. 471-478.

10. Amos K.H. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens // Third edition. 1985. 114 p.

11. Burke J., and R. Grischkowsky. An epizootic caused by infectious hematopoietic necrosis virus in an enhanced population of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), smolts at Hidden Creek, Alaska // J. Fish Dis. 7. 1984. P. 421-429.

12. Elston R.A., L.W. Harrell, and T.A. Flagg. How do adult sockeye salmon contact IHNV disease? // Fish Health Section, Amer. Fish. Soc. Newsletter. 17. 1989. P. 4.

13. Pacific salmon Life Histories. Edited by Groot, C., and L. Margolis // UBC Press, Vancouver. 1991. P. 3-564.

14. Hetrick F.M., J.L. Fryer, and M.D. Knittel. Effect of water temperature on the infection of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson with infectious hematopoietic necrosis virus // J. Fish Dis. 2. 1979. P. 253-257.

15. Mulcahy D., R.J. Pascho, and C.K. Jenes. Detection of infectious hematopoietic necrosis virus in river water and demonstration of waterborne transmission // J. Fish Dis. 6. 1983a. P. 321-330.

16. Mulcahy D., and S. Mackenzie. Adsorption to freshwater sediments of infectious hematopoietic necrosis virus of salmonid fishes // DRAFT. 6. 1983b. P. 321-330.

17. Mulcahy D., C.K. Jenes, and R.J. Pascho. Appearance and quantification of infectious hematopoietic necrosis virus in female sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) during their spawning migration // Archives of virology. 80. 1984. P. 171-181.

18. Mulcahy D., and R.J. Pascho. Adsorption to fish sperm of vertically transmitted fish viruses // Science. 225. 1984. P. 333-335.

19. Mulcahy D., D. Klaybor, and W.N. Batts. Isolation of infectious hematopoietic necrosis virus from a leech (*Piscicola salmositica*) and a copepod (*Salmincola* sp.), ectoparasites of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* // J. Dis. Aquat. Org. 8. 1990. P. 29-34.

20. Rucker R.R., W.J. Whipple, Parvin, J.R., and C.A. Evans. A contagious disease of sockeye salmon possibly of virus origin

- // Fish Wild. Serv. Fish. Bull. 54. 1953. P. 35-46.
21. *Shchelkunov I.S., T.I. Shchelkunova, O.A. Kupinskaya, L.V. Didenko, A.F. Bykovsky, and N.G. Olesen.* Infectious hematopoietic necrosis (IHN): the first confirmed finding in Russia // Book of abstract 10th Conf. of the EAAP "Diseases of fish and shellfish". Dublin. 2001. P. 44.
22. *Shors S.T., and V. Winston.* Detection of infectious hematopoietic necrosis virus in an invertebrate (*Callibaetis* sp.) // J.Vet. Res. Am. 50. 1989. P. 1307-1309.
23. *Traxler G.S.* An epizootic of infectious hematopoietic necrosis in 2-year-old kokanee, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) at Lake Cowichan, British Columbia // J. Fish Dis. 9. 1986. P. 545-549.
24. *Traxler G.S., and J.B. Rankin.* An infectious hematopoietic necrosis epizootic in sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* in Weaver Creek spawning channel, Fraser River system, B.C., Canada // J. Dis. Aquat. Org. 6. 1989. P. 221-226.
25. *Traxler G.S., J.R. Roome, K.A. Lauda, and S. LaPatra.* Appearance of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and neutralizing antibodies in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) during their migration and maturation period // J. Dis. Aquat. Org. 28. 1997. P. 31-38.
26. *Watson S.W., R.W. Guenther, and R.R. Rucher.* A virus disease of sockeye salmon: interim report // Spec. Sci. Rep. Fish. 1954. U.S. Fish Wildl. Serv. 138 p.
27. *Williams I.V., and D.F. Amend.* A natural epizootic of infectious hematopoietic necrosis in fry of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) at Chilko Lake, British Columbia // J. Fish. Res. Board Can. 33. 1976. P. 1564-1567.
28. *Woo P.T.K., and D.W. Bruno.* Fish diseases and disorders // Viral, Bacterial and Fungal Infections. Vol. 3. 1999. P. 57-121.

**INFECTIOUS NECROSIS OF HEMOPOIETIC TISSUES
(IHN) IN POPULATION OF KOKANEE
ONCORHYNCHUS NERKA (WALBAUM) LAKES
NACHIKINSKOE (KAMCHATKA)**

E.V.Bochkova, S.L.Rudakova

*The Kamchatka scientific research institute of a fish
facilities and oceanography*

683000, Petropavlovsk - Kamchatka,

E-mail: kamniroe@elizovo.kamchatka.ru

*In July, 2003 have lead virologic inspection of mature kokanee
Oncorhynchus nerka (Walbaum), caught on natural breeding*

bottom of lakes Nachikinskoe (pool r. Bolshaya). As a result of researches on a line of cells EPC have allocated virus pathogen, identified as a virus infectious necrosis of hemopoietic tissues (IHNV). Distribution of a virus to tests reached 100 % in a ovarial liquid and 83,3 % in internal bodies. In the beginning of November, 2003 there was a mass destruction of newly-hatched fish of kokanee in lake Nachikinskoe. The carried out researches have confirmed presence of virus IHN. Credits of a virus were high.

УДК 597. 553. 2: 597-12: 576. 85

ИНФЕКЦИОННЫЙ НЕКРОЗ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ (ИНГТ), ЭТИОЛОГИЯ И ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ МЕРЫ БОРЬБЫ.

А.Е. МИКУЛИН

МГУТУ, 113149, Москва, ул. Болотниковская, 15.

В работе дан обзор литературы по инфекционному некрозу гемопоэтической ткани лососевых рыб, на основании которого автором предлагаются новые подходы к решению проблем борьбы с этим заболеванием.

Заболевание протекает по типу эпизоотии и характеризуется развитием септического процесса, тяжелым поражением органов гемопоэза, кровоизлияниями в органы и ткани, а также массовой гибелью рыб [4]. Оно проявляется в форме экссудативно-геморрагического синдрома, развитие которого обусловлено размножением вируса в соединительной ткани организма, гемопоэтической ткани и клетках экскреторной части почек, что ведет к нарушению водно-минерального баланса и выходу плазмы и клеток крови в окружающие ткани и полости тела [3, 7, 8, 10].

Особенно поражаются почки и селезенка. Вирус обладает повышенным тропизмом в отношении соединительной ткани. Переболевшая рыба обладает стойким иммунитетом, в ее крови появляются антитела. По нашему мнению, возможно, по-этому вирус при носительстве располагается в соединительной ткани, недоступной для Т- и В-лимфоцитов.

Болезнь вызывает РНК-содержащий вирус пулевидной формы. Он представлен одним серотипом. Термолабилен: за 15 мин. прогревания при 45°C инактивируется более чем на 99% и полностью разрушается при 60°C. Он достаточно быстро разрушается в растворах глицерина, что, видимо, указывает на его высокую чувствительность к осмотическому давлению среды. В гомогенатах почек, селезенки и пече-

ни он сохраняется не более 2-3 дней.

В пресноводной аквакультуре вспышки заболевания зарегистрированы у нерки, чавычи, кеты, горбуши, симы, стальноголового лосося и радужной форели. Реже болеют кумжа и лосось Кларка [1, 9, 10]. Гольцы и кижуч считаются устойчивыми к заболеванию, но могут быть носителями вируса [8, 11].

Наиболее восприимчивой к заболеванию является молодь в период от рассасывания желточного мешка до 2-6 месяцев при температуре 3-15°C. При более высоких температурах болезнь затухает [2]. Старшие возрастные группы болеют меньше, слабее, но становятся носителями. Однако впервые заболевшие производители могут погибнуть [6].

Инфицированные рыбы выделяют вирус с мочой (это обстоятельство, возможно, определяет преобладание заболевания в пресноводный период жизни рыб, когда почки выделяют преимущественно воду, а не соли), слизистыми выделениями кишечника (редко с фекалиями), с половыми продуктами, через жабры, кожу и ткани плавников.

Вирус передается через воду, ил, при каннибализме. При температуре воды 15°C он инактивируется через месяц. Переносчики его - кровососущие паразиты (пиявки, копецоды) и птицы [8, 11]. Он передается от производителей к потомству во время оплодотворения [3, 7, 8, 10].

По нашему мнению, поскольку через оболочку икринок не проникают белки, то значительно более крупный вирус может проникнуть в яйцеклетку только со сперматозоидом. Поскольку это РНК-содержащий вирус, то он не может проникнуть в яйцеклетку в составе ДНК сперматозоида. Следовательно, он проникает в яйцеклетку через микропиле, будучи на поверхности сперматозоида.

Инкубационный период при температуре воды 10-15°C составляет 1-2 недели. Больные рыбы темнеют, располагаются, где нет течения. У них развивается экзофтальм (пучеглазие), точечные кровоизлияния в периокулярной соединительной ткани глаз, в межлучевой ткани оснований плавников, позади головы. Брюшко увеличено. У личинок имеются кровоизлияния в желточный мешок. В полости тела обнаруживают скопления прозрачного, желтоватого экссудата и кровоизлияния. У 1-5% переболевших рыб развивается искривление позвоночника (сколиоз, лордоз).

Интересно отметить, что данная болезнь характерна для рыб, мигрирующих из пресных вод в морские и обратно. Развитие же заболевания характерно для пресных вод.

Вирус может находиться в неактивной форме длительное время в морском периоде жизни рыб [5], а также в перивителлиновом пространстве в период длительного эмбрионально-личиночного развития до обнаружения им рецепторов, возможно, клеток-мишеней органов гемопоэза. Заболевание явно проходит ряд фаз: бурное развитие и распространение в период эпидемии у молоди рыб; носительство в морской период жизни; передача потомству в период размножения; «пережидание» в период эмбрионально-личиночного развития.

По нашему мнению, вирусоносительство и длительное нахождение вируса в неактивной форме связано с накоплением или пребыванием его в структурах (соединительная ткань, выделительные железы, овариальная и семенная жидкости, перивителлиновое пространство), богатых мукополисахаридами. Видимо, взаимодействие белковой оболочки вируса с мукополисахаридами препятствует протеолитическому разрушению белковой оболочки вируса, обеспечивая его длительную сохранность в специфических условиях его «жизненного цикла», связанного со сменой сред обитания его хозяина (пресные воды - морские воды). Возможно, за счет мукополисахаридов вирус прикрепляется к поверхности сперматозоида, проникая через микропиле под оболочку яйца. Возможно, что использование гиалуронидазы семенников крупного рогатого скота или свиней, разрушающей мукополисахариды (в том числе и хориона оболочки), приведет к невозможности проникновения вируса в икринку со сперматозоидом.

Слабая вирулентность в крови, видимо, связана с инактивацией вируса в процессе его взаимодействия с единственным мукополисахаридом крови - гепарином. В свою очередь, снижение гепарина в крови, видимо, приводит к повышению тромбообразования, вызывая закупорку капилляров и кровоизлияния.

Поскольку часть рыб переносит заболевание, становясь вирусоносителями, в их крови должны возникать антитела к данному вирусу. Разработав искусственное получение противовирусных антител, например, вводя вирусы в кровь гольцов и получая сыворотку их крови, или используя производство антител методом генной инженерии или другими методами, их можно вводить перед нерестом производителям, а также добавлять в воду при оплодотворении икры.

Мы полагаем, что использование протамин сульфата или иных полисахаридсвязывающих агентов может предотвратить проникновение вируса в яйцеклетку в момент оплодотворения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абтахи Б.* Вирусные болезни рыб // Паразиты и болезни рыб. М.: ВНИРО, 2000. С. 5-8.
2. *Ванятинский В. Ф., Мирзоева Л. М., Поддубная А. В.* Болезни рыб. М.: Пищевая промышленность. 1979. 232 с.
3. *Рудиков Н. И.* Вирусы и вирусные болезни рыб // Итоги науки и техники. Сер. «Ихтиология». М.: ВИНТИ, 1985. Т. 1. С. 6-92.
4. *Щелкунов И. С., Гаевская А. Б., Юхименко Л. Н., Бычкова Л. И.* Болезни гидробионтов в марикультуре и их профилактика // Биологические основы марикультуры. М.: ВНИРО, 1998. С. 246-294.
5. *Anon O.I.E.* Report on the meeting of the Fish Diseases Commission. Paris. 1993. 17 p.
6. *Olson C., Thomas J.* An outbreak of infectious hematopoietic necrosis in the Baker River system affecting two year classes of sockeye // FHS Newsl. 1994. V. 22. P. 1-3.
7. *Roberts R. J., Schlotfeldt H.-J.* Grundlagen der Fischpatologie. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey. 1985. 425 p.
8. *Schlotfeldt H.-J., Alderman D. J.* What should I do? A practical guide for the fresh water fish farmer. EAFF Warwick Press: Weymouth. 1995. 60 p.
9. *Traxler G.S., Richard J.* First detection of infectious hematopoietic necrosis virus in marine fishes // FHS Newsl. 1996. V. 24. P. 7.
10. *Wolf K.* Fish Viruses and Fish Viral Diseases // Cornell University Press: Ithaca and London. 1988. 476 p.
11. *Yamamoto T., Arakawa C. K., Batts W. N., Winton J. R.* Comparison of infectious hematopoietic necrosis in natural and experimental infections of spawning salmonids by infectivity and immunohistochemistry // Viruses of Lower Vertebrates. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 1989. P. 411-429.

INFECTIOUS NECROSIS OF HEMOPOIETIC TISSUE OF SALMON FISHES, ETHIOLOGY AND PROSPECTIVE MEASURES OF STRUGGLE.

A.E.Mikulin
MSUTM, Moscow.

In work the review of the literature on infectious necrosis of hemopoietic tissue of salmon fishes is given on the basis of which the author offers new approaches to the decision of problems of struggle against this disease.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ В УСЛОВИЯХ

РЫБОВОДНЫХ ХОЗЯЙСТВ СЕВЕРО-ЗАПАДА РОССИИ

Нечаева Т.А.¹, Евсева Н. В.², Антипова Н.А.³

¹Федеральный селекционно-генетический центр
рыбоводства, п. Ропша Ленинградской области

²Институт биологии КНЦ РАН, г. Петрозаводск

³Ленинградская областная ветеринарная лаборатория,
г. Санкт-Петербург

185610 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11, Институт
биологии КНЦ РАН,

Евсева Н.В. e-mail: evseeva@krc.karelia.ru

Среди инфекционных заболеваний, отмеченных в форелевых хозяйствах Ленинградской области и Карелии в 1997-2004 гг., наиболее распространенными являются условно-патогенные бактериозы. В результате микробиологических исследований были выявлены возбудители псевдомоноза (*Pseudomonas fluorescens*), стрептококкоза (*Streptococcus sp.*) и миксобактериозов разных форм. Из них значительную опасность для молоди форели представляло жаберное бактериальное заболевание, вызываемое *Flavobacterium branchiophila*. Возбудитель бактериального холодноводного заболевания *Flavobacterium psychrophilum* отмечен у форели разных возрастов, при этом болезнь протекает как в острой, так и в хронической форме. Показано, что наиболее важными факторами, способствующими возникновению и протеканию заболеваний, являются условия выращивания, температура воды, возраст рыб и межхозяйственные перевозки.

ВВЕДЕНИЕ

Разведение радужной форели на рыбоводных предприятиях Северо-Запада России имеет большие перспективы. Интенсификация производственных процессов, неизбежная в современном рыбоводстве, влечет за собой усложнение и изменение экологической и эпизоотической обстановки в хозяйствах. При этом происходят изменения в характере и структуре болезней рыб.

В 70-80-е годы в форелевых хозяйствах Северо-Запада преобладали в основном заболевания, вызываемые простейшими или связанные с нарушениями биотехники выращивания. Среди первой группы выделялись такие болезни, как костииоз, гексамитоз, иктиофтириоз, апиозомоз, триходини-

оз. Значительные потери выращиваемой продукции вызывали гельминтозы триенофороз и диплостомоз. Нередко отмечался аргулез и сапролегниоз. Вторая группа заболеваний представлена в основном водянкой желточного мешка, белопятнистой болезнью, цериодной дегенерацией печени. Многие заболевания развивались на фоне неблагоприятных условий содержания и кормления рыбы [1, 3, 5, 8, 16].

Водоемы, используемые для разведения и выращивания форели, загрязнялись путем смыва с полей удобрений и сброса отходов с сельскохозяйственных предприятий. Это ухудшало общее санитарное состояние воды. Особо острой проблемой в форелеводстве было качество кормов. На рыбоводных предприятиях использовались преимущественно отечественные корма марки РГМ, обладавшие сравнительно высоким кормовым коэффициентом (1,5–2,0) и невыдержанностью рецептуры. Неблагоприятные условия хранения зачастую приводили к развитию плесневых грибов и окислению жиров, что ухудшало качество корма. Это в свою очередь способствовало развитию пищевых токсикозов. В результате рыба плохо росла, достигая к концу вегетационного периода массы 5–10 г. Масса годовика форели весной составляла не более 24–30 г.

В настоящее время эпизоотическая обстановка в хозяйствах Северо-Запада изменилась, что произошло благодаря использованию современной биотехники выращивания. Резкое уменьшение выноса минеральных и органических удобрений с полей и сброса с животноводческих предприятий способствовали улучшению качества воды. Переход на более сбалансированные по составу финские (Респонс Е, Ройал Плюс, Эдал) и датские экструдированные корма (Эколайф, Аквалайф, Био-Оптимал) привел к повышению иммунно-физиологического статуса рыб. Благодаря успехам селекционно-генетических исследований улучшилось качество посадочного материала. В настоящее время масса сеголетка к концу сезона выращивания достигает 80–100 г, а масса годовика составляет 150–180 г в бассейновых хозяйствах и до 300 г в садковых. Как следствие, практически полностью исчезли водные и пищевые токсикозы, а паразиты, в первую очередь простейшие, перестали играть ведущую роль в возникновении заболеваний [4, 12].

Однако, не смотря на видимое улучшение эпизоотического состояния, участились вспышки бактериальных болезней. При этом возбудители облигатных бактериальных заболеваний (фурункулез, йерсиниоз) отмечены не были. В то

же время условно-патогенные бактериозы, связанные, прежде всего, с условиями выращивания, обнаруживаются достаточно регулярно. Значительную роль при этом играют миксобактериозы, которые широко распространены у лососевых рыб в разных странах и отличаются большим разнообразием клинических проявлений и разной тяжестью течения болезни. К этой же группе условно-патогенных бактериозов относятся псевдомонозы и стрептококкозы [7, 14, 15, 17 - 19, 21 - 24].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее сообщение является результатом исследований, проведенных в двух точках Северо-Западного региона – на юге Ленинградской области (рыбоводные хозяйства Федерального селекционно-генетического центра в п.Ропша) и в Карелии (хозяйства, расположенные в Северной части бассейна Онежского озера). В первом случае рыба исследовалась в хозяйствах различного типа - холодноводных бассейнах, прудах и канавах с ключевым водоснабжением и с поверхностным питанием. В Карелии изучена форель из двух садковых озерных хозяйств.

Обследование рыб осуществлялось на протяжении 1997 - 2004 гг. В процессе работы на бактерионосительство было изучено 52 экз. форели разного возраста – от молоди до производителей. При проведении микробиологических исследований посевы делали из подкожной клетчатки, язв и других поражений на поверхности тела, из внутренних органов на различные среды, в том числе на РПА (рыбо-пептонный агар) с низкой концентрацией белка для выделения миксобактерий. Для диагностики миксобактериозов в полевых условиях использовали метод, предложенный Люмсдерс с сотрудниками [20], для чего изготавливались окрашенные по Грамму мазки с поверхности тела, жабр и почек. Выделение культур возбудителей заболеваний проводилось в Ленинградской областной ветеринарной лаборатории. Общую микробную обсемененность воды определяли методом параллельных посевов с последующим учетом колоний, вырастающих при 37 и 20 °С [9].

Кроме того, в ходе работы использовали метод неполного паразитологического вскрытия, методы гематологического и гистологического анализа. Гидрохимические исследования проводили посезонно четыре раза в год.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенных исследований в бассейновых и садковых форелевых хозяйствах Северо-Запада было отмечено наличие возбудителей миксобактериозов разных форм, псевдомоноза и стрептококкоза.

Вспышки миксобактериозов чаще всего наблюдались весной и осенью при температуре воды ниже 10°C. Клиническая картина заболеваний была очень разнообразна и связана прежде всего с возрастом рыб.

Для молоди форели в возрасте 2–2,5 месяца и массой не более 0,3–0,5 г значительную опасность представляло жаберное бактериальное заболевание, вызываемое *Flavobacterium branchiophila*. Больные рыбы поднимались к поверхности воды, скапливаясь у стенок бассейнов. Жаберные крышки были оттопырены, жабры ослизнены и отечны. Гиперплазия и гипертрофия жабрных лепестков достигала более половины поверхности респираторного эпителия. Заболевание развивалось в острой форме, поражая до 40–80% молоди. Смертность достигала 20%. У сеголеток форели жаберное бактериальное заболевание встречалось редко, проявляясь в хронической форме у 10–30% рыб. Смертность не превышала 15% [10, 13].

Бактериальное холодноводное заболевание (возбудитель – *Flavobacterium psychrophilum*) у сеголеток при бассейновом выращивании встречалось в острой и хронической форме. Рыбы переставали питаться, у них наблюдалась анемия жабр и внутренних органов, некротическое поражение плавников, больные особи совершали спиралевидные движения. В некоторых случаях болезнь осложнялась стрептококковой инфекцией. Гистологические исследования позволили выявить в почках, печени и сердце больных рыб дистрофические и некробиотические процессы. Содержание гемоглобина в крови падало до $5,5 \pm 0,5\%$, содержание общего белка снижалось до $2,25 \pm 0,13\%$. Возможна гибель 15–30% сеголеток форели.

В садковом хозяйстве в Карелии в декабре 2003 г у крупных годовиков (массой 200–300 г) выявлено бактериальное холодноводное заболевание в хронической форме. При визуальном осмотре часть рыбы на боковой поверхности имела подкожные крупные абсцессы с кровянистым содержимым, на месте которых впоследствии образовывались язвы диаметром до 4,0 см с ярко выраженным желтоватым пигментом вокруг пораженных участков. Небольшие язвы были обнаружены также на голове, как следствие лизиса хря-

щей, и на хвостовом стебле. Следует отметить, что проявление миксобактериоза с подобными клиническими признаками было выявлено в Чили у рыбы навеской 100 – 150 г. и описано под названием “некротический миозит” [20]. Схожая картина заболевания встречается в финских форелевых хозяйствах [14].

В мазках с поверхности язв в большом количестве были обнаружены миксобактерии *F. psychrophilum*, которые после окраски генциан-фиолетом хорошо были видны под микроскопом с увеличением 10X40 в виде длинных палочек. Другая часть обследованной рыбы не имела внешних повреждений, но некоторые особи отличались нарушением в поведении: они медленно плавали на боку, периодически совершая винтообразные движения.

При вскрытии отмечены кровоизлияния в мышцах (в районе грудных плавников и брюшка), сердце, печени и заднем отделе кишечника. Печень имела песочную или мраморную окраску с темными пигментными включениями, селезенка сильно увеличена, темно-бордовая, почки водянистые, отечные, в сердечной сумке отмечен серозный экссудат. После проведенного двухнедельного курса лечения окситетрациклином с фуразолидоном состояние внутренних органов улучшилось, большинство рыб питалось, однако содержание гемоглобина было невысоким - от 3,5 до 7,5 г%.

В январе проведено санитарно-микробиологическое исследование воды. Общее микробное число составляло на глубине 4 м 2016 КОЕ/мл (развивавшихся при 22 °С) и 6720 (при 37 °С), а у дна 30 и 10 КОЕ/мл соответственно.

У производителей и рыб ремонтной группы в хозяйствах Северо-Запада бактериальные заболевания не встречались, но не исключено их носительство.

Стрептококкоз был отмечен только в бассейновых хозяйствах ФГУП ФСГЦР (Ленинградская обл.) в 1996–97 гг. Возбудитель заболевания *Streptococcus* sp. был выделен от рыб, имеющих характерные клинические признаки этого заболевания – экзофтальм, некроз роговицы глаз, деформацию и разрушение хрусталика, выпадение глазного яблока, потемнение окраски. Гистологические исследования позволили выявить кровоизлияния в ткани головного мозга и в глазах. Миксобактериоз при этом мог способствовать прогрессированию стрептококковой инфекции [6]. При проведении дальнейших исследований стрептококкоз обнаружен не был.

Псевдомоноз. *Pseudomonas fluorescens* выделен как в бас-

сейновых, так и в садковых хозяйствах. В бассейновых холдноводных хозяйствах клинические признаки псевдомоноза в виде небольших язв на поверхности тела обнаруживались единично у сеголеток форели. Общее количество зараженных рыб в отдельных бассейнах не превышало 1 – 5%. Смертельных случаев не наблюдалось.

В другом садковом хозяйстве в Карелии в январе 2004 г. *P. fluorescens* был выделен у двухгодовиков форели с массой тела 300–400 г из поверхностных кожных поражений в виде обширных (2,0–3,5 см в диаметре) язв. Состояние внутренних органов (печени, почек, селезенки, сердца, желудочно-кишечного тракта) и жабр в большинстве случаев соответствовало норме. Иногда можно было отметить незначительную кровенаполненность почек. Воспалительный процесс в полости тела не наблюдался. Содержание гемоглобина в крови составляло 7,5 г%. Заболевание охватывало не более 1–2% рыб в отдельных садках. Столь незначительное проявление заболевания связано в первую очередь с низкими температурами воды (1–2°C). У трехгодовиков форели в том же хозяйстве признаки заболевания обнаружены не были.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наши исследования позволили выявить ряд факторов, влияющих на эпизоотическое состояние хозяйств и возникновение бактериальных заболеваний.

В первую очередь это условия выращивания. Повышенное содержание органических веществ и переуплотненные посадки способствуют возникновению неблагоприятного бактериального фона. Это приводит к снижению иммуно-физиологического статуса рыб и, как следствие, к появлению болезней. Так, в бассейновых хозяйствах бактериальные инфекции развиваются чаще всего во время весеннего паводка и при использовании недостаточно совершенной оборотной системы очистки воды.

Кроме того, наблюдения за эпизоотическим состоянием хозяйств показали, что наиболее чувствительными к бактериозам являются рыбы в возрасте до года. Вспышки заболевания в острой форме, сопровождающиеся значительной гибелью рыб, поражают, как правило, молодь форели [11]. При благоприятных условиях выращивания заболевания затухают или переходят в хроническую форму, чему способствует понижение температуры воды. Особенно это характерно для водоемов Карелии.

Появление холодноводного флавобактериоза у годовиков форели в хозяйстве Карелии имело свои особенности. Водоем, на котором располагается хозяйство, имеет благоприятные для целей рыборазведения параметры (глубина, прозрачность, качество воды). Объем выращиваемой рыбы незначителен, плотности ниже нормативных, время эксплуатации — три года. На фоне хорошего эпизоотического состояния водоема флавобактериоз рыбы был неожиданным.

Детальное исследование характера заболевания показало, что возникновение флавобактериоза явилось результатом действия ряда факторов. Прежде всего, это состояние выращиваемой форели. Исследуемая рыба летом переболела грибковым заболеванием — бранхиомикозом, вызванным *Branchiomyces* sp., заражение которым произошло еще в питомнике, откуда были завезены мальки. Высокая температура воды в июле-августе (25-26 °C) спровоцировала вспышку бранхиомикоза и вызвала отход части рыб. С этим же посадочным материалом мог быть завезен и возбудитель флавобактериоза *F. psychrophilum*, хотя этот патоген обитает во многих водоемах. Не исключено, что заражение форели возбудителем миксобактериоза могло произойти от уклей (*Alburnus alburnus*), в массе скапливающейся в зоне садков, и у которой на поверхности тела имелись повреждения, схожие с таковыми у форели (нарывы, язвы). Кроме того, в августе существенно был увеличен рацион питания рыб, что могло ухудшить санитарное состояние воды из-за повышения органического загрязнения. С понижением температуры воды до 6-8 °C у форели начали появляться первые клинические признаки болезни, а к зиме при температуре 1-2 °C в исследуемом хозяйстве около 2 % рыб имели нарывы и открытые язвы. В это время в воде было отмечено высокое количество микроорганизмов, что не характерно для зимнего периода. Известно, что между микробиоценозом воды и рыбы существует глубокая взаимосвязь [2]. Наибольшая обсемененность воды зарегистрирована на глубине 4 м, т.е. на уровне садков. Это вызвано, вероятно, тем, что больная рыба, содержащаяся в садках, являлась основным источником бактерий в воде.

Анализ эпизоотического состояния хозяйства показал, что, наряду с экологическими причинами, возникновению миксобактериоза у форели способствовала перевозка посадочного материала из питомника. Аналогичная ситуация возникла и в другом хозяйстве, где псевдомоноз возник у форели, которая дважды подверглась перевозке. В первом слу-

чае после транспортировки из питомника у рыб отмечался сильнейший сапролегниоз (дерматомикоз), вызванный грибом *Saprolegnia parasitica* и осложненный неидентифицированной микрофлорой. Последующее выращивание рыб осуществлялось в условиях эвтрофированного водоема. Вторая перевозка в условия олиготрофного водоема способствовала оздоровлению рыбы, но незначительная инфекция *P. fluorescens* имела место. Вероятно, заражение псевдомонозом произошло в эвтрофном водоеме, так как у других рыб из этого хозяйства признаки заболевания обнаружены не были. Кроме того, показатели санитарно-микробиологического анализа воды были ниже нормативных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богданова Е.А. Паразиты и инвазионные болезни лососевых и сиговых в рыбоводных хозяйствах // Изв. ГосНИОРХ. 1977 т. 120. 161 с.

2. Бычкова Л.И. Микробиоценоз радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) и водной среды при садковом выращивании // Автореф. диссерт. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. М., 2002. 25 с.

3. Евсеева Н.В., Лятти Т.А. Протозойные заболевания радужной форели в условиях Карелии // "Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера". Тез. докл. XI сессии Ученого Совета, Петрозаводск, 1981. С. 142.

4. Евсеева Н.В. Ихтиопатологические исследования в форелевых хозяйствах Карелии // «Проблемы воспроизводства, кормления и борьбы с болезнями рыб при выращивании в искусственных условиях». Матер. научн. конфер., Петрозаводск, 2002. С. 134-138.

5. Евсеева Н.В. Заражение радужной форели цестодой *Triaenophorus crassus* в условиях садковых хозяйств Северо-Запада и факторы, его определяющие. Сб. научн. трудов ГосНИОРХ. 1986. Вып. 248, С.159-168.

6. Карасева Т. А., Сердюк А.В., Логинова Г. А. Стрептококковая инфекция в лососевых хозяйствах Европейского Севера. // Сб. научн. трудов ГосНИОРХ. 1992. Вып. 311. С. 120-124.

7. Карасева Т.А. Болезни рыб в аквакультуре Севера России (на примере Кольского полуострова). Дисс. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. Петрозаводск, 2003.168с.

8. Куденцова Р.А. Заболевания радужной форели в хо-

зяйствах индустриального типа // Тез. докл. IX Всесоюз. совещ. по параз. и болезням рыб. Л. 1990. С. 66-67.

9. *Лабинская А.С.* Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1972. 479 с.

10. *Нечаева Т.А.* Анализ эпизоотического состояния сеголеток радужной форели в зависимости от сроков выклева и условий выращивания // Тез. докл. VI Международной науч. конфер. "Актуальные проблемы биологии и экологии". Сыктывкар. 1999. С. 152.

11. *Нечаева Т. А.* Анализ эпизоотического состояния радужной форели в ФСГЦР // Сб. научн. трудов ГосНИОРХ. 2000 а. Вып. 326. С. 186 – 195.

12. *Нечаева Т. А.* Факторы, влияющие на эпизоотическое состояние радужной форели в индустриальном хозяйстве ФСГЦР // Тез. докл. Научно-техн. симпози. "Современные средства воспроизводства и использования водных биоресурсов". СПб. 2000. С. 190 – 192.

13. *Нечаева Т.А.* Бактериальные заболевания у радужной форели в индустриальном хозяйстве (ФГУП ФСГЦР) // Тез. докл. VII Международной научн. конфер. "Биология внутренних вод: проблемы экологии и биоразнообразия". 2002. Борок. С. 138.

14. *Рахконен Р., Веннерстрем П., Ринтамяки-Киннунен П., Каннел Р.* Здоровая рыба. Профилактика, диагностика и лечение болезней // Изд-во: НИИ охотничьего и рыбного хозяйства. Хельсинки, 2003. С.56-59.

15. *Рудиков Н. И., Грищенко Л. И.* Микрофлора и бактериальные болезни рыб. // В кн.: Иктиология (Итоги науки и техники /ВНИИТИ/). 1985. Т. 1. М. С. 93 – 160.

16. *Румянцев Е.А., Малахова Р.П.* Паразиты и болезни рыб Карелии. Изд-во «Карелия». Петрозаводск, 1983. 136 с.

17. *Holt R. A.* Characterization and control of *Cytophaga psychrophila* (Borg) the causative agent of low temperature disease in young coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) // M. S. Thesis, Oregon State University, Corvallis. 1972. P. 231 – 135.

18. *Kent M. L., Groff J. M., Morrison J. K., Yasutake W. T., Holt R.A.* Spiral swimming behaviour due to cranial and vertebral lesion associated with *Cytophaga psychrophila* infection in salmonid fishes // Diseases Aquatic Organismus. 1989. V.6. P. 11 – 16.

19. *Lorenzen E., Dalsgaard J., FromY., Hansen E.M., Horlyck V., Korsholm H., Møllergaard N., Olesen N.J.* Preliminary investigation of fry mortality syndrome in rainbow trout // Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 1991. Vol. 11 (2). P. 77 – 79.

20. Lumsder J. S., Ostland V. E., Ferguson H. W. Necrotic miositis in cage cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), caused by *Flexibacter psychrophilus* // J. Fish. Diseases. 1996. V. 19 (2). P. 113 – 119.

21. Schlotfeldt H. J., Alderman D.J. What should I do? A practical guide for the fresh water fish farmer // EAPF, Warwick Press, Weymouth. 1995. 50 p.

22. Toranzo A. E., Barja I. L. Fry mortality syndrome (FMS) in Spain. Isolation of the causative bacterium *Flexibacter psychrophilus* // Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 1993. V.13 (1). P. 30–32.

23. Wakabayashi H. Effect of environmental conditions on the infectivity of *Flexibacter psychrophilus* to fish // J. Fish. Diseases. 1991. V.14. P. 279 – 290.

24. Wood I. W. Diseases of pacific salmon their prevention and treatment // State of Washington. Department of Fisheries. Hatchery Division. 1974. P. 22 – 24.

BACTERIAL ILLNESSES OF AN IRIDESCENT TROUT IN CONDITIONS OF FISH-BREEDING FACILITIES OF NORTHWEST OF RUSSIA

Nechaeva T.A.¹, Evseeva N. V.², Antipova N.A.³

1 - Federal selective-genetic centre of fish-breeding, Ropsha,
Leningrad region

2 - Institute of biology KSC the Russian Academy of
Science, Petrozavodsk

3 - Leningrad's regional veterinary laboratory, Saint
Petersburg

Among the infectious diseases marked in trout facilities of Leningrad Region and Karelia in 1997-2004, the most widespread are conditional - pathogenic bacterioses. As a result of microbiological researches activators of pseudomonosis (*Pseudomonas fluorescens*), streptococcosis (*Streptococcus* sp.) and mixobacteriosis different forms were revealed. From them significant danger for young fish to a trout was represented with the branchiate bacterial disease caused *Flavobakterium branchiophila*. The activator bacterial cold-water diseases *Flavobakterium psychrophilum* is marked at a trout of different age, thus illness precedes both in sharp, and in the chronic form. It is shown, that by the most important factors promoting occurrence and course of diseases, conditions of cultivation, temperature of water, age of fishes and intereconomic transportations are.

ПАЗАРИТОФАУНА ЛОСОСЕВИДНЫХ РЫБ ВОДОЕМОВ НАЦИОНАЛЬНОГО ПАРКА «ПААНАЯРВИ»

Барская Ю.Ю., Иешко Е.П.
Институт биологии КарНЦ РАН
mihrom@onego.ru

Приводятся данные по паразитофауне молоди и старших возрастных групп кумжи *Salmo trutta*, европейского хариуса *Thymallus thymallus* и сига *Coregonus lavaretus* водоемов национального парка Паанаярви. Показано, что, фауна паразитов лососевидных рыб характеризуется высокой степенью общности, но при этом большая или меньшая приуроченность видов к тому или иному хозяину является результатом эволюционно закрепленных отношений между паразитами и их хозяевами. Эпизоотическое состояние водоемов системы оценивается как благополучное.

ВВЕДЕНИЕ

Национальный парк «Паанаярви» расположен на северо-западе республики Карелия в наиболее возвышенной ее части. Одним из важных аспектов деятельности парка, приносящим существенный доход, является лицензионное рыболовство [5]. В состав рыбного населения многочисленных водоемов этой территории входит 15 видов рыб, в том числе кумжа *Salmo trutta*, европейский хариус *Thymallus thymallus* и сиг *Coregonus lavaretus*. Вполне заслуженно наибольшей популярностью среди посетителей национального парка пользуется спортивный лов кумжи и хариуса [4 – 6]. Этот вид активного отдыха осуществляется на основных водных артериях – р.Оланге и оз. Паанаярви.

Целью данного исследования было изучение паразитофауны лососевидных рыб как наиболее ценных и перспективных в экономическом отношении видов и оценка эпизоотического состояния водоемов НП Паанаярви.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Данная работа основана на материалах икhtiопаразитологических исследований водоемов озерно-речной системы Паанаярви – Оланга, проводившихся в 1998 – 2002 гг. Методом полного паразитологического вскрытия [2] исследовано 45 экз. молоди лососевидных рыб (кумжи, сига, ха-

риуса) в возрасте 3+, а также 48 экз. лососевидных рыб старших возрастных групп. Рыба отлавливалась с помощью сетей, удочки и электролова.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кумжа *Salmo trutta* L. Фауна паразитов молоди кумжи 3+ представлена 13 видами (табл. 1): Мухоспоридия – 1, Ciliophora – 3, Trematoda – 6, Nematoda – 2, Acanthocephala – 1. В составе фауны только один вид (*Chloromyxum schurovi*) является специфичным для лососей рода *Salmo*. Большинство видов являются характерными паразитами лососевидных рыб (*Crepidostomum farionis*, *C. metoecus*, *Ichthyocotylurus erraticus*, *Cystidicoloides tenuissima*, *Capillaria salvelini*, *Echinorhynchus salmonis*). Широкоспецифичные виды представлены инфузориями и трематодами рода *Diplostomum*. Отмечено 9 видов паразитов, чье развитие связано с бентосными беспозвоночными. К массовым видам можно отнести *Diplostomum volvens* (73/2,1)* (Здесь и далее в скобках: первая цифра – экстенсивность заражения, (%); вторая – индекс обилия, экз.) и *C. tenuissima* (67/2,0). Выявлено 4 вида, развивающихся без смены хозяев.

Паразитофауна кумжи старших возрастных групп насчитывает 24 вида (табл. 2), относящихся к следующим систематическим группам: Мухоспоридия – 1, Ciliophora – 3, Monogenea – 1, Cestoda – 5, Trematoda – 5, Nematoda – 7, Acanthocephala – 1, Crustacea – 1. В составе фауны один вид (*Chloromyxum schurov*) специфичен для кумжи и лосося. Специфичными паразитами лососевидных рыб являются 12 видов (*Discocotyle sagittata*, *Eubothrium crassum*, *E. salvelini*, *Cyathocephalus truncatus*, *Diphyllobothrium ditrenum*, *Crepidostomum farionis*, *Ichthyocotylurus erraticus*, *Cystidicola farionis*, *C. tenuissima*, *C. salvelini*, *E. salmonis*, *Argulus coregoni*). Остальные виды – широкоспецифичны. Основу фауны составляют виды со сложным циклом развития – 19. С прямым циклом развития отмечено 5 паразитов. В целом видовой состав паразитофауны отражает характер трофических связей кумжи. На хищничество указывают находки кишечных форм нематоды *Raphidascaris acus*, а также наличие в фауне следующих видов: *E. crassum*, *E. salvelini*, *D. dendriticum*, *D. ditrenum*, *Azigia luci*. Однако заражение последними паразитами может быть связано с потреблением зоопланктона. В то же время о том, что в состав кормовой базы входит значительная доля бентоса,

свидетельствует заражение такими видами как *C. truncatus*, *R. denudata*, *C. farionis*, *C. salvelini* и *E. salmonis*.

Таблица 1

Паразитофауна молоди лососевидных рыб

Вид паразита	Кумжа	Сиг	Хариус
<i>Hexamita truttae</i>	-	-	27/+
<i>Chloromyxum schurovi</i>	13/+	-	-
<i>Capriniana piscium</i>	47/0,07	-	-
<i>Apiosoma campanulatum</i>	-	-	27/0,004
<i>A. megamicronucleatum</i>	7/0,002	-	-
<i>Trichodina pediculus</i>	7/0,003	-	-
<i>Trichodinella epizootica</i>	-	13/0,015	7/0,0006
<i>Sciphidia sp.</i>	-	-	7/0,001
<i>Tetraonchus borealis</i>	-	-	50/2,0
<i>Discocotyle sagittata</i>	-	67/7,0	7/0,1
<i>Triaenophorus crassus</i>	-	-	7/0,3
<i>Proteocephalus longicollis</i>	-	93/10,0	-
<i>Crepidostomum farionis</i>	20/0,5	13/0,2	27/0,7
<i>C. metoecus</i>	7/0,1	-	-
<i>Ichthyocotylurus erraticus</i>	7/0,1	64/6,0	7/0,1
<i>Diplostomum spathaceum</i>	7/0,06	-	7/0,1
<i>D. volvens</i>	73/2,1	27/3,0	27/0,3
<i>D. pseudobaueri</i>	7/0,1	-	-
<i>Raphidascaris acus l.</i>	-	13/1,5	60/1,8
<i>Rhabdochona denudata</i>	-	-	7/0,1
<i>Cystidicoloides tenuissima</i>	67/2,0	7/0,1	100/75,0
<i>Capillaria salvelini</i>	33/0,8	-	7/0,1
<i>Echinorhinus salmonis</i>	13/0,8	-	20/0,3
<i>Salmincola coregonorum</i>	-	13/0,3	-
<i>S. extumescens</i>	-	13/0,1	-
<i>S. thymalli</i>	-	-	20/0,3
Всего видов	13	10	17
Вскрыто рыб, экз.	15	15	15

Таблица 2

Паразитофауна лососевидных рыб старших возрастных групп

Вид паразита	Кумжа	Сиг	Хариус
<i>Hexamita truttae</i>	-	-	61/4
<i>Chloromyxum schurovi</i>	47/+	-	-
<i>Ch. thymalli</i>	-	-	5/+
<i>Caprinana piscium</i>	20/0,26	-	44/35,3
<i>Scyphidia sp.</i>	20/0,001	-	-
<i>Ariostoma campanulatum</i>	-	-	6/0,3
<i>A. piscicolum</i>	-	30/0,11	-
<i>Trichodina pediculus</i>	13/0,8	-	-
<i>Trichodinella epizootica</i>	-	-	27/0,3
<i>Tetraonchus borealis</i>	-	-	61/17,0
<i>Gyrodactylus thymalli</i>	-	-	16/1,4
<i>Discocotyle sagittata</i>	20/0,5	25/0,7	61/5,7
<i>Traenophorus nodulosus</i>	-	-	6/0,1
<i>Eubothrium crassum</i>	33/6,3	-	-
<i>E. salvelini</i>	47/14,2	-	-
<i>Cyathocephalus truncatus</i>	7/0,1	-	-
<i>Diphilobothrium dendriticum</i>	7/0,1	19/0,1	-
<i>D. diurenium</i>	7/0,1	-	-
<i>Proteocephalus longicollis</i>	-	56/38,4	-
<i>P. thymalli</i>	-	-	33/0,8
<i>Phyllodistomum conostomum</i>	-	19/1,5	11/0,1
<i>Azigia lucii</i>	13/0,3	-	-
<i>Crepidostomum farionis</i>	20/4,6	6/0,1	39/62
<i>C. metoecus</i>	-	-	11/109
<i>Ichtyocoryllurus erraticus</i>	20/0,5	63/159	6/0,5
<i>Tylodelphus clavata</i>	7/0,1	63/38,0	17/1,1
<i>Diplostomum mergi</i>	-	-	5/0,1
<i>D. paraspathaceum</i>	-	-	5/0,1
<i>D. pseudobaeri</i>	-	25/0,6	33/1,2
<i>D. rutili</i>	-	-	11/0,1
<i>D. spathaceum</i>	-	25/0,4	17/0,1
<i>D. volvens</i>	33/0,6	88/6,1	11/0,1
<i>Rhaphidascaris acus</i>	53/1,9	-	-
<i>R. acus l.</i>	-	88/41	61/11,6
<i>Rhabdahona denudata</i>	7/0,1	6/0,1	-
<i>Cystidicola farionis</i>	33/1,5	63/7,0	61/30,5
<i>Cystidicoides tenuissima</i>	47/1,9	38/2,0	100/321
<i>Desmidocercella numidica</i>	13/0,1	-	-
<i>Comallanus lacustris</i>	13/0,1	6/1,6	-
<i>Capillaria salvelini</i>	40/3,5	38/5,0	28/0,3
<i>Echinorhynchus rutili</i>	-	-	11/0,2
<i>E. salmonis</i>	53/3,9	38/16,0	80/8,2
<i>Salmincola coregonorum</i>	-	13/0,3	-
<i>S. exiensis</i>	-	6/0,1	-
<i>S. extumescens</i>	-	13/0,1	-
<i>S. thymalli</i>	-	-	66/6,2
<i>Argulus coregoni</i>	13/0,1	-	6/0,3
Всего видов.	24	21	29
Вскрыто (экз.).	15	16	18

Малотычинковый сиг *Coregonus lavaretus* L. Паразитофауна сига (2+ - 3+) насчитывает 7 видов: Ciliophora - 1, Monogenea - 1, Cestoda - 1, Trematoda - 1, Nematoda - 1, Crustacea - 2 (табл. 1). Узкоспецифичные виды представлены ракообразными *Salmincola coregonorum* и *S. Extumescens*.

Из специфичных паразитов лососевидных рыб выявлены следующие виды: *Discocotyle sagittata*, *Proteocephalus longicollis*, *Crepidostomum farionis*, *I. erraticus*, *C. tenuissima*. Отмечено 5 видов, развитие которых протекает с участием промежуточных хозяев. Обитание молоди в литоральной зоне способствует заражению нематодой *Raphidascaris acus* l. и метацеркариями рода *Diplostomum*. Инвазия самым массовым паразитом *P. longicollis* l. происходит при питании зоопланктоном, основным кормовым компонентом молоди сига [3].

Фауна паразитов сига старших возрастных групп включает 21 вид (Ciliophora - 1, Monogenea - 1, Cestoda - 2, Trematoda - 7, Nematoda - 6, Acanthocephala - 1, Crustacea - 3) (табл. 2). Так же как в паразитофауне молоди специфичные сиговые виды представлены рачками рода *Salmincola* (*S. coregonorum*, *S. extensus*, *S. extumenscens*). Отмечено 10 видов, характерных для лососевидных (*D. sagittata*, *Diphyllbothrium dendriticum*, *P. longicollis*, *Phyllodistomum conostomum*, *Crepidostomum farionis*, *I. erraticus*, *Cystidicola farionis*, *C. tenuissima*, *C. salvelini*, *E. salmonis*). Остальные виды приурочены к широкому кругу хозяев. Паразитофауна сига старших возрастных групп отличается высоким разнообразием видов со сложным циклом развития (16) и отражает экологию хозяина. О потреблении донных беспозвоночных (личинки насекомых, моллюсков пизидиумов, реликтовых рачков) свидетельствует высокое заражение нематодами *R. acus* l., *Cystidicola farionis* и скребнем *E. salmonis*. При питании бентосом увеличиваются шансы заражения сига активно инвазирующими видами трематод (*I. erraticus*, *Tylodelphys clavata*, *Diplostomum pseudobaeri*, *D. spathaceum*, *D. volvens*). Наличие цестод (*P. longicollis* и *D. dendriticum*) указывает на то, что в составе пищевого рациона малотычинкового сига также присутствуют зоопланктонные организмы.

Хариус *Thymallus thymallus* L. Паразитофауна молоди хариуса включает 17 видов (табл. 1), относящихся к следующим систематическим группам: Mastigophora - 1, Ciliophora - 3, Monogenea - 2, Cestoda - 1, Trematoda - 4, Nematoda - 4, Acanthocephala - 1, Crustacea - 1. Специфичные виды представлены моногенеей *Tetraonchus borealis* и ракообразным *Salmincola thymalli*. В паразитофауне выявлено 7 паразитов (*Hexamita truttae*, *D. sagittata*, *Crepidostomum farionis*, *I. erraticus*, *C. tenuissima*, *C. salvelini*, *E. salmonis*) приуроченных к лососевидным рыбам. Отмечено 8 видов, чье развитие протекает без смены хозяев, и 9

видов, имеющих сложный жизненный цикл.

Характерным для паразитофауны молоди хариуса является преобладание видов, развивающихся через бентосных беспозвоночных, и незначительное заражение видами, связанными в жизненном цикле с зоопланктоном.

Паразитофауна хариуса старших возрастных групп (табл. 2) насчитывает 29 видов: *Mastigophora* – 1, *Myxosporidia* – 1, *Ciliophora* – 3, *Monogenea* – 3, *Cestoda* – 2, *Trematoda* – 11, *Nematoda* – 4, *Acanthocephala* – 2, *Crustacea* – 2. Основу паразитофауны составляют виды со сложным циклом развития – 20. Остальные 9 видов развиваются без смены хозяев. Преимущественно бентосный характер питания хариуса определяет высокое разнообразие и численность паразитов, чьи жизненные циклы протекают с участием донных беспозвоночных (*C. tenuissima*, *R. acus*, *Crepidostomum farionis*, *C. metoecus*). Доминирующим видом является характерная для лососевидных нематода *C. tenuissima* (100/321).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом паразитофауна рыб озерно-речной системы Паанаярви–Оланга [1] является характерной для ультроолиготрофных водоемов, в которых ведущую роль играют лососевидные рыбы. Фауна паразитов лососевидных рыб характеризуется высокой степенью общности, но при этом большая или меньшая приуроченность видов к тому или иному хозяину является результатом эволюционно закрепленных отношений между паразитами и их хозяевами. Основа фауны закладывается уже у молоди в возрасте 3+. Кумжа, сиг и хариус с различной степенью инвазированы видами, формирующими ядро паразитофауны лососевидных рыб. Сформировавшиеся уже у молоди взаимоотношения между паразитами, представленными в ядре, и хозяевами сохраняются у рыб старших возрастных групп. Таким образом, именно стабильность общей структуры позволяет поддерживать целостность паразитофауны лососевого ихтиоценоза исследуемой системы.

Характеризуя эпизоотическое состояние водоемов системы, следует оценить его как благополучное.

Исследования проведены при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами» № ГК 10002-251/ОБН-02/151-433/220503-181.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барская Ю.Ю., Иешко Е.П., Новохацкая О.В., Маланичева Е.М. Фауна паразитов рыб озера Паанаярви//Природа национального парка "Паанаярви". Труды КарНЦ РАН. серия Б."Биология". вып.3, 2003.С. 154–160.
2. Быховская – Павловская И.Е. Паразиты рыб. Руководство по изучению. Л., Наука, 1985. 121с.
3. Первозванский В.Я. Рыбы водоемов района Костомукшского железорудного месторождения (экология, воспроизводство, использование). КарНЦ Рян, Петрозаводск, 1984. 216 с.
4. Широков В.А., Щуров И.Л., Ивантер Д.Э., Гайда Р.В. Хариус реки Оланги (НП «Паанаярви») в условиях лицензионного лова //В иоразнообразии Европейского Севера: теор.основы изуч., социально-правовые аспекты использ. и охраны: Тез. докл. междунар. конф., Петрозаводск). Петрозаводск, 2001. С. 198–199.
5. Шустов Ю.А. Лицензионный лов кумжи в природном национальном парке «Паанаярви» //Пробл. лососевых на Европейском Севере. Петрозаводск, 1998. С. 63–69.
6. Shustov, Y. Prospects for the organization of licensed fishind in the Paanajarvi National Park //Oulanka Reports. 1993. 12. P.133.

PARASITIC FAUNA OF WHITEFISH FISHES OF RESERVOIRS NATIONAL PARK «PAANAYARVI»

Lordly Yu. Yu., Ieshko E.P.

Institute of biology KSC the Russian Academy of Science

Lordly Ю.Ю.: mihrom@onego.ru

The data on parasitic fauna of young fish and the senior age groups of bulltrout *Salmo trutta*, European grayling *Thymallus thymallus* and European whitefish *Coregonus lavaretus* reservoirs of national park Paanajarvi are cited. It is shown, that, the fauna of parasites whitefish fishes is characterized by a high degree of a generality, but thus big or smaller timing of kinds to this or that owner grows out the evolutionary fixed relations between parasites and their owners. The epizootic condition of reservoirs of system is estimated as safe.

ПАЗАРИТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИКРЫ КЕТЫ НА ПАРАТУНСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЛОСОСЁВОМ РЫБОВОДНОМ ЗАВОДЕ

Г.П. Линёва

Камчатский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии (КамчатНИРО),
683000, Петропавловск-Камчатский, ул. Набережная, 18
E-mail: kamniroe@elizovo.kamchatka.ru

Представлены результаты паразитологического исследования инкубируемой икры кеты на Паратунском экспериментальном рыбноводном заводе. Выявлены четыре вида простейших паразитов и грибы рода *Saprolegnia*. Рассмотрены возможные причины заражения и гибели икры.

ВВЕДЕНИЕ

При искусственном воспроизводстве заражению различными патогенными агентами подвергается не только выращиваемая рыба, но и инкубируемая икра. Известны случаи поражения развивающейся икры инфекционными и инвазионными возбудителями на лососёвых рыбноводных заводах Японии [8, 9, 10]. Имеются сообщения о гибели икры форели в 1968 г. в инкубаторном цехе ЦЭС ГосНИОРХ «Роща», где причиной заболевания были колониальные формы *Carchesium polyinum*, которые сплошным слоем покрывали икринки форели, травмировали оболочку, нарушали газообмен и приводили к их гибели [1].

Изучение патогенной микрофлоры икры лосося проводилось в нашей стране в 1987–1989 гг. в рыбопитомнике «Пуца-Водица». С поверхности икры *Salmo gairdneri* и из воды инкубационных аппаратов были выделены 23 вида микромицетов и несколько видов дрожжеподобных грибов, некоторые штаммы которых продуцировали токсины. Поселяясь на погибающей и травмированной икре в большом количестве, грибы выделяли токсические метаболиты, тем самым оказывая вредное воздействие на инкубируемую икру [4].

На Камчатке исследования икры проводили в экспериментальных условиях на ЭГБ КамчатНИРО в 1996–1997 гг. Обследовали икру горбуши, содержащуюся в акватроне (Тип АР-20-Ф-750) с замкнутым циклом водоснабжения и регулируемой температурой воды. В пробах с поверхности оболочки икры были выделены простейшие паразиты

Ichthyobodo necator, *Entamoeba* sp., *Chilodonella piscicola*, *Tetrahymena pyriformis*, *Vorticella* sp. с экстенсивностью заражения каждым паразитом 100%, интенсивностью 10–15 экз., а также гифы грибов рода *Saprolegnia*. На оболочке всех икринок отмечали многочисленные точечные повреждения [2].

В 2000 г. возникла необходимость в проведении исследований развивающейся икры кеты на Паратунском экспериментальном лососёвом рыбоводном заводе (ПЭЛРЗ), показанием к которым стала её гибель в отдельных инкубаторах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для настоящих исследований была развивающаяся икра кеты в количестве 60 экз. (по 30 экз. в каждом отборе). Пробы отбирали и исследовали 9 и 30 октября 2000 г. Сбор паразитов осуществляли методом соскоба с поверхности оболочки икры. Готовили влажные (временные) и окрашенные (постоянные) препараты.

Исследовали паразитов с использованием световых микроскопов марок Olympus BH-2 и МБС-10. При микроскопическом исследовании для подсчета количества простейших паразитов каждый временный препарат просматривали в 25 полях зрения микроскопа при увеличении $\times 100$, а для детального изучения морфологии паразитов — $\times 1000$. Интенсивность количества экземпляров организмов в пробе подсчитывали в каждом из 25 полей зрения микроскопа при увеличении $\times 100$. Если они встречались редко, то их обозначали как единичные (ед.), если часто, то подсчитывали их среднее количество: 1, 2, 3...

Для фиксации, окрашивания и изготовления постоянных препаратов паразитов использовали отечественные и зарубежные методики [3, 7]. Видовую принадлежность паразитов устанавливали с помощью отечественного определителя [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При первом отборе исследовали 30 икринок, из которых 16.7% были с размягченной оболочкой, 13.3% — погибших. Визуально на поверхности икры отмечали налет светло-серого цвета, причем более интенсивный на погибшей икре, чем на живой. У отдельных икринок наблюдали разрушение наружного слоя эпителия и образование эрозивных участков с рыхлыми воспаленными краями. При лег-

ком нажатии пинцетом на такие травмированные икринки происходил выклев личинок. При микроскопии временных влажных препаратов, приготовленных методом соскоба с поверхности икры, были найдены простейшие паразиты: *Ichthyobodo necator* [Syn.: *Costia necatrix* (Henneguy, 1983)], *Entamoeba* sp., *Chilodonella piscicola*, *Tetrahymena pyriformis*; разные стадии развития грибов рода *Saprolegnia* и диатомовые водоросли. Экстенсивность инвазии (э. и.) живой и погибшей икры каждым из вышеперечисленных паразитов составляла 100%, интенсивность инвазии (и. и.) варьировала от единичных до 5 экз. на живой и от 5 до 10 экз. — на погибшей. В исследуемых под микроскопом загрязнениях, присутствующих в воде инкубатора, были также обнаружены вышеперечисленные паразиты, диатомовые водоросли и сапролегниевые грибы на разных стадиях развития.

При повторном отборе проб из этого же инкубатора размягчение оболочки наблюдали у 50% исследуемой икры (из выборки), процент погибшей икры был выше, чем при первом исследовании — 26.7%. Визуально отмечали интенсивный налет как на погибшей, так и на живой икре. При микроскопическом исследовании соскобов с поверхности икры выявлены те же простейшие паразиты, что и при первом отборе, но показатели зараженности ими стали ниже: э. и. — 80%, и. и. — от единичных до 2 экз. В то же время количество сапролегниевых грибов было высоким, возможно, проведенная обработка оказалась недостаточно эффективной для грибов на стадии образования спор.

Выявленные простейшие паразиты *I. necator*, *Entamoeba* sp., *Ch. piscicola*, *T. pyriformis* относятся к группе патогенных. Они могут проникать на рыбоводные заводы с водой, поступающей из водоёмов, и при искусственном выращивании лососей способны значительно увеличивать свою численность и становиться причиной энзоотий, причём воздействие паразитарного фактора может проявиться на различных технологических этапах развития лососей; при этом борьба с ним значительно усложняет процесс воспроизводства. Присутствие вышеуказанных патогенов в инкубаторах на ПЭЛРЗ может быть также связано с переносом их на поверхности оплодотворенной икры после выдерживания ее для набухания в естественном водоеме. Источником распространения простейших паразитов в реке является молдь различных видов рыб. Кроме простейших паразитов и грибов, негативное влияние на икру оказывала и условно-патогенная бактериальная микрофлора (6). Под ее воздей-

ствием происходит потеря давления внутри оболочки икры вследствие образования мелких ямок на ее мембране [10]. В то же время Р. Робертс и К. Шеферд [9] утверждают, что такое состояние икры наступает вследствие избытка аммония в воде. Мы предполагаем, что у инкубируемой икры на ПЭЛРЗ нарушение целостности оболочки, а в дальнейшем гибель или выклев личинок ранее предполагаемого срока происходили в результате комплексного воздействия всех вышеперечисленных патогенных агентов. Влияние этих патогенов при втором обследовании было более продолжительным, чем, вероятно, и объясняется повышенной долей поражённой и погибшей икры в выборке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате паразитологических исследований развивающейся икры кеты на ПЭЛРЗ были выявлены простейшие паразиты: *I. necator*, *Entamoeba* sp., *Ch. piscicola*, *T. pyriformis*, а также диатомовые водоросли и грибы рода *Saprolegnia* на разных стадиях развития. Под воздействием различных патогенных агентов происходило нарушение целостности оболочки икры и гибель эмбрионов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Банина Н.Н., Куденцова П.А., Брагина Е.В. Эпистилезы и некоторые другие случаи массового поражения перитрихами рыб и икры // Изв. ГосНИОРХ. Л.: 1977. Т. 119. С. 107-109.
2. Карманова И.В. Паразиты тихоокеанских лососей в эпизоотической обстановке паразитозов в бассейне р. Паратунки (Камчатка). Автореф. дис. ... канд. биол. наук / ИНПА РАН. Петропавловск-Камчатский, 1998. 23 с.
3. Лабораторный практикум по болезням рыб. Под ред. В.А. Мусселиус. М.: Легк. и пищ. пром-сть, 1983. 296 с.
4. Нагорная С.С., Исаева Н.М., Игнатова Е.Н. Изучение патогенной и условно-патогенной микрофлоры икры лосося // Тез. док. IX Всесоюзное совещание по паразитам и болезням рыб. Л.: 1990. С. 92-93.
5. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Паразитические простейшие/ Под ред. О.Н. Бауера. Л.: Наука, 1984. Т. 1. 431 с.
6. Устименко Е.А., Сергеев Н.В. Эпизоотическая ситуация на Паратунском экспериментальном лососевом рыбо-

разводном заводе (Камчатка) // Тез. док. регион. конф. по актуальным проблемам экологии, биологии и биотехнологии. Владивосток: Изд-во Дальневост. Ун-та. 2001. С. 120-121.

7. Blue book. Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. Ed. J.C. Thoesen // 4th ed. Ver. I. Fish Health Sec. Am. Fish. Soc. 1994. 294 p.

8. Duijn C. Soft egg disease and white spot disease of Fish eggs // Diseases of Fishes. Iliffe Books, London. 1973. P. 311.

9. Roberts, R., and C. Shepherd. A disease of eggs. In Handbook of Trout and Salmon Disease. England, 1974. P. 81-82.

10. Takeda S. Study of chum salmo egg disease in the Nishibetsu River. Keison Iho, 1929. P. 1-4.

PARASITOLOGICAL RESEARCHES OF KETA CAVIAR ON THE PARATUNCKIY EXPERIMENTAL SALMON FISH-BREEDING FACTORY

G.P.Linyova

*The Kamchatka scientific research institute of a fish
facilities and oceanography (KSRIFFO),*

E-mail: kamniroq@elizovo.kamchatka.ru

Results of parasitological researches of incubated keta caviar on an Paratunckiy experimental fish-breeding factory are submitted. Four kinds of the elementary parasites and mushrooms of sort *Saprolegnia* are revealed. The probable reasons of infection and destruction of caviar are considered.

УДК 597-12:576.169

МИКРОСПОРИДИЯ *PLEISTOPHORA SP.* У ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ И МОЛОДИ ТИХООКЕАНСКИХ ЛОСОСЕЙ НА РЫБОВОДНЫХ ЗАВОДАХ КАМЧАТКИ

Г.П. Линева, С.А. Корнеева, Т.В. Гаврюсева

*Камчатский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии (КамчатНИРО),
683000, Петропавловск-Камчатский, ул. Набережная, 18*

E-mail: kamniroq@elizovo.kamchatka.ru

Проанализированы данные паразитологических и гистологических исследований половозрелых тихоокеанских лососей (кеты, нерки, чавычи, кижуча), используемых для воспроизводства на лососевых рыболовных заводах Камчатки, и искусственно выращиваемой мо-

лоди, в результате которых выявлена микроспоридия *Pleistophora* sp. Приведены показатели зараженности рыб этим паразитом в 2000–2002 гг.

ВВЕДЕНИЕ

Микроспоридии — облигатные внутриклеточные паразитические простейшие, вызывающие опасные заболевания у рыб [1]. Микроспоридиоз может протекать в хронической форме с поражением отдельных клеток или в острой форме с инвазией многих клеток пораженного органа. Гибель от этого заболевания чаще всего наблюдается среди молоди рыб, особенно при ее искусственном разведении. Так как заражение микроспоридиями может происходить не только алиментарным, но трансвариальным и псевдотрансвариальным путями [4], необходимо проводить исследования, направленные на выявление микроспоридий, как у искусственно выращиваемой молоди, так и у половозрелых рыб, используемых для воспроизводства.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследований служили паразитологические и гистологические сборы, проведенные в течение 2000–2002 гг. Пробы отбирали от производителей, используемых для искусственного воспроизводства, и выращиваемой молоди тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus*: кеты (*O. keta*), нерки (*O. nerka*), чавычи (*O. tshawytscha*) и кижуча (*O. kisutch*) на 5 лососевых рыбодных заводах (ЛРЗ) Камчатки: Паратунском экспериментальном (ПЭЛРЗ), Кеткино (КЛРЗ), Малкинском (МЛРЗ), Озерки (ОЛРЗ) и Виллюйском (ВЛРЗ), расположенных в бассейнах рек: Паратунка, Авача и Большая.

Общепринятым методом полного паразитологического вскрытия обследовали 2569 экз. рыб, из них: половозрелых — 267, заводской молоди — 2302 экз. У клинически здоровых рыб с целью обнаружения микроспоридий проводили микроскопическое исследование отпечатков печени и почки, а у больных рыб — и органов с патологией. Для фиксации, окрашивания и изготовления постоянных препаратов паразитов использовали отечественные методики [5]. Изучение и фотографирование полученных препаратов проводили, используя световой микроскоп марки Olympus BH-2. Видовую принадлежность паразитов устанавливали с помощью отече-

ственного определителя [6]. Статистическую обработку проводили по методу В.А. Ройтмана и А.А. Лобанова [7].

Параллельно паразитологическим исследованиям отбирали пробы для гистологического анализа от 140 экз. половозрелых рыб и от 684 экз. заводской молоди. Исследовали кожу, жабры, почку, печень, желчный и плавательный пузыри, сердце, селезенку, пищевод, желудок, кишечник, головной мозг, скелетную мускулатуру и хрящевую ткань. Пробы фиксировали в 10% буферном растворе формалина и в жидкости Дэвидсона. Препараты окрашивали гематоксилин-эозином и по Романовскому-Гимза. Строение исследуемых тканей сравнивали с Атласом микроскопической анатомии тканей лососевых [12], Гистологическим атласом нормальной структуры лососевых [9], Атласом болезней лососевых [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований у половозрелых рыб и искусственно выращиваемой молоди выявлены различные стадии развития микроспоридий (плазмодии на разных стадиях развития, панспоробласты и споры) рода *Pleistophora*.

Паразитологическими и гистологическими методами *Pleistophora sp.* обнаружена у половозрелых лососей: в 2000 г. — у кеты из р. Авача (ЛРЗ Кеткино) с экстенсивностью инвазии (э. и.) — 6.67%; в 2000–2001 гг. — у кеты из р. Большая (ЛРЗ Озерки) с э. и. — 33.33 и 20.0% соответственно; в 2000–2002 гг. — у чавычи из р. Большая (Малкинский ЛРЗ) с э. и. — 10.0; 13.33 и 6.67% соответственно; в 2001–2002 гг. — у кеты из р. Паратунка (Виллойский и Паратунский ЛРЗ) с э. и. — 6.67% в обоих случаях. Средняя интенсивность заражения всегда была невысокой. Значения показателей доверительного интервала варьировали от 0.0–24.6 до 12.2–58.8. Панспоробласты имели округлую форму, плотную оболочку и содержали 16 и более спор. Средний диаметр панспоробласта 43.3 ± 2.5 мкм (Рис. 1). Зрелые споры овальной формы, размером 2.1–3.8 x 2.6–4.5 мкм.

У всех инвазированных рыб не наблюдали явно выраженных клинических признаков заболевания. Но так как этот вид паразита был обнаружен у производителей, используемых для воспроизводства на ЛРЗ, возможно, в дальнейшем он способен оказывать патогенное воздействие как на икру, так и на мальков. Паразитологическими методами микроспоридия *Pleistophora sp.* у искусственно выращиваемой молоди не обнаружена. Однако в результате гистологи-

ческих исследований, направленных на детальное изучение состояния органов и тканей рыб, у заводских сеголеток выявлены ранние спорогональные стадии развития микроспоридии *Pleistophora sp.* Присутствие этого паразита отмечали в 2001 г. — у нерки и у чавычи на МЛРЗ (20.0% рыб из выборки), у кеты на ПЭЛРЗ и ВЛРЗ (10.0%), у кижуча на ПЭЛРЗ (10.0%), в 2002 г. — у кеты на ПЭЛРЗ (10.0%). Микроспоридия обнаружена в разных органах и тканях: печени, желчном пузыре, экзокринной части поджелудочной ткани (Рис. 2), циркулярном мышечном слое желудка и кишечника, соединительно-тканной прослойке миомеров скелетной мускулатуры, просвете почечных канальцев. При этом отмечали очаговый некроз, плазмодио цилиндрического эпителия и некроз миоцитов желчного пузыря, плазмо- и цитоллиз гепатоцитов.

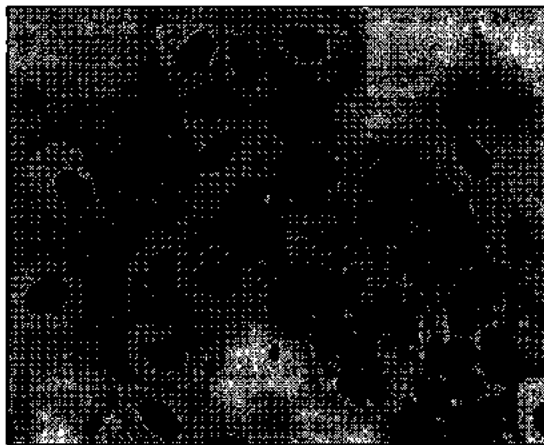


Рис. 1. Панспоробласты *Pleistophora sp.* (*Microsporidea*) в почке у половозрелой кеты. Окраска по Гимза. Увеличение $\times 1000$.

Необходимо отметить, что заражению *Pleistophora sp.* подвергались в основном ослабленные особи, у которых отмечали гистопатологические изменения в различных органах. Так, в 2001 г. на всех заводах было выявлено наибольшее количество рыб, зараженных микроспоридией. Возможно, причиной повышенной зараженности этим паразитом явилось снижение резистентности организма рыб в результате алиментарного токсикоза, вызванного использованием кормов, контаминированными бактериями и дрожжеподобными грибами. При этом в желудочно-кишечном тракте, почке, печени и жабрах отмечали деструктивные изменения [8].



Рис. 2. Плазмодии *Pleistophora sp.* в очаге некроза экзокринной части поджелудочной ткани у сеголетка кеты. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 1000$

По литературным данным, заражение микроспоридией может происходить различными путями: алиментарным, трансвариальным и псевдотрансвариальным [4]. Мы предполагаем, что заражение молоди на камчатских ЛРЗ происходило алиментарным путём через воду, поступающую на заводы из естественных водоемов. В отдельные годы микроспоридии были выявлены у рыб-производителей, а позднее и у их потомства, поэтому нельзя исключать и другие пути проникновения. Так, в 2000 г. *Pleistophora sp.* была обнаружена у производителей: кеты из р. Авача (КЛРЗ) и у чавычи из р. Большая (МЛРЗ), а в 2001 г. — у молоди этих же видов рыб на данных заводах.

По мнению многих авторов [2; 3; 4; 11], температура воды является основным фактором, влияющим на экстенсивность и интенсивность инвазии: температура ниже 15.0°C не препятствует заражению, но сдерживает развитие микроспоридиоза у рыб. На лососевых рыбоводных заводах Камчатки температура воды в бассейнах колеблется от 3.0 до 8.0°C . Вероятно, низкие температуры препятствуют развитию заболевания, но, несмотря на это, возможен риск возникновения микроспоридиоза. Поэтому на рыбоводных заводах необходим постоянный контроль за состоянием здоровья искусственно выращиваемой молоди.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате паразитологических и гистологических исследований половозрелых рыб и искусственно выращиваемой молоди была выявлена микроспоридия рода *Pleistophora* на разных стадиях развития. Экстенсивность инвазии варьировала от 6,67 до 33,33% в зависимости от вида рыб, интенсивность заражения во всех случаях была невысокой. У половозрелых рыб не отмечали клинических признаков заболевания. Развитию микроспоридиоза у заводской молоди лососей препятствовала низкая температура воды в бассейнах, однако необходим постоянный контроль за зараженностью рыб этим паразитом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бауэр О.Н., Мирзоева Л.М. Инвазионные заболевания лососевых, их профилактика и терапия: Обзорная информация // Тр. ЦНИИТЭИРХ. Сер. Рыбохоз. исп. внутр. вод. 1984. Вып. 12. С. 1–64.

2. Воронин В.Н. Микроспоридии пресноводных беспозвоночных и рыб России. Автореф. дис. ... докт. биол. наук / СПб., 1999. 47 с.

3. Вялова Г.П., Воронин В.Н. Микроспоридиоз лососевых Сахалина: распространение и динамика зараженности // Паразитология. Л.: Наука. 1987. Т. 21. С. 553–557.

4. Исси И.В. Микроспоридии // Протозоология. Л.: Наука. 1986. № 10. 188 с.

5. Лабораторный практикум по болезням рыб. Под ред. В.А. Мусселиус // М.: Легк. и пищ. пром-сть, 1983. 296 с.

6. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Паразитические простейшие. Под ред. О.Н. Бауэра. Л.: Наука, 1984. Т. 1. 431 с.

7. Ройтман В.А., Лобанов А.А. Метод оценки численности гемипопуляций паразитов в популяции хозяина // Исследования по морфологии, таксономии и биологии гельминтов птиц. Тр. Гельминтол. лаб. АН СССР. 1985. Т. 33. С. 102–123.

8. Устименко Е.А., Гаврюсева Т.В., Сергеенко Н.В. Признаки алиментарного токсикоза у молоди тихоокеанских лососей на рыбоводных заводах Камчатки // Экологические и социально-экономические проблемы Камчатки. Мат. науч.-техн. конф. Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2003. С. 21–32.

9. Amin, A., L. Mortensen, and T. Poppe. Histology atlas normal structure of Salmonids // Akvapatologisk Labor. AS BODЖ - Norway. 1992. 222 p.

10. Bruno, D., and T. Poppe. A colour atlas of Salmonid diseases // Harcourt Brace and Co. Publ. 1996. 186 p.

11. Caning, E., J. Lom, I. Dykova The Microsporidia of Vertebrates // Academic press INC. (London) L.T.D. 1986. 289 p.

12. Yasutake, W., and J. Wales. Microscopic anatomy of salmonids: An Atlas // U.S. Dep. inter. Fish and Wild. Ser. Washington. 1983. 190 p.

MICROSPORIDIA PLEISTOPHORA SP. AT SIRES AND YOUNG FISH OF PACIFIC SALMONS AT FISH-BREEDING FACTORIES OF KAMCHATKA

G.P.Lineva, S.A.Korneeva, T.V.Gavrjuseva

The Kamchatka scientific research institute of a fish facilities and oceanography (KamchaSRIFFO),

E-mail: kamniroe@elizovo.kamchatka.ru

The data are analysed parasitological and histologic researches of pubescent Pacific salmon (a keta, a kokanee, a chonook, a coho), used for reproduction at salmon fish-breeding factories of Kamchatka, and is artificial growing young fish as a result of which it is revealed microsporidia *Pleistophora sp.* Parameters of contamination of fishes by this parasite in 2000-2002 are given.

УДК 597-12+597-169:639.311

МОНИТОРИНГ ПАРАЗИТОВ, ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫХ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА, У ПРОМЫСЛОВЫХ РЫБ АЗОВСКОГО БАСЕЙНА

Шестаковская Е.В.* , Стрижакова Т.В* , Казарникова А.В.* ,

Подзорова А.А.* , Низова Г.А. , Безгачина Т.В.*****

*** РосрыбНИИпроект, ** АзНИИРХ, ***ВНИРО**

В работе представлены данные о зараженности 8 видов промысловых рыб Азовского бассейна паразитами, потенциально опасными для здоровья человека. К ним отнесены личинки круглых червей *Eustrongylides excisus*, метацеркарии трематод *Aporhallus muehlengi* и *Paracoenogonimus ovatus*.

Отмечено, что в исследованном материале на первом месте по числу заражаемых видов рыб стоит *E. excisus*. В насто-

ящее время основными носителями этого паразита являются бычки – кругляк и сирман. Накопленные в лаборатории материалы показывают наличие тенденции роста экстенсивности инвазии *E. excisus* от весны к осени.

ВВЕДЕНИЕ

В списке паразитов, которые представляют опасность для здоровья человека и передаются через рыб, числится по одним источникам около 20 видов [1] по другим - 28 [3]. Последняя цифра исходит, согласно вышеуказанной публикации, из нормативных актов по профилактике паразитарных болезней, действующих на территории Российской Федерации. Но и она в дальнейшем может быть скорректирована, так как, согласно литературным данным [3], только в Каспийском регионе известно 30 видов, способных заразить человека в результате потребления рыбы. Как указывают авторы, это неспецифичные для человека паразиты, но именно поэтому они оказываются наиболее опасными, а вызываемые ими заболевания труднее выявляются и поддаются диагностированию.

Из найденных нами в водоемах Азовского бассейна паразитов к числу потенциально опасных для здоровья человека относятся три вида: *Eustrongylides excisus* (Nematoda, Dioctophymidae), *Paracaenogonimus ovatus* (Trematoda, Prohemistomatidae), *Apophallus muehlingi* (Trematoda, Heterophyidae), паразитирующие в рыбах на стадии личинки.

Изучению ареала, сезонной динамики и жизненного цикла этих видов паразитов посвящены работы В.Б.Дубинина [4], Е.М.Кармановой [7], Н.Н.Семеновой., В.М.Иванова [18], В.М.Иванова, Н.Н.Семеновой [6], В.М.Иванова [5], Г.А.Низовой, Н.И.Сыроватки [11], Г.И.Сапожникова [16], Д.А.Размашкина В.Я.Ширшова [15], Л.В.Ларцевой [9], Л.В.Ларцевой и др. [10], Г.И.Сапожникова и др. [17], R.A. Cole [19] и др.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Паразитологический мониторинг азовских промысловых рыб проводится с 1996г., с перерывами в отдельные годы. В 2003 г. 1200 экз. рыб (судак, лещ, рыбец, чехонь, язь, бычки – кругляк и сирман, тюлька) из Азовского моря, Таганрогского залива, Миусского лимана, р. Дон было обследовано методами клинического осмотра, полного и не-

полного паразитологического вскрытия.

Вскрытие рыб, сбор, фиксацию и дальнейшую обработку паразитов проводили по общепринятым [2, 8], а также специальными методикам [14].

Личинок трематод фиксировали и окрашивали уксусно – кислым кармином с последующим обезвоживанием в спиртах и заключением в бальзам.

Для фиксации и хранения крупных нематод использовали жидкость Барбагалло с последующим осветлением в смеси глицерина и молочной кислоты. Из мелких нематод готовились глицерин – желатиновые препараты.

Систематическую принадлежность паразитов устанавливали по «Определителю паразитов позвоночных Черного и Азовского морей» [12] и «Определителю паразитов пресноводных рыб» [13].

У рыб, обследовавшихся методами полного и неполного паразитологического вскрытия, снимали морфометрические показатели, определяли пол и примерный возраст.

Для определения уровня зараженности рыб паразитами обсчитывались экстенсивность инвазии, средняя интенсивность заражения. Интенсивность инвазии рыб метацеркариями *P. ovatus*, локализующимися в мышцах спины, определяли в пересчете на 1 г мышечной ткани.

СОДЕРЖАНИЕ И РЕЗУЛЬТАТЫ.

В материале 2003 г., включавшем 8 видов рыб, *E. excisus* стоит на первом месте по числу заражаемых им видов, далее следуют *A. muehlingi* и *P. ovatus* (табл. 1).

Таблица 1
Виды рыб, зараженные паразитами, потенциально опасными для здоровья человека (по материалам 2003г.)

Виды рыб	Вид паразита		
	<i>Eustrongylides excisus</i>	<i>Apophallus muehlingi</i>	<i>Paracoenogonimus ovatus</i>
судак	+	-	-
лещ	+	+	+
рыбец	-	+	-
язь	+	-	-
чехонь	-	+	-
бычок-кругляк	+	-	-
бычок-сирман	+	-	-
тюлька	-	+	-

Одними из основных носителей инвазии *E. excisus* в Таганрогском заливе являются бычки - кругляк и сирман, экстенсивность инвазии которых в 2003 г. составляла соответственно 80 и 100 %. Среднее количество червей на 1 рыбу в обследованных выборках составляло 14,5 экз., тогда как у отдельных особей хозяина этот показатель исчислялся десятками паразитов.

Структура заражения популяции судака *E. excisus*, судя по накопленным материалам, носит сложный характер. Разным возрастным группам судака присущ свой уровень инвазии.

В апрельской выборке половозрелого судака из восточной придельтовой зоны Таганрогского залива насчитывалось 50 % зараженных зустронгилидами особей при интенсивности 1 – 2 экз. Показатель экстенсивности заражения молоди (1-2 года) в это же время в указанном районе был значительно ниже – около 20 % - при тех же значениях интенсивности, что и у взрослых рыб (1-2 экз.).

Октябрьская выборка судака из центральной части Таганрогского залива состояла из разновозрастных особей. Показатель экстенсивности инвазии *E. excisus* выборки в целом отличался от весеннего в несколько раз и составлял всего 8,3 %. Такое снижение могло быть обусловлено преобладанием в обследованном материале молодых судаков.

Для выяснения степени влияния на показатель экстенсивности инвазии (ЭИ) возраста судаков все рыбы были условно разбиты на три размерные группы:

1. $l = 34,0 - 44,0$ см ($l_{cp} - 38,45$ см) – особи с определившимся полом;

2. $l = 28,5 - 31,5$ см ($l_{cp} - 30$ см) – ювенильные особи;

3. $l = 17,5 - 20,5$ см ($l_{cp} - 18,7$ см) – сеголетки.

Все зараженные зустронгилидами особи оказались в 1-ой группе, экстенсивность инвазии её составила 20 % при интенсивности - 1 экз. Рыбы 2-ой и 3-й группы оказались свободными от паразита.

Таким образом, среди половозрелых особей судака как в восточной, так и в центральной частях залива зараженные *E. excisus* рыбы встречаются чаще, нежели среди молодых.

Экстенсивность инвазии судака *E. excisus* в придельтовом участке залива выше, чем в центральном: среди половозрелых рыб она составляла - 50 % против - 20 %, среди молоди - 20 % против - 0%.

В сезонной динамике зараженности отдельных возрастных групп судака *E. excisus*, согласно данным ряда преды-

дущих лет, прослеживается тенденция роста экстенсивности инвазии от весны к осени. Это видно на материале 1996 г. по двух – трехлеткам судака из восточной части Таганрогского залива. Так, в июле указанного года экстенсивность инвазии составляла 10 % при средней интенсивности 1 экз.; в сентябре она возросла до 14, 9 % (при той же средней интенсивности), в октябре – ноябре значение этого показателя увеличилось до 42,9 %, а средняя интенсивность инвазии – до 3,8 экз.

У взрослого судака наблюдали несколько иную сезонную динамику. По данным 1997 г., весной судак промыслового размера был заражен на 30% при средней интенсивности инвазии 4 экз., в июле носителей зустронгилид в обследованной выборке было 12 % (средняя интенсивность - 1 экз.), к осени (сентябрь – октябрь) эта цифра возросла до 36,4 % (средняя интенсивность - 1,7 экз.). Повышенные показатели экстенсивности инвазии половозрелого судака весной были связаны с его нерестовым ходом и в связи с этим с концентрацией в придельтовом районе Таганрогского залива. Осенний рост уровня инвазии – результат подзаражения рыб на мелководных прогреваемых участках нерестилищ или лежащих к ним участках.

Уровень зараженности леща *E. excisus* в 2003 г. был заметно ниже такового судака. Так, майская выборка леща из нижнего участка дельты р. Дон была заражена на 4,76 % при интенсивности 1 экз. Рыбы октябрьской выборки из Миусского лимана были свободны от паразитов.

Следующий паразит, представляющий потенциальную опасность для здоровья человека, обнаруженный в 2003 г. у азовских промысловых рыб, – метацеркарии *Arophallus muehlingi*. Паразит обнаруживался в виде мелких слабопигментированных цист на плавниках, жаберных крышках, голове.

Заражению подвергаются главным образом молодые рыбы. В нашем материале наиболее высокий процент заражения имели карповые рыбы. Так, годовики леща были инвазированы на 50 %, двухлетки – на 70 % при средней интенсивности инвазии 22,4 и 10,4 экз. соответственно. Примерно тот же уровень заражения имели и двухлетки рыбца: 60 % со средней интенсивностью 28,0 экз. У чехони приведенные выше показатели заметно ниже - 13,2. % и 8,0 экз. У тюльки цисты паразита встречались единично.

Промежуточными хозяевами *A. muehlingi* являются реофильные моллюски рода *Lithoglyphus*. Они обеспечивают

высокий уровень зараженности рыб метацеркариями в речной период жизни, который у молоди проходных и полупроходных рыб может длиться до 2-х лет.

Parascogenimus ovatus – третий вид потенциальных возбудителей паразитозов человека, передающихся к последнему от рыбы.

Метацеркарии паразита были обнаружены в мышцах спины леща и находились в прозрачных двуслойных гиалиновых цистах.

Уровень заражения леща значительно отличался в зависимости от места сбора материала. В дельте р. Дон в мае отмечена высокая экстенсивность инвазии – 73,3 %, чего нельзя сказать о показателях интенсивности. Они варьировали в пределах 0,15 – 8,3 экз./г мышц, составляя в среднем 2,67 экз./г мышц. Выборка леща, обследованная из Миусского лимана осенью (в конце октября), была заражена на 20 %, т.е. более чем в 3,5 раза слабее весенней. Уровень интенсивности был также заметно ниже, колеблясь в пределах 0,09 – 1,79 экз./г мышц и в среднем составляя 0,67 экз./г мышц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 2003г. проведено обследование 8 видов азовских промысловых рыб с целью выявления у них возбудителей гельминтозов человека, передающихся через рыбу (Рис.).

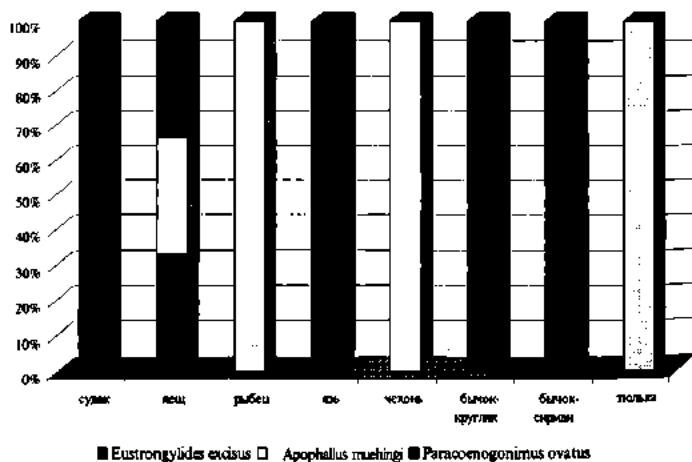


Рис. Виды рыб, зараженные паразитами, потенциально опасными для здоровья человека (по материалам 2003 г)

Обнаружено 3 вида паразитов, потенциально опасных для здоровья человека. Это - личинки круглых червей *Eustrongylides excisus* и метацеркарии двух видов трематод - *Apophallus muehlingi* и *Paracoenogonimus ovatus*. По числу зараженных видов рыб паразиты выстраиваются в следующий ряд: *E. excisus* (5 видов), *A. muehlingi* (4 вида), *P. ovatus* (1 вид).

Показатели зараженности обследованных видов рыб варьируют в широких пределах: эустронгилидами от 0 до 100 %, апофаллюсами от 0 до 70 %, параценогонимусами от 0 до 73,3 %.

В настоящее время основными носителями инвазии *E. excisus* среди обследованных видов рыб являются бычки - кругляк (ЭИ - 80%) и сирман (ЭИ - 100%). Зараженность судака и леща, традиционно составляющих основу промысла в Таганрогском заливе, в настоящее время снизилась, по сравнению с 1996 г. В то время при весеннем промысле в р. Дон судак был заражен эустронгилидами на 80 %, а у леща в Таганрогском заливе этот показатель доходил до 30 %. Снижение уровня зараженности, видимо, связано с омоложением стада названных видов рыб и снижением общей численности промысловой части популяции.

В сезонной динамике заражения судака *E. excisus* прослеживается тенденция роста экстенсивности инвазии от весны к осени. Носители возбудителя эустронгилидоза чаще встречаются среди половозрелых рыб, нежели среди молодых.

A. muehlingi, судя по уровню заражения молодой части популяций леща и рыбца, может быть важным фактором, снижающим их численность в очагах апофаллеза.

Очаги параценогонимоза в обследованных районах Таганрогского залива, на наш взгляд, еще не сформированы, т.к. интенсивность инвазии леща *P. ovatus* была в десятки раз ниже регистрируемой, согласно литературным данным (Вьюшкова, Проскурина, 2000; Сапожников и др., 2003), в очагах этого заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Безр С.А. Гельминтозы, передаваемые через рыб// Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре: Сб. тез. докл. науч.-практ. конф., 21-22 ноября 2000 г. М., 2000. С. 28-30.
2. Быховская - Павловская И.Е. Паразиты рыб: Руководство по изучению. Л.: Наука, Ленинградск. отд., 1985. 121с.

3. Вьюшкова Л.А., Проскура В.В. Опасные для человека паразиты промысловых рыб дельты Волги. // Рыбоводство и рыболовство. 2000. № 4. С. 29-30.

4. Дубинин В.Б. Экспериментальные исследования над циклами развития некоторых паразитических червей животных дельты Волги // Паразитол. сб. ЗИН АН СССР. Л., 1949. №.1. С.126-160.

5. Иванов В.М. К вопросу о возникновении очагов заболеваний рыб // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре: Сб. тез. докл. науч.-практич. конф., 21 – 22 ноября 2000 г. М., 2000. С. 65 – 66.

6. Иванов В.М. Семенова Н.Н. Патогенное влияние церкарий *Aporhallus muehlingi* (Trematoda, Heterophyidae) на рыб // Вопросы рыболовства. 2000. Т. 1. № 2-3. С. 144-145.

7. Карманова Е.М. Некоторые особенности биологии нематод отряда *Diostorhymida* // Паразиты человека, животных и растений и меры борьбы с ними. М: Наука, 1968. С. 193-199.

8. Лабораторный практикум по болезням рыб / под ред. В.А. Мусселиус. М: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 296 с.

9. Ларцева Л.В. Состояние, проблемы и перспективы ихтиопатологических исследований в Волго-Каспийском регионе // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Сб. тез. докл. Всероссийск. Науч.-практич. конф., Борок, 16-18 июля 2003г. М., 2003. С. 70 – 72.

10. Ларцева Л.В., Проскура В.В., Евдокимова М.И., Постнова В.Ф. Паразиты рыб Волго – Каспийского региона – возбудители заболеваний человека и животных // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Сб. тез. докл. Всеросс. науч. – практич. конф., Борок, 16-18 июля 2003г. М., 2003. С. 74-76.

11. Низова Г. А., Сыроватка Н.И. Паразиты и инвазионные болезни рыб Нижнего Дона. // Пресноводная аквакультура в Центральной и Восточной Европе, достижения и перспективы: Мат. междунар. науч. – практич. конф. Киев, 2000. С. 337 – 340.

12. Определитель паразитов позвоночных Черного Азовского морей. Отв. Ред. В.Н. Грезе. Киев: Наукова думка, 1975. 552с.

13. Определитель паразитов пресноводных рыб / под ред. О.Н. Бауера. Л.: Наука, Ленинград отд., 1987. Т. 3. Ч. 2. 583с.

14. Профилактика паразитарных болезней на территории РФ. Сан ПиН 15-6/44. М., 1990. С. 21.

15. Размашкин Д.А., Ширшов В.Я. О зараженности мышц карповых рыб метацеркариями в бассейнах рек Волги и Дона на территории Волгоградской области // Проблемы икhtiопаразитологии и икhtiопатологии в современных условиях (к 70 - летию создания лаборатории болезней рыб ГосНИОРХ): Сб. науч. трудов ГосНИОРХ. С.-Пб: ГосНИОРХ, 2001. Вып. 329. С. 92 - 109.

16. Сапожников Г.И. О некоторых возбудителях трематодозов, паразитирующих у рыб, млекопитающих и птиц. // Сб. тез. докл. науч.-практич. конф., 21-22 ноября 2000. М., 2000. С. 65 - 66.

17. Сапожников Г.И., Кушалиева А.Д., Емельянова Е.А. Параценогонимоз рыб: ветеринарно-санитарная экспертиза. // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Сб. тез. докл. Всероссийск. науч.- практич. конф., Борок, 16-18 июля 2003г. М., 2003. С. 113-114.

18. Семенова Н.Н., Иванов В.М. Чайковые птицы как распространители апофаллезных рыб в дельте Волги и Северном Каспии. // Тез. докл. научн. конф. «Гельминтология сегодня: проблемы и перспективы». М., 1989. Т.2. С. 95 - 96.

19. Cole R.A. Eustrongylidosis. Field Manual: Journal of Wildlife Diseases. Birds. Chapter 2003. 29. P. 223 - 228.

MONITORING OF THE PARASITES POTENTIALLY DANGEROUS FOR HEALTH OF THE PERSON, AT FOOD FISHES OF THE AZOV POOL

Shestakovskaya E.V. *, Strizhakova T.V. *, Kazarnikova A.V. *, Podzorova A.A. *, Nizova G.A. **, Bezgachina T.V. ***

In work the data on contamination of 8 kinds of food fishes of the Azov pool are submitted by the parasites potentially dangerous to health of the person. To them are referred личинки round worms *Eustrongylides excisus*, metacercaries of trematodes *Apophallus muehlingi* and *Paracoenogonimus ovatus*.

It is marked, that in the investigated material on the first place on number of infected kinds of fishes costs(stands) *E. excisus*. Now the basic carriers of this parasite are бычки - кругляк and сирман. The materials saved up in laboratory show presence of the tendency of growth of extensiveness инвазии *E. excisus* from spring to an autumn.

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА

В.К. Голованов

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н

На основе литературных и собственных данных проведена оценка значимости температурного фактора в выживаемости рыб после инфицирования широко распространенными заболеваниями – инфекционными, инвазионными, гельминтозами и другими. Выявлены оптимальные температуры инфицирования у карповых, лососевых, осетровых и окуневых видов рыб и сезонный характер протекания болезней. Предлагается использовать несовпадение температурных оптимумов жизнедеятельности у рыб и возбудителей их инфекций для лечения, оздоровления и профилактики заболевания рыб. Одним из способов ослабления развития инфекции и успешного выживания рыб является применение реакции поведенческой лихорадки в гетеротермальных условиях среды. Подчеркивается необходимость учета экологической специфики и температурных норм жизнедеятельности, как рыб, так и возбудителей их инфекций в каждом конкретном случае заболевания.

Существует большое количество способов оздоровления, профилактики и лечения рыб, позволяющих свести к минимуму число заболевших особей, как в условиях прудового рыбоводства, так и при выращивании рыб в садках, бассейнах и других устройствах. Вместе с тем роль абиотических факторов среды, в особенности температуры, как одного из основных, определяющих эффективность воспроизводства, роста и питания, при оценке возможности заболевания животных или их лечения, исследована явно недостаточно. Относительно редки работы, в которых сравниваются температурные оптимумы рыб и возбудителей их болезней. Слабо исследовано явление так называемой “поведенческой лихорадки”, при которой заболевшая молодь рыб в условиях термоградиента выбирает более высокие температурные зоны в сравнении с оптимальными, и таким образом выживает после инокуляции возбудителя. Практически не проводится сопоставления различных поведенческих реакции и физиолого-биохимического статуса заболевших и выздоравливающих рыб различной экологии, обита-

ющих в среде с неодинаковыми температурными условиями. Температуре как экологическому фактору в жизнедеятельности рыб, обитающих в естественных условиях и используемых в аквакультуре, в последнее время придается особое значение ввиду возможного потепления климата Земли [6, 12]. Исследования последних лет, связанные с получением экспериментальных и полевых данных, характеризующих температурные нормы жизнедеятельности рыб — их оптимальные и летальные температуры [1, 5, 9, 20], позволяют переоценить значимость температуры для оздоровления, профилактики и лечения рыб.

С целью оценки роли температурного фактора в выживаемости рыб после инфицирования нами на основе литературных и собственных данных предпринята попытка анализа ряда широко распространенных заболеваний — инфекционных (вирусных, бактериальных, микозов), инвазионных (ихтиофтириоза, хилодонеллеза, триходиноза), гельминтозов (гиродактилеза, дактилогироза, нитцшиоза, диплостомоза, сангвиникоз, лигулидоза), crustaceozов (лернеоза) и некоторых других [2—4, 11, 3—15, 17—19, 21, 22, 24, 26].

Выявлено, что инфекции, вызываемые различными видами возбудителей, проявляются у рыб как в узком, так и в широком интервале температур среды обитания. Оптимальная зона действия и развития возбудителя у лососевых, осетровых, окуневых и карповых видов рыб широко варьирует — от 5—10°C при хилодонеллезе, до 5—40°C при сапролегниозе и 18—25°C при аэромонозе и вибриозе [11, 18]. Приуроченность наиболее эффективного действия различных видов возбудителей к температурам от 10—15 до 30°C приводит к ярко выраженному сезонному характеру заболевания, когда инфекция максимальна весной и летом, и затухает, как правило, в осенне-зимний сезон [15].

Сопоставление имеющихся сведений по оптимальным и летальным температурам жизнедеятельности как рыб, так и основных групп возбудителей инфекций различного типа, а также создание компьютерного банка данных, позволят эффективно использовать температуру в целях предотвращения и лечения многих заболеваний рыб. Так, ранее было показано, что оптимумы большинства лососевых, осетровых, окуневых и карповых видов рыб расположены в диапазонах: 13—18°C, 20—24°C, 22—28°C и 24—30°C соответственно, а верхние границы жизнедеятельности для тех же видов равны примерно 23—28°C, 31—35°C, 32—37°C и 34—41°C [5, 9]. В то же время для многих возбудителей инфек-

ций (весенняя виремия карпа, ихтиофтириоз, хилодонеллез, триходиноз, дактилогироз и др.) температуры воды на уровне 32–34 °С в течение нескольких часов или суток приводят к полному подавлению заболевания у рыб (Табл.). Использование для этих же целей температур холодного диапазона ниже 4 °С (вирусная геморрагическая септицемия и дактилогироз) в ряде случаев также успешно, но чаще приводит просто к задержке или временной остановке заболевания. Характерно, что оптимумы у рыб и возбудителей их инфекций часто не совпадают, что позволяет использовать это несовпадение для лечения, оздоровления и профилактики заболевания рыб.

Наиболее предпочтительным для разработки методов лечения и профилактики заболевания рыб представляется использование участка диапазона температур, который располагается между зоной оптимума (роста, питания, жизнедеятельности, физиологических функций) и верхними летальными температурами. В большинстве случаев именно эти сублетальные температуры, отличающиеся по своему значению у видов из разных семейств (см. таблицу), оказывают эффективное воздействие на иммуно-физиологический статус рыб, способствуя их выживанию в случае инфицирования, а зачастую и полному выздоровлению. Если оптимальные зоны температур хорошо известны для многих видов рыб [5, 9], то летальные температуры рыб, обитающих в естественных водоемах России, а также используемых в практике аквакультуры, до настоящего времени исследовались сравнительно слабо. Только в последнее время выполнены полносистемные исследования, как летальных температур рыб, так и воздействия различных уровней тепловой нагрузки на их организм [6, 10, 16, 20, 23]. Более проблематичным представляется использование участка температур жизнедеятельности между оптимумом и нижними летальными температурами, который сравнительно уже. Кроме того, в диапазоне температур ниже 10–5 °С биологическая значимость каждого градуса температур по мере приближения к границе жизнедеятельности около 0 °С резко возрастает. В силу сложившихся традиций, слабой изученности и технических сложностей изучения температурных реакций рыб при низких температурах, в настоящее время использование данного участка диапазона температур жизнедеятельности, очевидно, невозможно. Тем не менее, в профилактических целях (замедление хода болезни) низкие температуры могут быть востребованы в рыбоводной практике.

Таблица

Соотношение температурных характеристик жизнедеятельности рыб и возможных температур прекращения инфекций разного типа

Виды рыб	Лососевые	Осетровые	Окуневые	Карповые
Температурный оптимум	13-18	20-24	22-28	24-30
Верхние температурные Границы жизнедеятельности	23-28	31-35	32-37	34-41
Инфекции	Весенняя вирусная карпа, ихтиофтириоз, хилодонеллез, триходиниоз, дактиллогироз и другие			
ТЕМПЕРАТУРА ПОДАВЛЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ НА УРОВНЕ 32 - 34°C				

Известно также, что резкие колебания температуры окружающей среды (понижение или повышение от уровня температур акклимации более чем на 3-6°C) существенно влияют не только на жизнедеятельность рыб, но и определяют их иммуно-физиологический статус [4, 18]. Если при разведении и выращивании рыб в искусственных условиях такие изменения температур сравнительно редки, то в условиях, приближенных к естественным, это случается достаточно часто [6]. В качестве примера можно привести случаи внезапного повышения температуры выше 31-33°C в рыбноводном хозяйстве, расположенном на подогретых водах Костромской ГРЭС, в августе 2001 г., что привело к массовой гибели маточного стада осетровых. Осенью 1992 г. там же резкое понижение температуры с 11 до 2°C вызвало практически полную гибель карпа. Как указывалось выше, степень влияния температурного фактора зависит от того, в каком диапазоне температур происходит соответствующее повышение или понижение. Кроме того, имеет значение, насколько близко или далеко от оптимальных температур жизнедеятельности вида (или соответствующего возбудителя инфекции) происходит температурное воздействие.

В качестве одного из способов лечения возможно применение гетеротермальных условий, в которых, как это показано на примере ряда карповых (карась и карп) и окуневых (солнечник и ушастый окунь) видов рыб выбор особями более высоких температур (в диапазоне от 30 до 34°C) часто практически сдерживает развитие инфекции и позволяет рыбам успешно выживать [7, 8]. На примере ряда исследованных видов (карп, лещ, плотва, серебряный карась, большеротый окунь, обыкновенный и длинноперый солнечники), было показано, что они проявляют реакцию

поведенческой лихорадки, избирая в термоградиентных условиях после инъекции возбудителя инфекции зоны температур, на 2-6°C большие по сравнению с контролем [7, 8, 24, 25]. Данная реакция ("fever") проявляется в широком диапазоне температур и не зависит от метода изучения конечного термопреферендума, а также вида возбудителя инфекции (*Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saprolegnia*) [8]. Выявлены дозо-зависимые эффекты реакции поведенческой лихорадки, ослабление ее со временем после инокуляции возбудителя, а также более слабое проявление при повторной инъекции [7, 8]. В результате экспериментов показано, что отдельные представители карповых и ушастых окуней, искусственно задержанные в зоне оптимальных температур, после инъекции аналогичных доз возбудителей инфекции погибают [8, 24]. Таким образом, поведенческая лихорадка или "fever" имеет защитный характер, усиливает сопротивляемость организма рыб и способствует их большей выживаемости в процессе протекания болезни. В более высоких избираемых температурах (по сравнению с конечным термопреферендумом) механизмы иммунной защиты животных действуют более эффективно [7, 8, 24].

Характерно, что для лососевых, у которых температурный диапазон обитания ниже 30°C, выбор средств температурного воздействия будет несколько иным в сравнении с карповыми видами (например, карася и карпа), для которых сублетальная зона от 32 до 38°C вполне может быть использована как профилактическая. Необходим учет экологической специфики и температурных норм жизнедеятельности как рыб, так и возбудителей их инфекций в каждом конкретном случае. В качестве примера видоспецифичности возбудителей у тепло- и холодолюбивых рыб отметим тот факт, что бактериальные болезни карповых более ярко проявляются при температурах выше 20°C и до 25°C, а фореи — при 12-20°C, в то же время вирусные заболевания более остро протекают при низких температурах от 10 до 15°C [11, 18]. Вместе с тем, особенности температурных реакций партнеров в большинстве случаев исследованы слабо и нуждаются в детальном изучении.

Приуроченность вспышек инфекционных заболеваний рыб (краснуха карпа, фурункулез лососевых и др.) к определенным сезонам года, очевидно, определяется как особенностями эколого-физио-логического состояния рыб, так и напряженностью их врожденного иммунитета, которые, в свою

очередь, зависят от температуры окружающей среды [18]. Сезонное изменение температуры как в естественных водоемах, так и в условиях прудовых хозяйств существенно влияет на численность паразитов, сдвигает сроки прохождения ими жизненных циклов, в результате чего соответственно увеличивается или уменьшается количество инфицированных рыб [2, 13, 21]. Наиболее ярко в естественных условиях водоемов массовая зараженность рыб проявляется в районах действия подогретых вод атомных и тепловых электростанций [6], где, как это показано на примере Костромской ГРЭС, наблюдается высокий процент заболевания младших возрастных групп леща и плотвы лигулезом.

Известно, что изменения температуры воды существенно меняют не только интенсивность антителогенеза [18, 19], но также и эффект проявления иммунологической памяти или интенсивности анамнестической реакции [22]. Кроме того, синтез антител у холодо- и теплолюбивых рыб сильно различается, поскольку их интенсивное образование происходит при той температуре, которая является наиболее оптимальной для размножения, роста и развития. Крайне важным и перспективным, следовательно, для профилактики заболеваний рыб представляется исследование неспецифических, клеточных и гуморальных факторов защиты у рыб различных видов – эври- и стенотермных, тепло- и холодолюбивых – при воздействии небольшого числа “модельных” возбудителей. Характерно, например, что температурный предел активности комплемента у рыб колеблется от 0–4 до 40–56°C [11].

Таким образом, температурный фактор может быть важнейшим способом подавления развития возбудителей болезней, а также активизации защитно-приспособительных реакций организма рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алабастр Дж., Ллойд Р. Критерии качества воды для пресноводных рыб. М.: Легкая и пищ. пром-сть, 1984. 344 с.
2. Бауэр О.Н., Мусселиус В.А., Стрелков Ю.А. Болезни прудовых рыб. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1981. 320 с.
3. Биологические основы рыбоводства; паразиты и болезни рыб. М.: Наука, 1984. 224 с.
4. Ведемейер Г.А., Мейер Ф.П., Смит Л. Стресс и болезни рыб. М.: Легкая и пищевая пром-сть. 1981. 128 с.
5. Голованов В.К. Эколого-физиологические аспекты тер-

морегуляционного поведения пресноводных рыб // Поведение и распределение рыб. Докл. 2-го Всероссийск. совещ. "Поведение рыб". Борок. 1996. С.16–40.

6. Голованов В.К. Влияние дополнительного тепла. Рыбы / Гл. 9. Биологические последствия антропогенного воздействия // Экологические проблемы Верхней Волги. Ярославль, 2001. С. 295–302.

7. Голованов В.К., Микряков В.Р. Реакция карпа в градиенте температур после инокуляции возбудителей бактериальной инфекции // Экол. физиология и биохимия рыб. Вильнюс. 1985. С. 50–51.

8. Голованов В.К., Микряков В.Р. Эволюционные и эколого-физиологические аспекты поведенческой лихорадки рыб // Сб. тез. докл. научно-практ. конф. "Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре", М., 2000. С. 47–48.

9. Голованов В.К., Свирский А.М., Извеков Е.И. Температурные требования рыб Рыбинского водохранилища и их реализация в естественных условиях // Современное состояние рыбных запасов Рыбинского водохранилища. Ярославль, 1997. С.92–123.

10. Голованова И.Л., Кузьмина В.В., Голованов В.К. Воздействие высоких температур на пищеварительные гидролазы серебряного карася *Carassius carassius* L. // Вопр. ихтиол. 2002. № 1. С. 121–128.

11. Грищенко Л.И., Акбаев М.Ш., Васильков Г.В. Болезни рыб и основы рыбоводства М.: Колос, 1999. 456 с.

12. Изменения климата и их последствия. Материалы специальной Сессии ученого совета Центра международи. сотрудничества по проблемам окружающей среды, посвященной 80-летию акад. Михаила Ивановича Будыко (19–20 мая 1999 г.). Санкт-Петербург: Наука, 2002. 269 с.

13. Изюмова Н.А. Паразитофауна рыб водохранилищ СССР и пути ее формирования. Ленинград: Наука, 1977. 284 с.

14. Канаев А.И. Ветеринарная санитария в рыбоводстве. М.: Агропромиздат, 1985. 280 с.

15. Кеннеди К. Экологическая паразитология. М.: Мир, 1978. 230 с.

16. Лапкин В.В., Голованов В.К., Свирский А.М., Соколов В.А. Термоадаптационные характеристики леща *Abgatis bgrata* (L) Рыбинского водохранилища // Структура локальной популяции у пресноводных рыб. Рыбинск, 1990. С. 37–85.

17. Ляйман Э.М. Болезни рыб. М.: Изд-во сельхозлитературы, 1963. 295 с.

18. Лукьяненко В.И. Иммунология рыб: врожденный иммунитет. Москва; ВО "Агропромиздат", 1989. 271 с.
19. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск, 1991. 154 с.
20. Смирнов А.К., Голованов В.К. Влияние различных факторов на термоустойчивость серебряного карася *Carassius auratus* L. // Биол. внутр. вод, 2004. (В печати)
21. Щербина А.К. Болезни рыб. Киев: Урожай, 1973. 404 с.
22. Avtalion R.R. Environmental control of the immune response in fish // CRC Crit. Rev. Environm. Contr. 1981. Vol. 11, № 2. P. 163-188.
23. Beitinger T.L., Bennet W.A., McCauley R.W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature // Env. Biol. Fishes. 2000. Vol. 58. № 3. P. 237-275.
24. Kluger M.J. Fever in ectotherms: evolutionary implications // Thermoregulation in ectotherms. Symp. Richmond. 1978. / Amer. Zool. 1979. Vol.19. N 1. 295-304.
25. Reynolds W.W., Casterlin M.E., Covert J.B. Behavioral fever in teleost fishes // Nature, 1976. Vol. 259. № 5538. P. 41-42.
26. Schdperclaus W. Fisch-krankheiten. Teil 1 and 2. Berlin: Akademic-Verlag, 1979. 1089 s.

METHODOLOGICAL ASPECTS OF TREATMENT AND PROPHYLAXIS OF FISH ILLNESS BY THE TEMPERATURE

V.K. Golovanov

*Papanin's Institute for biology of inland waters RAS,
Borok, Yaroslavl region, Russia, 152742*

The estimation of the importance of temperature for fish survival by the widespread disease infections (infectious, invasion, helminyhos and others) is carried out on the base of literature and own data. The optimum temperatures of cyprinids, salmonids, acipenserids and percids infections and seasonal nature of illness course are revealed. It is offered to use discrepancy of temperature optimum of fishes and infection stimulators for treatment, health and prophylaxis of fish disease. The way of weakening for infection development and successful survival of fishes is the application of behavioral "fever" in heterothermal conditions. The necessity of the account for ecological specificity, also temperature norms of fish existence and activators of their infections in each concrete case of disease is emphasized.

ИЗМЕНЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ СМЕЖНЫХ ПОКОЛЕНИЙ ГОРБУШИ И СОСТОЯНИЕ ЕЕ ЗАПАСОВ В ЗАЛИВЕ АНИВА ОСТРОВА САХАЛИН

А.А. Антонов¹, Х.Ю. Ким¹, В.А. Руднев¹, А.Е. Микулин²
1 - СахНИРО; 2 - МГУТУ

Проведен сравнительный анализ поколений горбуши 80-х и 90-х годов в заливе Анива о. Сахалин. Обнаружено взаимное влияние смежных поколений горбуши на изменение ее численности. Приводятся данные по современному состоянию запасов горбуши, что позволяет судить о существенном увеличении численности данного вида лососей в заливе Анива.

ВВЕДЕНИЕ

Тихоокеанские лососи рода *Oncorhynchus* - наиболее массовые представители лососей Дальнего Востока, а горбуша - доминирующий объект лососевого промысла. Ежегодный вылов ее составляет до 80% от общего числа представителей этого рода [7].

Экономическая эффективность лососевого промысла в значительной мере определяется своевременностью подготовки рыбной промышленности к нему. Свойственная горбуше высокая изменчивость численности, смена доминант и, как следствие, сроков промысла делают необходимым постоянный мониторинг за состоянием запасов этого вида.

Некоторыми авторами делались попытки анализа динамики численности горбуши Сахалина [4, 17]. Воздействие абиотических факторов среды на выживание горбуши в пресноводный период жизни, по мнению большинства исследователей [6, 10, 11, 15], несомненно, одна из главных причин колебаний численности поколений лосося.

Целью данной работы является анализ изменения численности, оценка современного состояния запасов горбуши в заливе Анива и перспектив ее вылова в ближайшем будущем.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В настоящей работе использованы данные промысловой статистики, архивные материалы СахНИРО и Управления Сахалинрыбвод.

Сбор статистического и биологического материала по

производителям проводился в период преднерестовой и нерестовой миграции. Скот молоди в зависимости от сроков воспроизводства осуществляли в весенне-летне-осенний период. Он проходил в три этапа:

- учетные работы и наблюдение за скотом молоди горбуши из рек залива Анива (в период с начала мая до начала июля).

- наблюдение за промыслом горбуши (в период с начала июня до середины сентября).

- учетные работы преднерестовой и нерестовой миграции горбуши (с июля по сентябрь).

Для расчета общей численности поклатной молоди залива Анива использовали собственные данные, полученные с подконтрольной реки Кура, данные КНС по реке Брянка (приток Лютюги) и материалы ихтиологической службы Сахалинрыбвода по искусственному рыбозаведению.

Оценка биологической характеристики производителей горбуши в 2001 году дана по результатам биоанализов, которые выполнялись в течение всего промысла из уловов ставными неводами в прибрежье, закидными и жаберными сетями в реках залива Анива.

При подсчете численности производителей горбуши, зашедших в реки на нерест, использованы результаты визуального подсчета рыб, осуществленных при обходах 7 рек района с нерестовой площадью 1760,0 кв.м (при общей нерестовой площади 2071 кв. м)

Сбор и обработка полученных материалов велась по традиционным методикам, принятым в системе ТИНРО, в соответствии с рекомендациями Н.А. Плохинского [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Говоря о современном состоянии численности горбуши залива Анива, обратимся к анализу промысловой статистики. Судя по данным, представленным на рис.1, наблюдается определенная периодичность изменения численности анивской горбуши.

В последнее десятилетие численность горбуши может быть оценена как рекордно высокая за последние 100 лет. В 90-х годах среднегодовая общая численность горбуши четных поколений составляла 7,1 млн. шт., при колебаниях от 2,0 до 18,2 млн. шт.. Средняя численность горбуши поколений нечетных лет в эти годы составляла 21,0 млн. шт., при колебаниях от 4,8 до 32,5 млн. шт. По сравнению с

предыдущим десятилетием средняя численность четных поколений увеличилась в 3,5 раза, нечетных - в 2,6 раза. Необходимо заметить, что высокая изменчивость численности – явление, характерное для горбуши всего азиатского региона [2, 3, 8, 17]. Тенденции изменения численности горбуши определяются всем многообразием экологических факторов, действующих на популяцию на протяжении всей жизни. При определении условий формирования конечной численности популяций горбуши можно выделить несколько важнейших периодов жизненного цикла: нерестовый период, эмбрионально-личиночный период, покатная миграция, ранний и поздний морской периоды онтогенеза. Среди множества факторов, воздействующих на особей, слагающих стадо горбуши залива Анива, бывает трудно выделить ведущие и в конечном итоге определяющие численность на каждом этапе жизненного цикла.

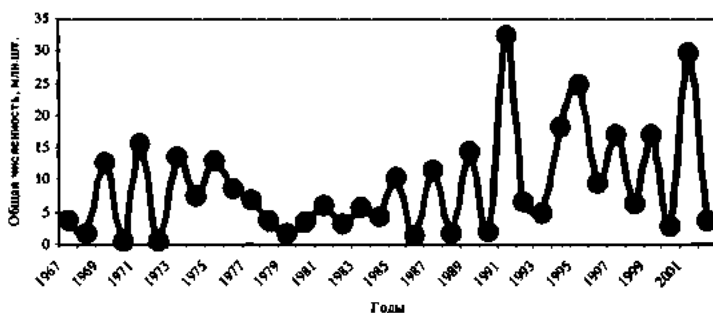


Рис.1. Изменение численности горбуши залива Анива (1967-2002 гг.)

Уровень заполнения нерестилищ - один из важнейших факторов, определяющих становление численности лососей в пресноводный период жизни (табл. 1, рис. 2).

В работах ряда авторов, применительно к рекам юга Сахалина определена норма заполнения нерестилищ производителями горбуши – 160 шт./100 кв. м [4, 6]. Необходимо заметить, что, судя по нашим данным, при плотности заполнения нерестилищ менее 150 шт. на 100 кв. м (для залива Анива менее 3.0 млн. рыб на 2071 тыс. м² нерестовой площади) эффективность нереста горбуши невысока, и появление высоко численного дочернего поколения маловероятно (рис. 2).

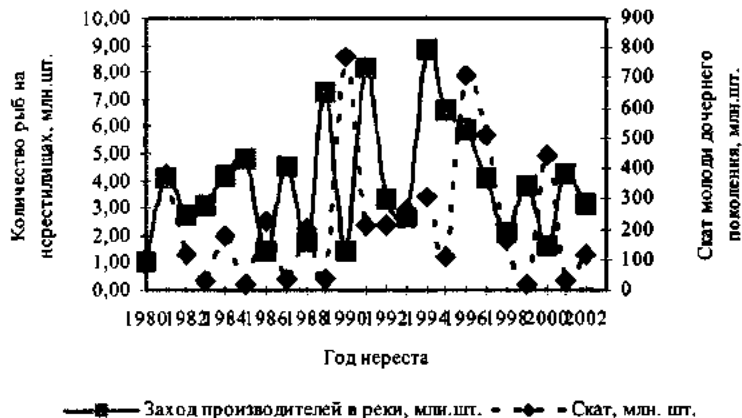


Рис. 2. Зависимость ската молоди горбуши от заполнения нерестилиц в заливе Анива (1980 – 2002 гг.)

Поскольку количество нерестовой площади в реках района относительно невелико, а численность горбуши в последние годы находится на высоком уровне, довольно часто возникают ситуации конкурентных отношений производителей горбуши на нерестилищах. При заполнении на уровне 150 – 250 шт. на 100 кв. м конкуренция на нерестилищах приводила к некоторому уменьшению эффективности нереста горбуши, однако численность дочернего поколения, как правило, оказывалась высокой. При дальнейшем увеличении плотности заполнения нерестилищ производителями (более 300 шт. на 100 кв. м) наблюдалось резкое падение эффективности нереста и численности дочернего поколения горбуши [13].

Показателем, интегрирующим взаимодействие всех процессов, происходящих в речной период жизни горбуши, является численность покатной молоди. За двадцатилетний период количество молоди изменялось от 16,5 до 770,5 млн. шт., в среднем составило 226,5 млн. шт. Следует отметить, что скат молоди поколений четных лет практически в два раза ниже такового нечетных лет. Искусственное разведение дает пятую часть урожая молоди (табл.1).

Таблица 1

Основные показатели воспроизводства горбуши в речной период жизни в заливе Анива (1980 – 2002 гг.)

Год нереста	Заход производителей в реки, тыс.шт.	Скат, млн. шт.	Выпуск молоди ЛРЗ, млн. шт.	Общий урожай молоди, млн. шт.	Кэфф., возврата от молоди, %	Возврата дочернего поколения, млн. шт.
1980	994.4	95.6	42.7	138.3	3.84	3.36
1981	4118.4	383.8	50.0	433.8	4.35	6.01
1982	2745.6	116.8	17.7	134.5	0.73	3.17
1983	3097.6	29.9	21.3	51.2	4.28	5.76
1984	4171.2	181.3	50.6	231.9	8.51	4.36
1985	4774	16.5	30.2	46.7	4.49	10.42
1986	1408	225.1	53.4	278.5	3.05	1.42
1987	4545.2	37.5	37.4	74.9	4.19	11.67
1988	1812.8	202.1	40.6	242.7	2.45	1.83
1989	7271.6	39.7	33.9	73.6	5.91	14.35
1990	1465.0	770.5	50.2	820.7	2.66	1.96
1991	8164.0	218.0	60.6	278.6	3.96	32.52
1992	3360.0	216.5	80.7	297.2	2.37	6.60
1993	2700.0	264.5	58.5	323.0	7.10	4.82
1994	8869.7	306.9	51.4	358.3	5.64	18.21
1995	6574.2	110.0	56.3	166.3	6.97	24.97
1996	5861.9	708.0	100.9	808.9	5.69	9.47
1997	4121.2	513.9	99.4	613.3	2.10	16.96
1998	2101.4	164.6	96.3	260.9	1.04	6.35
1999	3832.0	16.6	72.4	89.0	6.53	17.03
2000	1667.2	444.0	86.6	530.6	3.30	2.94
2001	4250.0	33.2	80.4	113.6	5.61	29.79
2002	3142.0	114.6	95.3	209.99	3.40	3.87
Четные	3133.3	295.5	63.9	359.4	3.56	5.30
Нечетные	4858.9	151.2	54.6	205.8	5.04	15.85
Среднее	3958.6	226.5	59.4	285.9	4.27	10.34

Между количеством покатной молоди и возвратом производителей для горбуши залива Анива имеется существенная коррелятивная связь ($r = 0.71$, $P < 0.01$) (Рис. 3).

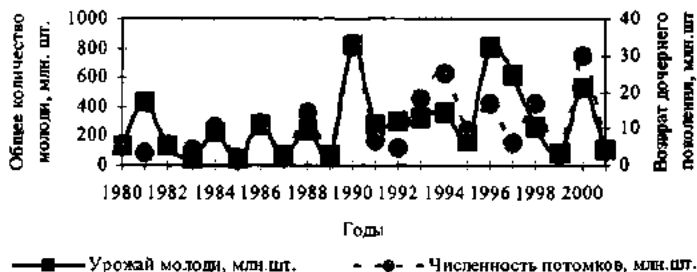


Рис. 3. Зависимость скат-возврат в заливе Анива (1980-2002 гг.)

Из рисунка 3 видно, что при малой численности скатившихся мальков возвращаются также немногочисленные стада, при большом количестве молоди можно ожидать и возврата поколения высокой численности. Однако даже при высоком уровне использования нерестового фонда на численность покатной молоди значительное влияние оказывает ряд факторов абиотического характера. [5, 10, 11, 20]. По нашим наблюдениям наибольший урон молоди наносит быстрое падение уровня воды в реках в период покатной миграции, когда значительное количество мальков, не вышедших из грунта, остается на обсохших участках.

Значительной элиминации молодь горбуши в период покатной миграции подвергается при переходе из пресных вод в соленые, в эстуарной зоне и в ранний морской период жизни [9, 12]. Кроме того, на становление численности большое влияние оказывает выедание молоди хищниками [18, 19] и обеспеченность пищей молоди горбуши.

В конечном итоге основным показателем выживаемости горбуши в морской период жизни является коэффициент возврата, который включает в себя все воздействующие на нее факторы. Средний коэффициент возврата для горбуши залива Анива по поколениям нечетных лет (5.04 %) в 1.4 раза превышает аналогичный показатель четных (3.56 %) (табл. 1) Численность горбуши поколений четных лет на Сахалине традиционно меньше, чем нечетных. Причем, при депрессии восстановление ее численности происходит медленнее, чем у горбуши поколений нечетных лет [6]. В частности, у поколений четных лет крайне низка численность группировки ранненерестующей горбуши, подходящей к побережью в июле. Июльские уловы, косвенно служащие мерилем ее численности, не превышают 3-8 % общего улова вида за сезон. В то время как в нечетные годы июльские уловы составляют в среднем около 30 % от общего за сезон (до 3-5 тыс. т). Возможно, что явное доминирование только одного стада сужает адаптационные возможности горбуши поколений четных лет и делает ее более ранимой в тех случаях, когда условия среды приближаются к критическим значениям толерантности (рис.4).

За последние двадцать два года в численности обеих поколений, можно выделить два периода: депрессии и подъема. У горбуши нечетных лет с 1980 - 2001 гг. происходил подъем численности, прерванный резким падением в 1993 г. Вслед за падением численности нечетных годов в 1993 г. увеличилась численность четных в 1994 гг. В течение пос-

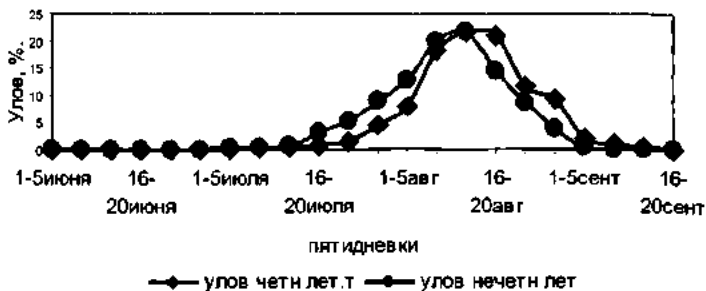


Рис. 4. Динамика промысла горбуши по поколениям четных и нечетных лет в заливе Анива (1980-2002 гг.)

ледного 20-ти летнего периода в заливе Анива наблюдается доминирование нечетных поколений горбуши над поколениями четных лет. Резкое падение численности 1993 года, обусловленное многократным переполнением нерестилищ рек в 1991 года (заход производителей на нерестилища более 8.0 млн. рыб), и, как следствие, повышенной гибелью в эмбрионально-личиночный период жизни, не привело к смене доминанты. Увеличение численности горбуши четных лет, произошедшее в 1994г., вероятно, было вызвано довольно благоприятными условиями в период эмбриогенеза.

По мнению Дж. Хантера [21] чрезмерное заполнение нерестилищ рек в сочетании с высокими температурами и низким содержанием кислорода приводит к значительной донерестовой гибели и, в связи с этим, к большим потерям икры, существенно ухудшаются условия развития эмбрионов, так как разложение мертвой икры создает дефицит кислорода. Одновременно повышается гибель живой икры от поражения ее сапролегнией. Мертвая икра, постепенно разлагаясь, может сохраняться в грунте до двух лет, оказывая отрицательное воздействие на нерест следующего года. В тоже время существует противоположное мнение, что многочисленные стада горбуши в процессе нереста очищают нерестилища от илистых фракций грунта так успешно, что их структура сохраняется на протяжении 2-3 лет [14]. Это позволяет производителям, пришедшим на нерест в следующем году, отнерестовать в более благоприятных условиях. Однако нельзя игнорировать вероятность взаимного влияния смежных поколений горбуши. Высока вероятность взаимного влияния смежных поколений через пищевые отношения в период откочевки молоди к местам нагула [1]. Возможно, увеличение численности горбуши с 1993 – 2001

гг. оказало влияние на количество рыбы в смежных поколениях. Одним из показателей биологического состояния стад можно считать прирост численности, или другими словами, изменение относительной численности поколений. Одним из подтверждений нашей теории о взаимовлиянии поколений может служить период с 1991 по 1995 гг. Резкое падение численности и прирост численности горбуши в 1993 г., возможно, стало причиной подъема численности и прироста 1994 года (рис. 5).

При флуктуациях численности горбуши (рис. 5), как правило, адекватно происходит и изменение прироста численности следующих поколений. Увеличение численности подходящей к побережью горбуши в большинстве случаев вызывает подъем количества нерестующих особей и, как следствие, увеличение численности дочернего поколения. Однако это справедливо только до определенной величины. Для поколений четных лет при достижении численности до 15 млн. особей происходит резкое падение прироста. Для поколений нечетных лет таким барьером, по-видимому, является численность в 28 млн. рыб. При достижении популяцией этих значений у тех и других поколений, как правило, происходит резкое снижение прироста.

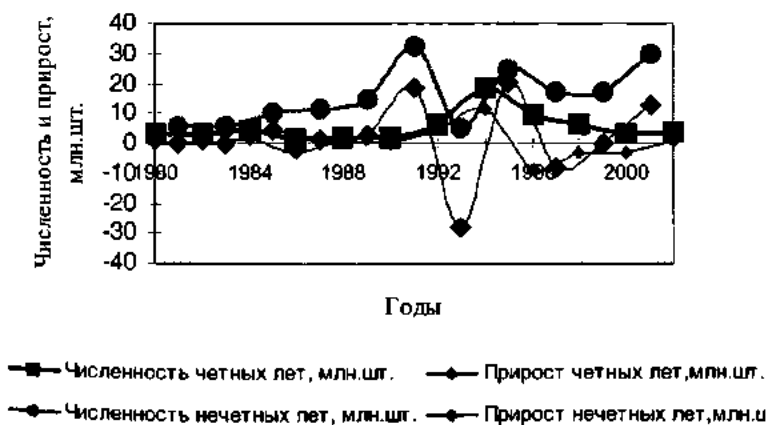


Рис. 5. Взаимовлияние и прирост численности четных и нечетных поколений горбуши в заливе Анива

В связи с этим особую значимость приобретает рациональное использование рыбных ресурсов. Увеличение про-

мысла в начале 90-тых годов сопровождалось резким падением прироста численности и самой численности (табл. 2, рис. 6, 7, 8). В частности, чрезмерное изъятие в 1992-1994 гг. и в 1998 г. привело к падению прироста численности, что в конечном итоге не дает возможности дальнейшего роста численности четных лет. В то же время по поколениям нечетных лет резкое увеличение изъятия подходящей к побережью горбуши в 1991 г. и 1995 г. негативно отразилось на приросте численности. Таким образом, важнейшее значение приобретает регулирование промысла и пропуска производителей в реки. Использование этих мер позволит предвидеть изменение количества потомства и своевременно рекомендовать величину изъятия рыбопродукции.

Общая численность поколений определяется количеством зашедших в реки производителей и величиной промышленного изъятия. Последнее изменяется в широких пределах. При колебаниях от 1,0 до 87,3 % этот показатель по заливу Анива в среднем составляет 45,9%.

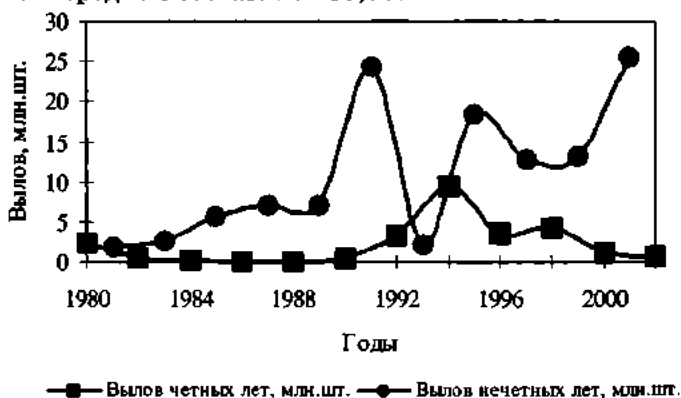


Рис. 6. Динамика вылова горбуши по поколениям четных и нечетных лет в зал Анива (1980-2002 гг.)

ВЫВОДЫ

В заливе Анива скат молоди поколений четных лет практически в два раза ниже нечетных лет. Искусственное разведение дает пятую часть урожая молоди. Оптимальным заполнением нерестилищ производителями горбуши следует считать 150-250 шт. на 100 м².

Вероятно, существует взаимное влияние смежных поколений горбуши на изменение ее численности.

Современное состояние запасов горбуши залива Анива находится на довольно высоком уровне. В 90 - годы и по настоящее время численность горбуши по сравнению с 80 - ми годами увеличилась в четные годы в 3,5 раза, а в нечетные в 2,6 раза.

Чрезмерное изъятие рыбы негативно влияет на воспроизводительную способность горбуши как высокочисленных, так и малочисленных поколений.

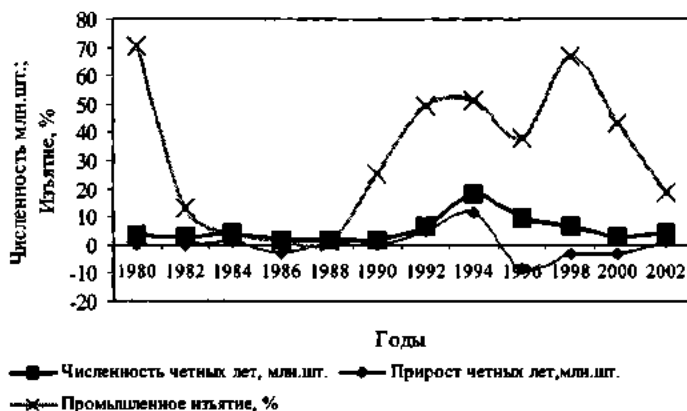


Рис. 7. Влияние изъятия на численность и прирост горбуши четных лет в заливе Анива (1980-2002 гг.)

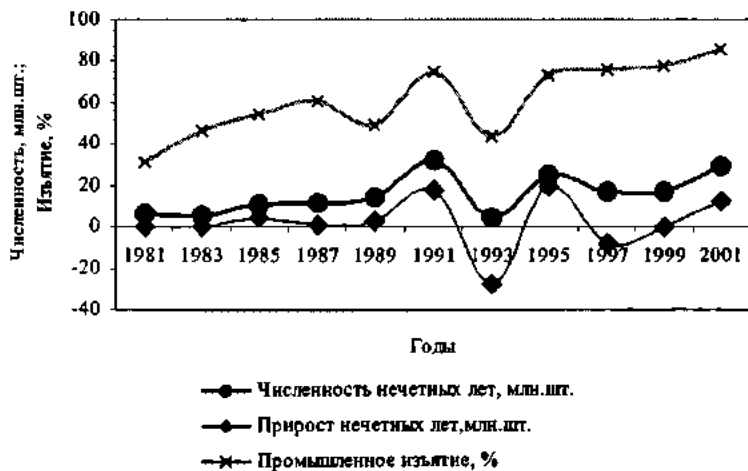


Рис. 8. Влияние изъятия на численность и прирост горбуши нечетных поколений в заливе Анива (1981-2001 гг.)

Таблица 2.

Основные показатели численности и эксплуатации горбуши в заливе Анива (1980 – 2002 гг.)

Годы	Численность	Вылов		Промышл. изъятие
	млн. шт.	млн.шт	тыс. тонн	%
1980	3.36	2.60	2.36	70.4
1981	6.01	2.27	1.89	31.5
1982	3.17	0.51	0.43	13.4
1983	5.76	3.19	2.66	46.2
1984	4.36	0.18	0.19	4.3
1985	10.42	5.93	5.65	54.2
1986	1.42	0.02	0.02	1.1
1987	11.67	8.91	7.13	61.1
1988	1.83	0.02	0.02	1.0
1989	14.35	8.50	7.08	49.3
1990	1.96	0.64	0.49	25.2
1991	32.52	29.72	24.36	74.9
1992	6.60	4.80	3.24	49.1
1993	21.10	3.17	2.12	43.9
1994	18.21	10.46	9.34	51.3
1995	24.97	23.73	18.40	73.7
1996	9.47	4.00	3.60	38.1
1997	16.96	16.68	12.84	75.7
1998	6.35	4.76	4.25	66.9
1999	17.03	16.63	13.20	77.5
2000	2.94	1.75	1.27	43.2
2001	29.79	33.96	25.54	85.7
2002	3.87	1.05	0.726	18.8
Четные	5.3	2.57	2.16	31.9
Нечетные	17.33	13.88	10.99	61.2
Среднее	11.05	7.98	6.38	45.9

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бирман И.Б.* О малых циклах в динамике численности лососей (семейство Salmonidae). //Вопросы ихтиологии. 1976. Т. 16. Вып. 3(98). С. 407-415.
2. *Бирман И.Б.* Морской период жизни и вопросы динамики стада тихоокеанских лососей. - М.: Агропромиздат, 1985. 208 с.
3. *Варнавская Н.В., Кудзина М.А., Вронский Б.Б., Остро-*

умов А.Г., Непомнящий К.Ю. Сравнительная характеристика многолетних колебаний численности в региональных комплексах популяций горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) линии четных и нечетных лет в азиатской части ареала вида // Сб. научных трудов Исследования биологии и динамики численности промысловых рыб камчатского шельфа. Петропавловск-Камчатский. 1995. Вып 3. С. 109-119.

4. Воловик С.П. Структура нерестовых стад и эффективность естественного воспроизводства горбуши на Южном Сахалине. Дисс...канд. биол. наук. Калининград. 1967. 240 с.

5. Воловик С.П., Ландышевская А.Е., Смирнов А.И. Материалы по эффективности размножения горбуши на Южном Сахалине, Владивосток: ТИНРО, 1972. Т. 81. С.69-90.

6. Гриценко О.Ф., Ковтун А.А., Косткин В.К. Экология и воспроизводство кеты и горбуши. Москва: ВО Агропромиздат, 1987. 165 с.

7. Животовский Л.А., Храмцов В.В., Глубоковский М.К. Модель динамики численности горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* // Вопросы ихтиологии. 1996. Т. 36. №3. С. 369-385.

8. Кагановский А.Г. Некоторые вопросы биологии и динамики численности горбуши. Известия ТИНРО. 1949. Т.31. С.3-57.

9. Каев А.М., Чупахин В.М. Ранний морской период жизни и его роль в формировании численности кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) и горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) о.Итуруп // Динамика численности промысловых животных дальневосточных морей. Владивосток: ТИНРО, 1986. С.63-71.

10. Канидьев А.Н. Абиотические условия в нерестовых буграх горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum) // Изв. ТИНРО. 1967. Т 61. С. 94.

11. Канидьев А.Н. Характеристика абиотических условий эмбрионального развития горбуши // Аннотации научных работ по исследованию сырьевой базы рыбной промышленности Дальнего Востока в 1963-1964 гг. Владивосток: Дальневосточное книжное издательство, 1967. С. 71.

12. Карпенко В.И. Ранний морской период жизни тихоокеанских лососей. Москва: Издательство ВНИРО, 1998. 165 с.

13. Ким Х.Ю., Антонов А.А. Уровень заполнения рек производителями, как один из факторов становления численности в заливе Анива // Сб. трудов молодых ученых МГТА. Выпуск II.. М.: МГТА, 2002. С. 52-57.

14. Леванидов В.Я. Закономерности динамики численнос-

ти лососей в бассейне Амура и пути воспроизводства запа-
сов // Лососевое хозяйство Дальнего Востока. М.: Наука,
1964. С. 49-68.

15. *Нестеров В.Д., Лепская В.А., Бахитанский Э.Л.* Вли-
яние абиотических факторов среды на динамику покатной
миграции молоди атлантического лосося (*Salmo salar* L) //
В кн. Проблемы биологии и экологии атлантического лосо-
ся. Л.: Наука, 1985. С.145-152.

16. *Плохинский Н.А.* Биометрия. М.: Изд. МГУ, 1970.
368 с.

17. *Рухлов Ф.Н.* Некоторые особенности динамики чис-
ленности Сахалинской горбуши. // Изв. ТИНРО. 1974. Т.93.
С. 7-13.

18. *Тагмазьян З.И.* Влияние освещенности воды на вые-
дание молоди горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*) хищными
рыбами // Сб.: Исследования по биологии рыб и промысло-
вой океанографии. Владивосток. 1972. Вып.7. С. 123

19. *Хоревин Л.Д., Руднев В.А., Шершнев А.П.* Выедание
хищными рыбами молоди горбуши *Oncorhynchus gorbuscha*
Walbaum в период ската из небольшой нерестовой реки о.
Сахалин // Вопросы ихтиологии. 1981. Т. 21. № 6. С. 1016.

20. *Шершнев А.П., Жульков А.И.* Особенности ската и не-
которые показатели эффективности воспроизводства горбу-
ши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) // Вопросы ихтио-
логии. 1979. Т. 19. вып. 1(114). С. 128-133.

21. *Hunter J.G.* Survival and production of pink and chum
salmon in a costal stream // J. Fish. Res. Bd. Canada. 1959.
Vol.16. N6. P.835-886.

CHANGES OF NUMBER OF ADJACENT GENERATIONS OF HUNCHBACK SALMON AND A CONDITION OF ITS STOCKS IN A GULF ANIVA OF ISLAND SAKHALINS A.A. Antonov, H.J.Kim, V.A.Rudnev, A.E.Mikulin .

The comparative analysis of hunchback salmon generations
80 and 90th years in gulf Aniva by is. Sakhalin is carried out.
Mutual influence of adjacent hunchback salmon generationson
change of its number is revealed.

The data on a modern condition of hunchback salmon stocks
are cited, that allows to judge essential increase of number of
the given kind of salmons in gulf Aniva.

РОЛЬ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ СУДАКА И БЕРША

Калайда М.Л.

Казанский государственный энергетический университет
kalayda@mi.ru

Приводятся данные по зараженности судака и берша в верхней части Куйбышевского водохранилища нематодами *Camallanus truncatus* (Rudolphi). Показана роль экологических факторов, приводящих к увеличению зараженности. Важным фактором, определяющим зараженность, является изменение питания хищников в условиях антропогенного воздействия на экосистему водохранилища.

В условиях усиления антропогенного воздействия на водоемы в регионе Среднего Поволжья отмечается целый ряд изменений в составе гидробиоценозов, в питании рыб и их зараженности. Наблюдаемые биотические изменения являются адаптациями к изменению среды. Так, изменение спектра питания свидетельствует об изменении кормовой базы, а особенности использования кормовой базы и изменения в составе паразитов в пищеварительных трактах рыб одновременно служат показателями состояния экосистемы водоема.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для данной статьи послужили сборы паразитов пищеварительных трактов судака - *Stizostedion lucioperca* (Linnaeus, 1758) и берша - *S. volgense* (Gmelin, 1788), собранных в Куйбышевском водохранилище в Волжском и Камском отрогах в вегетационные периоды 2000 - 2003 гг. Сбор и обработка материалов проводились по общепринятым методикам [13; 15; 20; 21]. Всего было обработано 196 наполненных желудков судака и 237 – берша.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование питания судака и берша выявило высокий процент зараженности хищников нематодами *Camallanus truncatus* (Rudolphi, 1814). Этот паразит отмечается в кишечниках окуневых рыб в пределах ареала судака. В его распространении играют роль как циклопы, так и резервуарные хозяева – карповые рыбы.

Зараженность берша нематодами *Camallanus truncatus* была выше, чем судака (соответственно 18,3% и 46,1%). Интенсивность заражения судака варьировала от 1 до 16 экз. паразитов, а берша – от 1 до 39 экз. Масса встреченных нематод варьировала от 0,3 до 1,5 мг.

Необходимо отметить, что работы по изучению питания судака, проводившиеся ранее в регионе [22; 5], не выявляли столь высокой степени зараженности. Возрастание зараженности активных хищников отмечается на фоне возрастания зараженности карповых рыб. Так, отмечается увеличение зараженности плотвы и синца трематодами и нематодами, развитие которых связано с промежуточными хозяевами – веслоногими ракообразными [7].

Высокая степень зараженности хищников может быть объяснена с позиций изменений, наблюдающихся в экосистеме Куйбышевского водохранилища.

В условиях усиления антропогенного воздействия на водоемы в регионе Среднего Поволжья отмечается целый ряд изменений в составе и структуре гидробиоценозов [6; 8; 9]. Проявлением этого является сокращение промыслового вылова (Рис.1), изменение качественного состава рыбного населения, возрастание роли малоценной сорной рыбы.

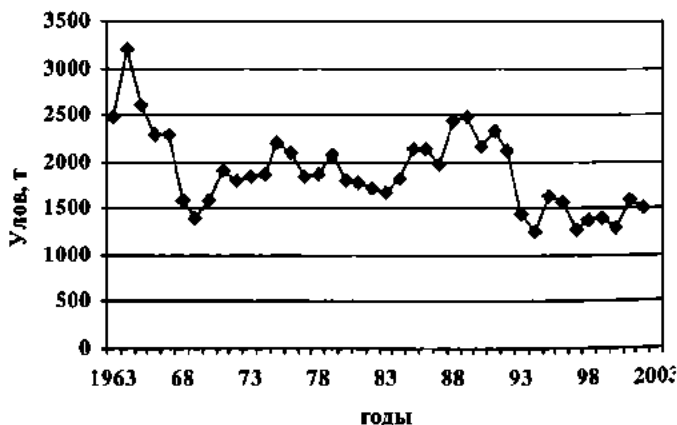


Рис. 1. Промысловые уловы в Куйбышевском водохранилище в пределах Республики Татарстан (по данным Минприроды РТ).

В этих условиях с позиций улучшения состава ихтиофауны и ее направленного формирования значительно возрастает роль таких активных хищников, как судак и берш.

Обыкновенный судак является широко распространенным

видом в Средней и Восточной Европе. Судак встречается в реках и озерах бассейна Балтийского, Черного, Каспийского и Аральского морей [16]. Он обитает как в пресных, так и в солоноватых водах, образует полупроходные формы. В последние годы ареал распространения судака быстро расширяется за счет его акклиматизации и использования как перспективного объекта аквакультуры как в России, так и в Европе [16; 24; 25]. В Европе в реках Рейн и Дунай судак является объектом спортивного рыболовства. Его максимальная длина достигает 130 см при массе 12 кг [23]. Широкое распространение судак получил и в связи с гидростроительством. Он был вселен в Новосибирское водохранилище, из которого спустился вниз по Оби до Обской и Тазовской губ [16].

Судак в 30-х годах XX столетия широко использовался для зарыбления малых озер [8]. Он был акклиматизирован во многие озера Карелии и Вологодской области, в которых он не встречался [11; 4; 1], был вселен в озеро Ханка, из которого он проник в р.Амур [18]. Важное значение в составе икhtiофауны имеет судак и в ряде озер бассейна Северной Ладоги [18].

В настоящее время в Куйбышевском водохранилище отмечается ряд тенденций в изменении икhtiофауны [6; 8]. Судак, который занимал второе место в промысле ценных видов в Куйбышевском водохранилище до 80-лет XX века, в последнее десятилетие значительно снизил численность (Рис.2).



Рис. 2. Уловы судака и берша в Куйбышевском водохранилище в пределах Республики Татарстан.

Его добыча в 80-х годах находилась на уровне 247 тонн в год. В настоящее время, по сравнению с 80-ми годами, его вылов сократился в 3 раза. Тенденция падения уловов

судака отмечается с начала 90-х годов. В последние годы его вылов составляет около 84 т в год (5,9% от общего улова). В 2002 г. его выловили 42,9 т (3,1%). Необходимо отметить, что снижение численности судака за последние 50 лет отмечается во всех внутренних водоемах страны [12].

В уловах сокращается доля крупноразмерного судака. На Волжском участке водохранилища в контрольных уловах в 2001 г. встречались рыбы от 2 до 7 – летнего возраста. Они имели длину тела от 20 до 53 см и массу – от 180 до 2825 г. На Камском участке встречались судаки от 3 до 13 лет. Длина их тела варьировала от 24 до 63 см, а масса – от 200 до 4000 г. Соотношение самок к самцам составило в Волжском отроге 1,9:1, а в Камском – 1,6:1. Половозрелые самки в Камском отроге встречались в возрасте 5 лет и старше, а самцы – с 4 лет. В Волжском отроге половозрелыми были рыбы пятилетнего возраста.

Берш, или волжский судак - *S.volgensis* – является обитателем только пресноводных бассейнов Каспийского и Черного морей [16]. В последнее время в результате ирригационного строительства его ареал также расширяется. Он стал обитателем р. Кубани, ловится в Краснодарском водохранилище, Шапсугском, Крюковском и Кубанском лиманах [14], акклиматизирован в оз. Балхаш. Берш является промысловым видом, численность которого в последние годы повсеместно снижается.

В Куйбышевском водохранилище берш в уловах до 1973 г. отдельно не учитывался. В 80-х годах уловы берша составляли от 75 до 140 т в год (Рис.2). В 90-х годах вылов берша снижался и составлял около 40 т в год. В настоящее время уловы берша варьируют около 27-35 т в год. Берш встречается до 6-летнего возраста длиной до 34 см, массой до 400 г. В 70-х годах в траловых уловах берш встречался до 42 см длиной, а преобладающими были рыбы до 34 см [2].

В связи с изменениями, происходящими в экосистеме Куйбышевского водохранилища, отмечаются изменения в питании этих видов и, как следствие, их зараженности.

На рис.3 представлены основные компоненты пищи судака в 60-х годах XX столетия в центральной части Куйбышевского водохранилища по данным Н.И.Яшанина [22]. Основу питания судака составляли лещ и окунь. Среди компонентов пищи отсутствовали тюлька, берш и судак. В Волжском отроге Рыбинского водохранилища в тот же период основу питания составляли снеток, окунь и ерш (до 84% по массе) [17].

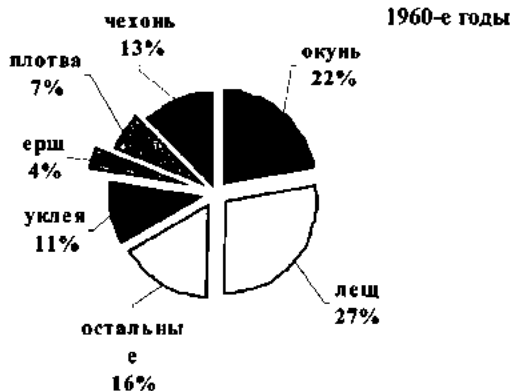


Рис. 3. Состав пищи судака (% по массе) в 1960-х годах (по данным Яшанина И.И., 1968).

К 90-м годам в Куйбышевском водохранилище изменился состав и соотношение компонентов ихтиофауны. В этот период в массовых количествах в водохранилище встречалась тюлька, ставшая главной пищей судака. Запасы тюльки в водохранилище оценивались в 9 - 20 тыс. т [3; 10], а ее возможные уловы - в 4 тыс. т [3].

В этот период отмечается снижение разнообразия в составе пищи судака [5]. По сравнению с 60-ми годами в пище судака в 90-х годах не были встречены укля, плотва, лещ, ерш, снизилось значение жереха, подуста и окуня. Новым пищевым компонентом, кроме тюльки, стал бычок-кругляк. Тюлька составляла, в среднем, 71,4 % по численности и 31,8 % по массе пищевого комка (Рис.4). На втором месте по частоте встречаемости в пище судака находилась его собственная молодь (11,8 %), а по массе она была на первом месте (40,8 %).

В этот период для судака было характерно отсутствие выраженной избирательности к пище. Он питался наиболее многочисленными компонентами экосистемы, доминирующими в пелагиали: зимой, весной и осенью - в основном тюлькой, а летом - собственной молодью [5].

В настоящее время основными компонентами рациона судака являются тюлька, укля, густера, лещ, плотва, берш, судак и окунь (Рис.5). Летом и осенью основу пищевого комка составляли тюлька (до 100% массы пищевого комка) и укля (до 50%). Кроме рыб, в пище судака в малых количествах встречались ракообразные, личинки насекомых

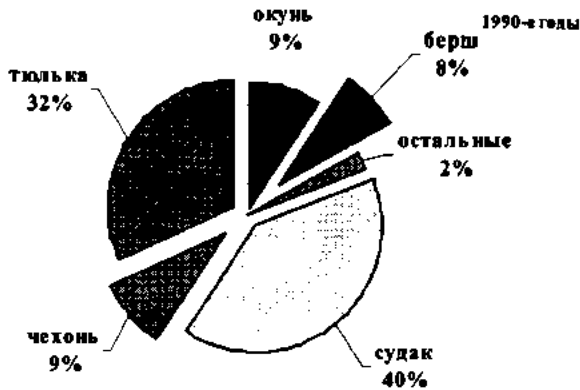


Рис. 4. Состав пищи судака (% по массе) в 1990-х годах (по данным Зуスマиновского Г.С., 1994).

и моллюски. Изучение питания судака в Куйбышевском водохранилище подтверждает его высокую значимость как биологического меллиоратора. Спектр питания судака (% по массе) в Волжском отроге Куйбышевского водохранилища в 2000-х годах представлен на рис.5. Одной из основных особенностей питания судака в настоящий период является преобладание весной в составе пищевого комка окуневых рыб (берша и окуня) и плотвы, а летом и осенью основу питания судака составляют тюлька (12-100%) и укляя (до 50%).

Анализ избирательности питания судака показал, что предпочитаемой пищей являются берш, синец и тюлька (индексы избирания соответственно 0,9; 0,6; 0,5). Такие виды как лещ, плотва, густера, укляя, язь относились к избегаемой пище. Учитывая, что синец является предпочитаемым объектом и зоопланктофагом, можно предположить, что он является возможным резервуарным хозяином нематоды.

Основу питания берша составляют тюлька, молодь берша и судака, ракообразные (гаммариды, мизиды, кумовые рачки) и моллюски (дрейссена, литоглиф, живородка). В пищевых комках бершей массой 230-260 г (возраст 3+ - 4+) встречается до 10 экз. тюльки.

Важное значение в питании берша имеют представители понто-каспийской фауны – гаммариды (до 36%), мизиды (*Paratymis intermedia*, *P.ullskyi*) (до 11,8%), кумовые раки (до 8,6%), дрейссена (до 76%). Из моллюсков кроме

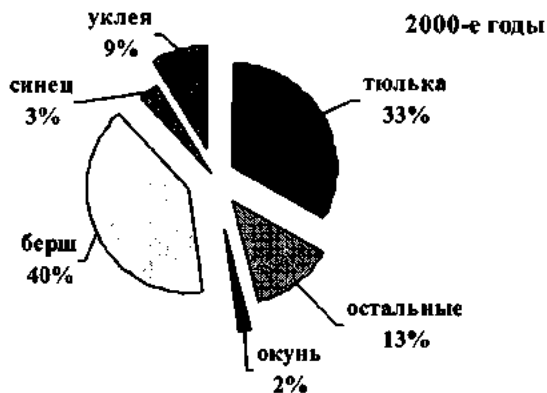


Рис. 5. Состав пищи судака (% по массе) в последние годы.

Dreissena polymorpha (Pall.), в питании берша встречалась *D. bugensis* (Andr.) и *Viviparus viviparus* L. Длина дрейссен в пищеварительных трактах варьировала от 6 до 15,2 мм, а их масса – от 37 до 292 мг.

В питании берша в единичных экземплярах встречались занесенные в Красную Книгу Республики Татарстан узкопалые раки (*Astacus leptodactylus* Esch.).

Различия в степени инвазии судака и берша, вероятно, связаны с существенными различиями в качественном и количественном составе их пищи.

Таким образом, экологическими факторами, приводящими к возрастанию зараженности судака и берша нематодами *Camallanus truncatus*, являются:

- усиление антропогенного воздействия на экосистему Куйбышевского водохранилища, приводящее к изменениям в гидрохимическом, термическом, уровненом режимах;
- изменения в кормовой базе как зоопланктофагов и бентофагов, так и хищников (снижение роли крупных ветвистоусых рачков в структуре зоопланктона, сокращение доли мягкого макрозообентоса, возрастание роли каспийских акклиматизантов, например, тюльки, увеличение доли малоценных сорных карповых рыб);
- изменения соотношения рыб в структуре ихтиоценоза: увеличение доли мелкочастиковых рыб и снижение численности крупных ценных промысловых рыб;
- изменения в питании ценных окуневых рыб – судака и берша: возрастание значения сорных видов – тюльки, уклеи и синца.

- потребление молоди берша, характеризующегося высокой степенью инвазии, как бершом, так и судаком.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болотова Н.Л., Зуянова О.В., Зуянов Е.А., Титова С.В. Акклиматизация судака *Stizostedion lucioperca* и включение его в систему пищевых отношений озера Воже // *Вопр. ихтиологии*. 1995. Т.35, вып.3. С.374-387.
2. Браславская Л.М. Берш // *Распределение и численность промысловых рыб Куйбышевского водохранилища и обуславливающие их факторы*, Казань.- С. 164-169.
3. Браславская Л.М., Махотина М.К. Использование свободной экологической ниши рыбами Куйбышевского водохранилища // *Сб. научных трудов ГосНИОРХ.*- 1988.- Вып.280.- С.34-36.
4. Зуянова О.В. Результаты пробной интродукции судака в озеро Воже // *Сб. науч. тр. ГосНИОРХ*. 1989. № 293. С.80-83.
5. Зусмановский Г.С. Биология судака центральной части Куйбышевского водохранилища: автореф. дис...канд.биол. наук.- Казань 1994.- 21 с.
6. Калайда М.Л. Продукционная характеристика водоемов Среднего Поволжья как базы пастбищной аквакультуры (на примере Республики Татарстан): Автореф. дис. ...доктора биологических наук. - М., 1998.- 58 с.
7. Калайда М.Л. Любарская О.Д. К вопросу о зараженности паразитами синца в Куйбышевском водохранилище // *Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре. Сборник тезисов докладов научно-практической конференции 21-22 ноября 2000 г.* - М., 2000.-С.69-70.
8. Калайда М.Л. История и перспективы развития рыбного хозяйства Татарстана.- Казань: Изд-во «Матбугат йорты», 2001.- 96 с.
9. Калайда М.Л. Экологическая оценка Куйбышевского водохранилища в условиях антропогенного воздействия. - Казань: Казан.гос.энерг.ун-т, 2003.- 135 с.
10. Козловский С.В. Пелагический ихтиокомплекс в Куйбышевском водохранилище // *Тез. докл. Всесоюзн. совещ. «Перспективы рыбохозяйственного использования водохранилищ»*. Киев, 1986.- С.38-39.
11. Кудерский Л.А. Условия существования и перспективы расселения судака водоемов Карелии // *Рыб.хоз-во Карелии*. 1964. Вып. 8. С.154-209.

12. Кудерский Л.А. Рыбы в опасности: некоторые последствия хозяйственной деятельности на внутренних водоемах // Сб. науч. Трудов: Водные биоресурсы, воспроизводство и экология гидробионтов.- М., 1992.- Вып.66.- С.56-70.

13. Методическое пособие по изучению питания и пищевых отношений рыб в естественных условиях.- М.: Наука, 1974.- 254 с.

14. Москул Н.Г. Морфобиологическая характеристика бёрша *Stizostedion volgense* (Gmelin) и его роль в экосистеме водоемов бассейна Кубани.- Автореф. Дис....канд.биол.-наук, Ростов-на-Дону, 2003. 23 с.

15. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т.3. Паразитические многоклеточные.- Л.: Наука, 1987.- 583 с.

16. Попова О.А. Подотряд Percoidae- окуневидные // Аннотированный каталог круглоротых и рыб континентальных вод России. М.:Наука, 1998. С.113-122.

17. Романова Г.П. Питание судака Рыбинского водохранилища // Тр. Биол станции «Борок», вып.2., 1955.- С.307-326.

18. Рыжков Л.П. Озера бассейна северной Ладоги. Петрозаводск: Изд-во Петрозаводского ун-та, 1999.- 204 с.

19. Сакович И.Г. О случае поимки судака *Stizostedion lucioperca* (L.) в Амуре // Вопросы ихтиологии.1985. Т.25. вып.5. С.863

20. Фортунатова К.Р. Методика изучения питания хищных рыб.- Зоол.ж., т.ХХХ, вып.6, 1951.- С. 562-571.

21. Фортунатова К.Р. Методика изучения питания хищных рыб.- Труды совещания по методике изучения кормовой базы и питания рыб, М.: Изд-во Академии наук СССР, 1955.- С. 62-84.

22. Яшанин И.И. Биология судака *Lucioperca lucioperca* (L.) Центрального плеса и Черемшанского залива Куйбышевского водохранилища и особенности формирования его запасов.- Автореф...канд. Дис.,Казань, 1968.- 14 с.

23. Jihav Jihav, Malz Jihav Sladkovodni ryby, Praha : Stbni zemmdmlskm nakladatelstvni,1978. 189 s.

24. Ladiges W., Vogt D. Die Süsswasserfische Europas. Hamburg; Berlin: Parey, 1979. 299 S.

25. Wheeler A. Key to the fishes of Northern Europe. London: Frederick Warne,1978. 380 p.

ROLE OF ECOLOGICAL FACTORS IN DESEASE OF ZANDER AND VOLGA ZANDER

Kalajda M.L.

The Kazan state power university, kalayda@mi.ru

The data on contamination of a zander and Volga zander in top part Kuybyshev's water basins nematodes *Camallanus truncatus* (Rudolphi) are cited. The role of the ecological factors resulting in increase of contamination is shown. The important factor determining contamination, change of a feed of predators in conditions of anthropogenous influence on ecosystem of water basins is.

УДК 597-12+597-169:639.311

МЕТОДЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ЗДОРОВЬЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ ПРИ ЗАВОДСКОМ ПОЛУЧЕНИИ И ТОВАРНОМ ВЫРАЩИВАНИИ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

*А.В. Казарникова, Е.В.Шестаковская
РосрыбНИИпроект*

У осетровых рыб отмечены инфекционные (вирусные и бактериальные), инвазионные (триходиниоз, полиподиоз, диплостомоз и др.), незаразные (некроз жабр, алиментарные заболевания и др.) заболевания. Причиной их возникновения прежде всего являются неблагоприятные условия окружающей среды: повышенное содержание нитратов, тяжелых металлов, пестицидов и др. Основой поддержания здоровья осетровых рыб при заводском получении и товарном выращивании является правильно организованный мониторинг эпизоотического состояния хозяйства. При этом основное внимание следует уделить слабому звену и именно здесь детально контролировать процесс.

ВВЕДЕНИЕ

Основными направлениями в поддержании здоровья осетровых рыб является прогнозирование возможных заболеваний и разработка мер профилактики, а при возникновении заболевания снижения ущерба от него. У осетровых рыб отмечены инфекционные (вирусные и бактериальные), инвазионные (триходиниоз, полиподиоз, диплостомоз и др.), незаразные (некроз жабр, газопузырьковое заболевание, алиментарные заболевания и др.) заболевания.

S.F.Snieszko [14] отмечал, что среди животных (включая рыб) существуют популяции, группы или отдельные особи, которые восприимчивы не все время, а лишь в отдельные моменты к некоторым инфекционным заболеваниям. Автор выдвинул теорию о том, что рыбы обладают определенным уровнем естественного иммунитета к инфекциям, который может поддерживаться через правильное разведение, и что стрессовые факторы окружающей среды снижают эту естественную резистентность (рис. 1).

Самые распространенные стрессоры в водной среде это нитраты, нитриты, хроническое отравление низкими концентрациями пестицидов или тяжелых металлов, низкое содержание кислорода, высокие концентрации CO_2 , скачки pH или температуры, неподходящая соленость, питание, и плотность посадки [10]. Многие из перечисленных факторов определяются количеством и качеством корма, потребляемого рыбой, и его аккумуляцией (рис. 2). Кроме того, внесение большого количества кормов и минеральных удобрений способствует накоплению в прудах зоопланктона и зообентоса, а следовательно и промежуточных хозяев — возбудителей многих опасных заболеваний [2, 3, 5].

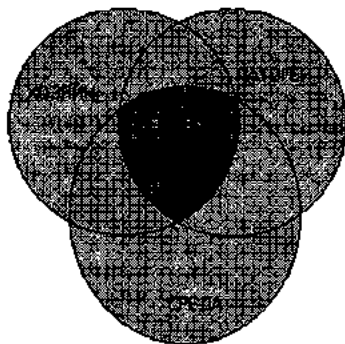


Рис. 1. Взаимоотношение между хозяином, патогеном и средой и как следствие - возникновение заболевания рыб [15].

Опыт показывает, что большинство бактериальных, паразитарных и других заболеваний рыб вызывает их гибель при неблагоприятных условиях окружающей среды. Примером заболеваний, связанных со стресс-факторами окружающей среды, у осетровых рыб являются: вирусные заболевания (*WSAV*, *WSIV*, *WSHV-1*, *WSHV-2*, иридовирус русского осетра), грибковые (сапролегнеоз), бактериальные (флексибактериоз, аэромоназ), незаразные (некроз жабр,

газопузырьковое заболевание, расслоение мышц) (табл. 1).

Так, по устному сообщению Шестаковской Е.В., на одном из рыбоводных заводов увеличению численности триходин и гибели сеголеток осетра и бестера предшествовало прекращение водопада при достаточно высокой температуре воды. А высокая обсемененность молоди осетра *Aeromonas hydrophila* и в дальнейшем отход рыб были отмечены на фоне высокой окисляемости и низкого содержания кислорода в воде бассейнов.

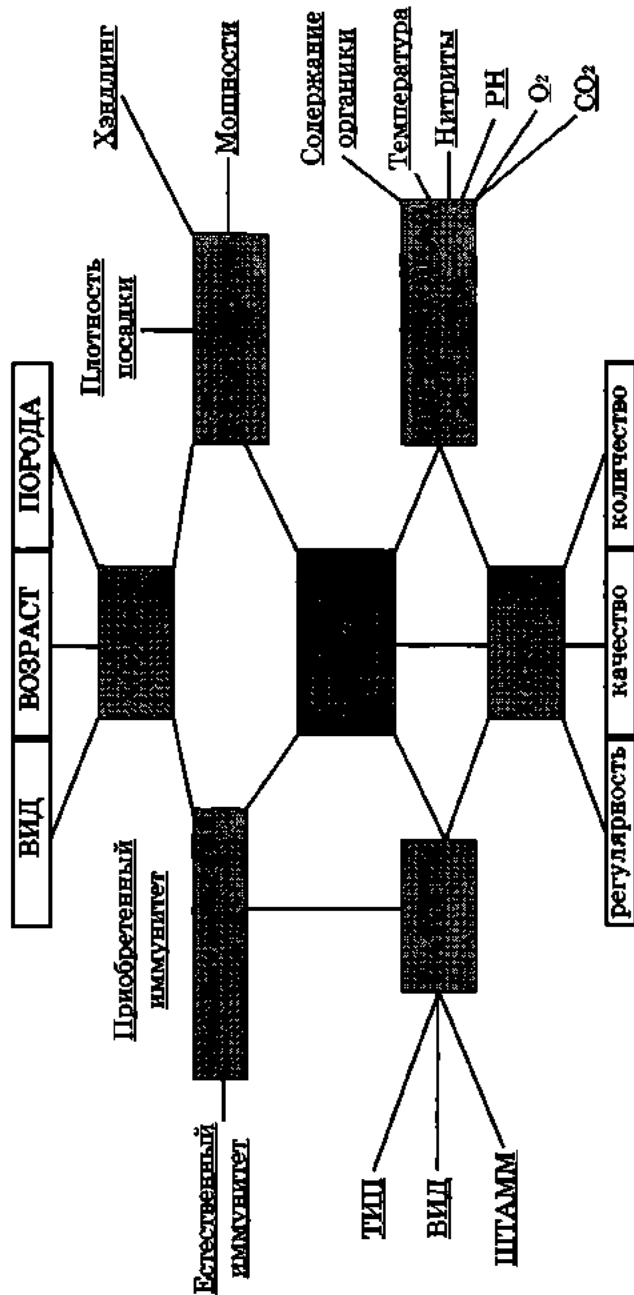
Таблица 1

Заболевания осетровых рыб, связанные со стресс - факторами окружающей среды

Заболевания	Стресс - факторы
Аденовирус белого осетра (WSAV)	Повышенная плотность посадки, низкое качество воды, резкие перепады температур, хэндлинг
Иридовирус белого осетра (WSIV)	
Иридовирус русского осетра	
Гепесвирус белого осетра - 1 (WSHV-1)	
Герпесвирус белого осетра - 2 (WSHV-2)	
Сапролегнеоз рыб	Сверхплотные посадки, неблагоприятные условия среды
Флексибактериоз	Сверхплотные посадки, повышенное содержание органики, хэндлинг
Аэромоноз	Хэндлинг, высокие плотности посадки, неблагоприятный гидрохимический режим
Триходиниоз	Неблагоприятные условия окружающей среды, высокие плотности посадки, повышенное содержание органики, хэндлинг
Некроз жабр	Плохое качество воды: загрязнение органическими веществами, повышенное содержание аммиака
Газопузырьковое заболевание	Плохое качество воды, перенасыщение воды газами
Расслоение мышц	Плохое качество воды, загрязнение воды токсикантами

Стресс - факторы вызывают резкие изменения гематологических показателей культивируемых рыб (снижение числа тромбоцитов, величины лейкокрита и числа лейкоцитов). Возникающая у рыб лейкопения характеризуется эозино- и лимфопенией и повышением числа нейтрофилов [4]. Восстановление гематологических показателей после воздействия стресс - факторов происходило через 14 - 20 суток.

Рис. 2. Взаимодействие условий окружающей среды, биологических факторов, и содержание рыб в аквакультуре, которое воздействует на здоровье рыб и возникновение заболеваний (Pitmb, 1999).



Для возникновения заболевания [11] чаще всего необходимо суммарное воздействие таких стресс - факторов, как низкое содержание кислорода, низкий уровень pH , высокое содержание аммония или высокий уровень CO_2 , причем заболевание может не вызывать ни один из этих факторов в отдельности. Понимание того, какие именно стресс - факторы и в какой степени способствуют развитию заболеваний рыб, а не одна лишь борьба с патогенами или паразитами, дает возможность разработать меры профилактики для предотвращения или снижения до минимума воздействия неблагоприятных условий.

Негативные результаты хозяйственной деятельности человека часто нарушают сформировавшееся в природе равновесие паразит - хозяин, приводя к увеличению их численности. Конечно, идеальным способом борьбы с заболеваниями было бы уничтожение патогена или паразита где бы то ни было. Однако в водной среде это сделать практически невозможно, так как в ней присутствуют факультативные патогены и есть постоянная возможность контакта с инфекционным началом. А необоснованное использование антибиотиков в рыбоводных хозяйствах приводит к возникновению штаммов, резистентных к этим препаратам, и в дальнейшем затрудняет борьбу с бактериальными заболеваниями [8].

В свою очередь знание биологии паразитов и динамики их численности в хозяйствах, эпизоотологии заболеваний, а также взаимодействия их с факторами окружающей среды дает возможность установить очаги инвазий, прогнозировать возможные вспышки заболеваний и своевременно разработать рекомендации по их профилактике.

В наше время, когда выращиванием осетровых рыб занимается все большее количество хозяйств в различных регионах, очень важным фактором поддержания здоровья рыб является контроль за перевозкой рыбопосадочного материала. Ведь легче не допустить проникновения инвазий и инфекций с ввозимыми рыбами, чем вести борьбу с уже начавшейся эпизоотией. Так, в 1998 г. на рыбоводной ферме в Северной Европе М.А. Adkison с коллегами обнаружил иридовирус русского осетра (*Acipenser guldenstadti*). Ранее икра и молодь для этой фермы приобреталась в двух постоянных источниках. В 1993 г при приобретении партии из третьего источника начался массовый отход рыб. После этого заболевание отмечалось ежегодно.

В рыбоводные хозяйства России с икрой канального сомика был завезен паразит *Ambiphrya ameiuri*, широко рас-

пространившийся и вызывающий массовый отход молодежи культивируемых видов рыб.

В свою очередь дегельминтизация зараженной стерляди сантонином помогла предотвратить распространение такого паразита, как *Contracaecum bidentatum*, при акклиматизации стерляди [1].

В США, Канаде, Европе приняты постановления по контролю за перевозкой икры и рыбы, а ряд стран, таких как Япония, активно разрабатывают экстенсивную и всестороннюю программу по контролю за заболеваниями в стране [16].

На любом хозяйстве не обязательно все внимание уделять каждому этапу рыбоводного процесса. Необходимо знать слабое звено и именно здесь детально контролировать процесс, касается это водоподачи, рН, температуры или чего-либо другого. Особенно это становится актуальным при интенсивном ведении рыбного хозяйства.

При выращивании осетровых рыб особое внимание надо уделить источнику инвазии. Трансмиссия инфекционного или инвазионного начала может происходить от рыбы к рыбе, через икру и половые продукты, через пищевую цепь, воду, сети, инвентарь и т.д.

Некоторые заболевания опасны для определенного возраста рыб или определенного вида. В России отмечено такое опасное вирусное заболевание, как весенняя вирусия карпа (ВВК). Экспериментальное заражение вирусом стерляди показало ее высокую устойчивость к вирусу ВВК [7]. Эксперименты, проведенные S.E.LaPatra [12], показали, что мальки белого осетра (*Acipenser transmontanus*) могут быть вектором для вируса инфекционного гематопозитического некроза (IHNV), поражающего радужную форель и ряд видов лососевых.

Во многих случаях молодь более восприимчива к патогенам или паразитам, чем рыбы старших возрастных групп. Так, к триходиниозу особенно восприимчива молодь осетровых рыб. Рыбы старшего возраста являются паразитоносителями. Распространению заболевания благоприятствуют высокие плотности посадки. При выращивании белуги в поликультуре с белым амуром был отмечен переход на них специфичных для растительноядных рыб триходин *Tripartiella bulbosa* [6].

Важным аспектом поддержания здоровья рыб является сбалансированное кормление. Такие элементы, как фосфор, кальций, магний, калий, натрий и др. необходимы для нормального роста и развития рыбы. Нехватка определенных элементов в пище рыб при определенных условиях может

вызывать заболевание. Так, при употреблении фарша из сельди среди осетровых рыб наблюдался отход (*Казарникова, уст. сообщ.*). По литературным данным известно, что приготовление рыбного фарша только из сельди лишает организм рыб витамина В₁.

Рядом ученых доказано, что недостаток специфических элементов увеличивает восприимчивость рыб к заболеваниям. В тоже время их мегадозы способны повысить сопротивляемость организма рыб. Так, канальный сомик при дефиците витамина С был более восприимчив к *Edwardsiella tarda* и *E. ectaluri*, и мегадозы витамина С (в пять раз превышающие рекомендуемые 60 мг/кг корма в день) повысили иммунитет. Добавление в корм производителям лосося повышенных доз витамина С увеличивало концентрацию лизоцима в слизи мальков [11].

Важным направлением в повышении резистентности организма к заболеваниям является использование различных вакцин и иммуностимуляторов. Однако это лишь малая часть комплексного подхода при разведении рыб. Да, мы можем получить больший выход рыбной продукции. Но нельзя забывать, что зачастую применяемые вещества вредят организму рыб. Например, в Норвегии, являющейся лидером по использованию всевозможных вакцин и стимуляторов иммунитета, была отмечена положительная корреляция между использованием иммуностимуляторов и образованием уплотнений в мышечной ткани рыб.

Другой стороной данного вопроса является кратковременность действия препарата. При наличии возбудителя в окружающей среде заболевание через некоторое время может повториться вновь.

Очень важна ранняя диагностика заболеваний. Уже по поведению больных рыб можно отличить от здоровых. Они обычно поднимаются в поверхностные слои воды, начинают заглатывать воздух, теряют координацию движений, не реагируют на приближение человека. Не всегда диагноз можно поставить только по внешним признакам, необходимы более серьезные методы исследования. Однако в любом случае, чем раньше выявлено заболевание, тем раньше можно предпринять меры по лечению и сократить ущерб от заболеваний.

Никто не спорит, что аквакультура — это предприятие с высоким фактором риска в связи с ее динамичным состоянием и взаимосвязью с окружающей средой. Важной составляющей этой системы является качество воды, которое не является одинаковым в разных хозяйствах. Другим фак-

тором риска является наличие возбудителей заболевания. Этот процесс также является динамичным, меняется год от года, зависит от состояния хозяйства, его организации и др.

Хорошо организованный мониторинг эпизоотического состояния хозяйства – основа успешного рыбоводства. Кроме соблюдения рыбоводных требований, наличие информации о том, когда и при каких условиях был отход рыб, позволяет выявить факторы, имеющие наибольшее значение в данный период. Последнее дает возможность прогнозировать эпизоотическую обстановку на хозяйстве, предпринять меры профилактики, подобрать наиболее эффективное лечение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Агапова А.И.* Итоги изучения паразитов рыб в водоемах Казахстана//Тр. Ин-та зоологии АН Казахской ССР – 1957 – т.7 – С.121-130.

2. *Бауер О.Н.* Паразитарные заболевания рыб в прудовых, нерестово-выростных хозяйствах и рыбопитомниках и меры борьбы с ними. В кн.: Основные проблемы паразитологии рыб. – Л., 1958 – С. 267-300.

3. *Бауер О.Н., Мусселиус В.А., Стрелков Ю.А.* Болезни прудовых рыб – М.:Легкая и пищевая промышленность, 1981 – 320 с.

4. *Головин П.П.* Стресс-факторы в индустриальном рыбоводстве, их влияние на рыб и меры предупреждения. Автореферат.....канд. биол.наук.ВНИИПРХ – М., 1984.

5. *Мусселиус В.А., Головин П.П.* Профилактика и лечение рыб в тепловодном хозяйстве//2-е Всес. Совец. По исп. Еплых вод ТЭЦ и АЭС для рыбного хозяйства. Тез. Докл. Друскинентай, 1980. С. 73 – 74.

6. *Сыроватка Н.И.* Паразиты и болезни осетровых рыб Азовского бассейна. Автореферат дисс.....канд. биол. наук. Алма-Ата, 1985. 24с.

7. *Щелкунов И.С.* Вирусные инфекции у осетровых рыб// Рыбное хозяйство. Аквакультура. Болезни гидробионтов в аквакультуре. 2000. Вып.1. С.3-16.

8. *Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Бычкова Л.И.* Перспективы использования субалина для коррекции микрофлоры кишечника рыб и профилактики БГС. //Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре М., 2000. С.133-135.

9. *Adkison M.A., Cambre M., Hedrick R.A.* Identification of an iridovirus in Russian sturgeon (*Acipenser guldenstadti*) from Northern Europe//Bulletin of the EAAP – 1998 - v.18 - N1 – P.29-33.

10. Barton, B.A. 1997. Stress in finfish: past, present and future – a historical perspective. In: Fish Stress and Health in Aquaculture, edited by G.K.Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter, and C.B. Schreck, 1-33. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

11. Plumb J.A. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes//IOWA State University Press/Ames – 1999 – 328p.

12. LaPatra S.E., Groff J.M., Jones G.R., Munn B., Patterson T., Holf R.A., Hauck A.K., Hedrick R.A. Occurrence of white sturgeon iridovirus infections among cultured white sturgeon in the Pacific Northwest//Aquaculture. 1994 – v.126 – P.201-210.

13. LaPatra S.E., Groff J.M., Patterson T.L., Shewmaker W.D., Casten M., Siple J., Hauck A.K. Preliminary evidence of sturgeon density and other stressors on manifestation of white sturgeon iridovirus disease//J. of Applied Aquaculture – 1996- v.6(3)- P.51-58.

14. Sniezko S.F. Natural resistance and susceptibility to infections//The progressive Fish-Culturists, 1958 – V. 20 - P. 133-136.

15. Sniezko S.F. Recent advances of scientific knowledge and development pertaining to diseases of fishes//Advances in veterinary science and comparative medicine – 1974 -V. 17. - P. 291-314.

16. Wakabayashi H., Huh G.J., Kimura N. Flavobacterium branchiophila sp. Nov., a causative agent of bacterial gill disease of freshwater fish // Int. J. Syst. Bacteriol.-1989. - V. 39. – N 1.-P. 213-216.

THE METHODS OF STURGEONS HEALTH MAINTENANCE AT FISH PLANTS AND COMMERCIAL FISH FARMS AT THE PRESENT DAY CONDITIONS.

A.V. Kazarnikova, E.V. Shestakovskaya

The sturgeons suffered from infectious (viral and bacterial), invasions (trichodinioses, polypodioses, diplostomoses etc.), non-infectious (gill necroses, aleментарian diseases etc.). First of all the causative reasons of them are unfavorable environmental conditions: high content of nitrates, heavy metals, pesticides etc. in the water. The main base in sturgeon health maintenance at fish plants and commercial fish farms is to organize proper monitoring of the epizootic situation. In that case main attention have to pay to its weakest link and just at that spot to control the process.

**СОВРЕМЕННЫЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫЕ
МЕТОДЫ БОРЬБЫ С БОЛЕЗНЯМИ РЫБ**

А.Ю. Наумова

ФГУ «Центр ветеринарии», ВНИИР

Приведены литературные данные о применении летования прудов для борьбы с болезнями рыб в рыбоводстве. Показано, что в условиях интенсивного производства и напряженной экологической обстановки осушение прудов (их летование) лишь через 5-6 лет затрудняет оздоровление рыбоводных хозяйств, длительно неблагоприятных по инфекционным и инвазионным болезням.

По результатам эпизоотологического обследования, проведенного с использованием паразитологических, бактериологических и клинических методов диагностики с учетом санитарного и экологического состояния прудов, установлено преимущество противоэпизоотической эффективности осушения нагульных прудов через год (годовая периодичность) с посевом на их ложе зерновых и других культур в сравнении с их осушением через 3-5 лет.

Проведение противоэпизоотических мероприятий включает комплекс ветеринарно-санитарных мероприятий и прежде всего, применение лечебных препаратов, дезинфицирующих средств.

Как показано в Сборнике инструкций по борьбе с болезнями рыб (1999), из лечебных препаратов сегодня нашли применение многие лекарственные средства. При инфекционных заболеваниях, таких как аэромоназ карповых рыб, применяют препараты нитрофуранового ряда (фуразолидон, фуракарп, фурадонин и др.), антибиотики (биомицин, левомицетин, дибимицин, карповит, ветдипасфен и др.), кормовые антибиотики (кормовой биомицин, биоветин, биовит, кормогризин) и другие. Эффективным оказался комплексный препарат – нифулин (биофузол), состоящий из фуразолидона, нитазола, хлортетрациклина гидрохлорида и карбоната кальция.

Против инвазионных болезней также рекомендуют терапевтические средства. Так, против ботриоцефалеза, а также кавиоза и кариофиллеза у карпа в прудовых рыбоводных хозяйствах применяют циприноцестин – 2, действующим веществом которого является фенасал. Против нематодозов, в частности, филометридоза карпа, в прудовых

хозяйствах рекомендуется применять филомецид, действующим веществом которого является нилверм.

Против эктопаразитарных болезней молоди рыб, вызываемых простейшими (хилодонеллой, ихтиофтириусом, триходиной или другими) и возникающих в период их выращивания в мальковых прудах и особенно во время зимовки и при пересадке рыб из зимовальных прудов, также применяют лекарственные препараты в виде ванн (солевые из поваренной соли, комбинированные из смеси поваренной соли, марганцовокислого калия, питьевой соды, хлорной извести, а также ванны из ярко-зеленого, фиолетового К и другие).

В практике рыбоводства используют пробиотики, стабилизирующие микрофлору кишечника и элиминирующие патогенные микроорганизмы рыб. Пробиотики предназначены для профилактики и лечения заболеваний бактериальной и вирусной этиологии, нормализации кишечной микрофлоры при дисбактериозах различной природы. Позволяют смягчать стрессы, вызываемые сменой кормов и технологическими воздействиями на рыб. Служат для повышения резистентности организма и напряженности иммунитета. Увеличивают усвояемость кормов [12].

В качестве дезинфицирующих средств в рыбоводных хозяйствах при возникновении заболеваний и в целях их профилактики рекомендуются и широко применяются (для дезинфекции прудов) негашеная и хлорная известь.

Однако применение указанных лечебных препаратов и дезинфицирующих средств является дорогостоящим и не всегда доступным для хозяйств мероприятием, тем более в настоящее экономически нестабильное время, когда зачастую отсутствуют финансовые возможности у хозяйств и существенно снижено производство самих препаратов и дезинфицирующих средств.

Кроме того, при лечении препаратами в рыбе могут сохраняться их микроколичества, что создает определенную опасность для человека, особенно при применении антибиотиков и нитрофуранов [9]. Попадая в воду, препараты загрязняют водоем и вызывают развитие устойчивости к ним патогенов, что снижает эффективность противоэпизоотических мероприятий.

Использование летования прудов для оздоровления рыбоводных хозяйств.

Успех оздоровительной работы в рыбоводных хозяйствах в целях эффективного производства в них рыбной продук-

ции в значительной степени зависит от экологического состояния рыбоводных прудов и комплекса абиотических и биотических факторов, влияющих на организм рыб.

В этой связи усилия специалистов и ученых в настоящее время направлены на поиск, разработку и внедрение экологически безопасных и экономически выгодных ветеринарно-санитарных и рыбоводно-мелиоративных мероприятий (средств и методов), обеспечивающих эпизоотическое благополучие (паразитарную безопасность и физиологический оптимум условий содержания и повышенную устойчивость к заболеваниям объектов аквакультуры) в рыбоводных хозяйствах. Таким рыбоводно-мелиоративным мероприятием является летование прудов и применение рыбосевооборота.

Летование прудов - это их осушение обычно в течение одного вегетационного сезона, в процессе которого проводятся рыбоводно-мелиоративные и ремонтные работы (гидротехнических и других сооружений) и в неблагоприятных по заболеваниям хозяйствах санитарно-оздоровительные мероприятия. Санация прудов достигается за счет высушивания ложа пруда, уничтожения патогенов, а также промежуточных хозяев паразитов под действием солнечных лучей летом и промораживания в зимний период.

Последующая модификация метода летования, заключающаяся в использовании осушенных прудов под засев сельскохозяйственными культурами, с чередованием рыбоводной эксплуатации прудов и их летования (обычно через 5-6 лет), получила название «рыбосевооборот».

Летование прудов с посевом на их ложе сельскохозяйственных культур нашло широкое применение в рыбоводстве [6, 7]. Через каждые 5-6 лет пруды исключают из рыбохозяйственной эксплуатации, оставляя их на лето и зиму без воды. Для ускорения минерализации иловые отложения разрыхляют и применяют агро-мелиоративные мероприятия. Ложе летующих прудов засевают злаковыми, бобовыми и другими культурами. Это улучшает структуру почвы, обогащает ее биогенами, saniрует и повышает рыбопродуктивность. Рыбохозяйственный эффект летования прудов усиливается при проведении агро-мелиоративных мероприятий в 1,5-2 раза [7, 13]. Обработка ложа прудов в период летования и посев сельскохозяйственных культур (суданской травы, гречихи, кукурузы) использовали для борьбы с зарастаемостью водноприбрежной растительностью рыбохозяйственных водоемов нерестово-выростных хозяйств [13]. Применяли этот метод и для повышения рыбо-

продуктивности выростных прудов.

Показано, что продуктивность прудов зависит от ряда причин, в числе которых рассматривают и особенности почвы прудов [1, 5]. А.И.Батенко [1, 2] указывает, что постоянное избыточное увлажнение почв при длительной рыбоводной эксплуатации прудов приводит к заболачиванию почв, что выражается в их сильном оглеении. Скопление на дне прудов большого количества органических веществ ухудшает физические свойства почвы и вызывает неблагоприятные химические процессы. Гидрохимический режим прудов при этом ухудшается. Снижается их естественная рыбопродуктивность. Даже удобрение прудов и кормление рыбы в таких условиях не дает должного эффекта.

Влияние кратковременного осушения прудов (с августа по октябрь, а также в течение одного вегетационного периода) на некоторые агрохимические показатели иловато-подзолисто-глеевых почв в условиях Московской области было изучено А.И.Батенко [1, 2]. Было показано, что осушение ложа прудов увеличивает процессы аммонификации в почве. Еще в большей степени повышается в почве содержание аммонийного азота, как первой стадии разложения органического вещества, при обработке почвы летующего пруда с последующим засевом викоовсяной смесью.

Метод летования применяли в целях ликвидации опасных заболеваний рыб, в том числе краснухи карпа и др., в рыбоводных хозяйствах многих регионов. Так, в Центральном регионе (Московская обл.) еще в 1937-40 годах был разработан план ликвидации опасного заразного заболевания карпа — геморрагической септицемии с использованием метода летования инфицированных прудов [15]. Практическое его применение было проведено в 1950 — 1953гг. в Левинском рыбоводном хозяйстве Московской области, где это заболевание в сочетании с бранхиомикозом существенно снизило рыбопродуктивность нагульных прудов (до 1,4 ц/га). Для ликвидации заболеваний было применено летование прудов, включающее поочередное их выведение из рыбоводной эксплуатации в течение 3-х лет. В мае и июне ложе прудов значительно высушивалось, что совместно с воздействием прямого солнечного света обеспечивало дезинфекцию поверхностного слоя почвы ложа, в котором находились возбудители бранхиомикоза и бактериальной геморрагической септицемии карпов. Наиболее сухие и быстро просыхающие участки ложа пруда (площадью до 8,5 га — 10% общей площади пруда) засевали викоовсяной смесью.

Заболоченные и увлажненные участки были продезинфицированы негашеной известью из расчета 25ц /га. В течение 3-х лет пруды были оздоровлены. Рыбопродуктивность прудов увеличилась.

А.К.Щербина с соавторами [15] показали также, что применением летования была ликвидирована краснуха карпа в 4-х рыбоводных хозяйствах Краснодарского края: Синюхинском, Фастовецком, Андреевском, Горный цит. Наблюдениями было установлено, что инфекционное начало краснухи карпов сохраняется в почве и после летования, поэтому для полного оздоровления прудов необходимо проводить летование в комплексе с санитарно-профилактическими мероприятиями.

На эффективность летования в борьбе с заразными болезнями рыб в колхозных и совхозных прудах Московской области указывает А.Ю. Шполянская [14]. Последовательное летование прудов в колхозе ХУ партсъезда Ступинского района Московской области с одновременной обработкой пруда культиватором, тщательной дезинфекцией хлорной известью позволили ликвидировать краснуху, сангвиникоз, а также дактилогироз и гиродактилез карпа в данном хозяйстве.

Е.И. Масленникова и В.М. Ивасик [8] показали, что в 50-е — 70-е годы летование широко применяли на Украине. Ежегодно во многих хозяйствах на летование выводили до 20% площади прудов с таким расчетом, чтобы через каждые 4-6 лет пруды снова летовали. На практике это происходило реже. В период летования проводили осушение и вспашку ложа прудов, в отдельных хозяйствах засев прудов сельскохозяйственными культурами, дезинфекцию влажных участков негашеной известью, ремонт гидросооружений.

Авторы указывают, что представление некоторых специалистов (рыбоводов и ихтиопатологов) о том, что путем летования сразу можно ликвидировать всех возбудителей заболеваний, неверно. Практически такого не наблюдается. Это подтвердило изучение опыта проведения летования в прудовых хозяйствах Украины.

Е.И.Масленникова и В.М.Ивасик [8], изучавшие влияние летования прудов на зараженность рыб паразитами в 3-х рыбоводных хозяйствах Украины в течение 15 лет, показали, что летование прудов в значительной степени ограничивает заболеваемость рыб, способствует уменьшению инвазии различными видами паразитов. После летования исчезали простейшие *Costia necatrix*, *Mухobolus cyprini* и другие.

Гельминты, особенно с прямым циклом развития (геогельминты), появлялись на рыбе в первый год эксплуатации прудов, а возбудители с промежуточными хозяевами (биогельминты) — через 3 — 4 года. Через год в хозяйствах не отмечали проявления краснухи. Не были зарегистрированы такие инвазии, как кокцидиоз, костиоз, карофиллез, диплостомоз, миксоспоридиозы. Снизилась зарастаемость прудов жесткой растительностью. При этом существенно улучшались рыбоводные показатели, хотя в целом они были все еще незначительными (4,6-6,9 ц/га).

В.П. Вачинский [3] показал положительное воздействие летования прудов на снижение зараженности рыб цестодами.

Эффективность летования в борьбе с заразными болезнями рыб в прудовых хозяйствах была отмечена и другими специалистами, работающими в рыбоводных хозяйствах Украины. В рыбоводном хозяйстве «Совки» Киевской области летование позволило ликвидировать такие инвазии карпа, как сангвиниколез, дактилогироз, существенно снизить зараженность рыб гиродактилюсами и в меньшей степени хилодонеллой. Автором показано, что для ликвидации такого опасного заболевания, как краснуха, необходимым условием было проведение летования в комплексе с санитарно-профилактическими мероприятиями.

О.Н.Бауэр [4], останавливаясь на анализе эпизоотического состояния рыбоводных хозяйств и современных методах борьбы с болезнями рыб в прудовых хозяйствах, указывал, что огромный ущерб карповодству в его южной зоне (Украина, Северный Кавказ) продолжает наносить краснуха. Не менее половины годовиков рыб, высаживаемых весной на нагул, погибало от этого заболевания. Однако в Северо-западной и Центральной зонах рыбоводства это заболевание в начале 50-х гг. удалось ликвидировать путем карантинирования и летования прудов. В то же время на Украине этот метод оказался не столь эффективным.

В 80-е годы летование как метод повышения рыбопродуктивности старых рыбоводных прудов применялся во многих рыбоводных хозяйствах [6, 10]. Этот метод, направленный на оздоровление неблагополучных по заразным болезням прудовым рыбоводным хозяйствам и поддержание их эпизоотического благополучия, был включен ветеринарной службой в статистическую отчетность.

Однако недостаточная эффективность летования прудов в ряде регионов, особенно в условиях их экологического и эпизоотического неблагополучия и экономической нестабиль-

ности предприятий, вызвала необходимость его совершенствования.

В этой связи был усовершенствован применяемый в течение многих лет метод летования, оправдавший себя во многих регионах в 50-70-е годы и в начале 80-х гг., и оказавшийся не столь эффективным, особенно в экологически неблагоприятных районах, в более поздние годы. Новый метод летования (с укороченной периодичностью) был внедрен в рыбоводном хозяйстве «Ергенинское» Волгоградской области с целью оздоровления его от инвазионных и инфекционных заболеваний.

Летование прудов с периодичностью через 5 лет в условиях интенсивного производства и напряженной экологической обстановки затрудняет оздоровление хозяйства от инвазионных (эктопаразитозы, ботриоцефалез, диплостомоз, постодиплостомоз, миксоболез) и инфекционных (аэромоноз) болезней и вызывает необходимость изменения схемы его проведения. [11]. Автором установлено преимущество противозипзоотической эффективности годичной периодичности летования нагульных прудов с посевом на их ложе зерновых и других культур в сравнении с осушением прудов через 3-5 лет по результатам эпизоотологического обследования, проведенного с использованием паразитологического, бактериологического и клинического методов диагностики с учетом санитарного и экологического состояния прудов.

При летовании прудов через год в илах снижается токсичность. Уменьшение в илах содержания аммонийного азота в 2-3 раза, увеличение количества нитратов оказывает положительное воздействие на гидрохимический режим: уровень рН, аммонийного азота и нитритов снижаются до оптимальных для карповых прудов значений, что обеспечивает благополучие по незаразным болезням и оказывает положительное влияние на увеличение в 1,5-2 раза естественной кормовой базы (зоопланктона и бентоса), создавая благоприятные условия для повышения резистентности рыб при их выращивании. В микробных ассоциациях илов снижается в 1,5-2 раза количество потенциально опасных для рыб псевдомонад и коринеподобных бактерий, восстанавливается микрофлора, обеспечивающая минерализацию органического вещества. Улучшаются санитарно-бактериологические показатели, уменьшается зарастаемость прудов прибрежной и водной растительностью.

Оптимальные зоогигиенические условия в прудах, увеличение естественной пищи при наличии кормов собственного

производства обеспечивают выращивание здоровой рыбы: достоверно улучшаются показатели гемоглобина и СОЭ; снижается в 2-3 раза зараженность экто- и эндопаразитами; не выявляются патогенные штаммы аэромонад, что позволяет уменьшить применение лечебно-профилактических мероприятий.

Внедрение в течение 5 лет измененной схемы летования прудов с годичной периодичностью и рыбосевооборотом в системе противоэпизоотических мероприятий, проводимых на прудах всех категорий, оздоровило хозяйство от аэромоноза, эктопаразитозов, миксоболеза, ботриоцефалеза и существенно снизило эпизоотическую значимость гельминтозов с природной очаговостью (диплостомоза и постодиплостомоза) за счет систематической санации прудов, разрыва жизненных циклов биогельминтов, обеспечило эпизоотическое благополучие и повысило в два раза производство товарной рыбы.

Рекомендуемая схема летования прудов способствовала повышению экономической эффективности рыбоводства за счет повышения производства рыбной продукции, существенной экономии приобретаемых кормов (выращивание зерновых на летующих прудах обеспечивало до 70% потребности рыб в кормах), снижения затрат на лекарственные препараты, дезинфицирующие средства и проводимые противоэпизоотические мероприятия. [11].

Таким образом, эффективным и современным экологически безопасным методом борьбы с болезнями рыб являются технологические приемы, к которым следует отнести усовершенствованную схему летования прудов с посевом сельскохозяйственных (зерновых) культур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батенко А.И. Влияние летования на агрохимические показатели, определяющие плодородие почв // Тр. ВНИИПРХ. Т. 9 - М.-1965 - С.130-142.

2. Батенко А.И. Значение осушения ложа прудов после спуска воды в августе для минерализации почвы // Тр. ВНИИПРХ. Т. 15-1967-С.236-239.

3. Бачинский В.П. Летование прудов как метод борьбы с ботриоцефалезом // Пробл. паразитологии. - Ч. 1 - 1969 - С.348.

4. Бауер О.Н. Тр. совещан. Ихтиологич. комиссии АН СССР - В. 14 - 1962 - С.169.

5. Гусев Е.Е. Химизация рыбоводства М. Россельхозакадемия. 1985. 224с.
6. Канаев А.И. Ветеринарная санитария в рыбоводстве. М: Агропромиздат, 1985. 280 с.
7. Мартышев Ф.Г. Прудовое рыбоводство. М.: Сов. Наука, 1958. 582 с.
8. Масленникова Е.Н., Ивасик В.М. Летование прудов-метод борьбы с заболеванием карпа // Тр.БелНИРХ. Т. 8-1972-С.157-162.
9. Мирзоева Л.М. Контроль за применением химиопрепаратов в рыбоводстве // Сер. Рыбохоз. использование внутренних водоемов. Вып. 8. 1987. – С.15.
10. Наумова А.М., Наумова А.Ю. и др. Летование прудов для обеспечения эпизоотического благополучия и ресурсосберегающих технологий// Сб. научн. Трудов. Ресурсосберегающие технологии в рыбоводстве. М.: МСХА, 1993.-С.31-41.
11. Наумова А.Ю. Влияние периодичности летования прудов на оздоровление рыбоводного хозяйства от инвазионных и инфекционных болезней. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. к.б.н. – М.: ВИЭВ, 2003. – 24с.
12. Пономарев С.В., Гамыгин Е.А., Никоноров С.И. и др. Аквакультура. Технология выращивания и кормления объектов аквакультуры юга России // Астрахань. Нова плюс. 2002г. – 263 с.
13. Тевяшова Л.Е. Агромелиорация рыбоводных водоемов донских нерестовых хозяйств// Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. к.б.н. – М.: ВНИРО, 1974. 31с.
14. Шполянская А.Ю. Эпизоотическое состояние колхозных и совхозных прудов Московской обл. и меры борьбы с заболеваниями рыб// Всес. сов. по биол. основам прудового рыбоводства, 1960; Тр. сов. ихтиол. ком. АН СССР В. 14-М.-1962 – С. 207-210.
15. Щербина А.К. и др. Ликвидация бранхиомикоза и геморрагической септицемии карпов в Ленинском рыбоводном хозяйстве путем применения летования прудов// Тр. ВНИИПРХ т.7, 1954 – М.– Пищепромиздат – С.123-128.

**MODERN ECOLOGICALLY SAFE
METHODS OF STRUGGLE AGAINST DISEASES OF
FISHES**

A.J.Naumova

The literary data on application of summering of ponds for struggle against diseases of fishes in fish culture are given. It

is shown, that in conditions of intensive manufacture and intense ecological conditions drainage of ponds (summering) only in 5-6 years complicates them improvement of fish-breeding facilities, is long unsuccessful on infectious and invasive diseases.

By results of the epizootic inspection which have been carried out with use parasitological, bacteriological and clinical methods of diagnostics in view of a sanitary and ecological condition of ponds, antiepzootic efficiency of drainage of fattening ponds in one year (year periodicity) with crop advantage is established on them bed grain and other cultures in comparison with their drainage in 3-5 years.

УДК: 597-146.31:597.553.2

ПОСЛЕДСТВИЯ РАЗНОКАЧЕСТВЕННОСТИ ИКРЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ КЕТЫ

Oncorhynchus keta (Walbaum, 1792)

Самарский В.Г., Любаев В.Я., Микулин А.Е.

Охотский рыболовный завод ООО «Салмо», МГУТУ

Исследовано влияние на формирование разнокачественности потомства кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum, 1792) исходной разнокачественности по массе икры, как в пределах одной самки, так и в пределах разнообразия половых продуктов, полученных от разных самок. Показано, что масса тела получаемой молодежи и ее размерный ряд в начале периода кормления определяется массой и размерным рядом икринок внутри самки, от которой получена молодежь. Личинки, полученные из икры маленького размера (массы), раньше расходуют запас желточного мешка, по сравнению с одновозрастными, но более крупными. Неодинаковое время, необходимое на полную резорбцию желточного мешка, приводит к тому, что более мелкая молодежь (из мелкой икры), раньше начав питаться, способна в условиях достатка в питании частично компенсировать отставание в росте по сравнению с более крупной молодежью (из крупной икры). Молодь, полученная из более крупной икры, являясь изначально более крупной, обладает более высокими темпами роста, что ставит ее в более выгодные условия роста при достаточном количестве пищи. В процессе роста основное значение в формировании разнокачественности молодежи кеты имеет разнокачественность внутри потомства отдельных самок. При этом потомство одной самки кеты дает широкий спектр изменчивости по массе тела молодежи, характерный для вида.

Изменчивость массы и диаметра икринок, полученных от одной самки, хорошо известна [21, 23, 25, 32, 38, 40, 43, 47].

По данным Н.А. Лемановой [18], у радужной форели формирование размеров ооцитов зависит от скорости отложения желтка, чем больше скорость этого процесса, тем больше конечный диаметр ооцитов. По мнению Е.С. Слущкого [35] причиной разноразмерности овулировавшей икры у рыб является:

- а) различия в расположении внутри яичников и их неравномерное снабжение запасными веществами;
- б) различия в возрасте яйцеклетки в момент овуляции;
- в) различия, обусловленные генетически.

Распределение размеров икринок внутри отдельной самки носит характер нормального с правой или левой асимметрией, в зависимости от специфики вида. Для лососевых характерна левосторонняя асимметрия [13, 33, 37, 47].

Диаметр и средний вес икры кеты коррелируют с размером самок и зависят от времени нереста, уменьшаясь к концу нерестового хода [9, 47, 48]. А. И. Смирнов [38] определяет эту связь как слабую.

Известно существование зависимости между длиной тела личинок и размерами овулировавшей икры [21, 38, 50]. Е.С. Слущкий [35, 36], анализируя данные по 28 видам рыб и собственные данные по сазану, получил связь между размером набухшей икры и длиной тела личинок. Аналогичные результаты получены по кете и кижучу [1, 62].

Более крупная икра при одинаковых температурных условиях дает более длинных личинок, имеющих большее количество желтка, по сравнению с более мелкой икрой. Различия сохраняются у личинок до выхода из бугров [49]. Также более крупная икра продуцирует личинок с более высоким коэффициентом упитанности, чем более мелкая икра [48].

Известно влияние температур инкубации на формирование и конечные размеры личинки [16, 27, 30]. В «теплых» сериях, среди видов рода *Salmo* вылупляются гораздо более морфологически сформированные личинки, чем в «холодных» [28]. В пределах диапазона температур, в котором возможно нормальное развитие, с понижением температуры размер одностадийных зародышей увеличивается [27, 29].

Бихам и другие [49] указывают, что размер икры кеты не оказывает влияния на время вылупления, утилизацию желтка или время выхода из бугров. В более поздней рабо-

те [48], однако, отмечено, что позднерестующие популяции реки Фрезер имеют более мелкую икру и более короткий период от оплодотворения до выхода личинок из бугров, чем раннерестующие популяции [61].

Отмечено, что у семги диаметр икры меньше, чем у балтийского лосося, в связи с чем одинаковые стадии развития наступают у семги при большей степени васкуляризации желточного мешка, чем у балтийского лосося, а молодь балтийского лосося достигает более крупных размеров [30].

У радужной форели (*Parasalmo mykiss*) желток мелких икринок более эффективно используется на формирование тканей эмбриона и личинки, чем у более крупных икринок. Иными словами, личинки, развивающиеся из мелких икринок, более экономично расходуют свои энергетические запасы [54].

Расхождения в темпе роста у личинок рыб обнаруживается сразу после вылупления [23]. Существует мнение, что причиной в расхождении темпов роста в одном помете является разнокачественность икры, а именно, из мелких икринок получается мелкая молодь, а из крупных — крупная [20, 21, 23, 51]. Непосредственно для кеты подобные данные имеются у А.И. Смирнова [38].

При математическом моделировании экспоненциального роста рыб, даже при одинаковой скорости роста, различные первоначальные массы тела рыб приводят к существенной дифференциации по весу в конце эксперимента [6].

Кроме изначальной разнокачественности ооцитов, изменчивость по скорости роста рыб зависит от генетической составляющей, многообразия факторов среды и видовых особенностей поведения [13]. Ю.Ю. Дгебуадзе [6] на основе литературных и анализа собственных данных указывает, что для многих видов рыб экологические факторы перекрывают своим действием наследственные признаки отдельных особей. Генетическая изменчивость размеров тела определяется действием многих генов с малым индивидуальным эффектом. Размеры животных при скрещивании ведут себя как типичные полигенные признаки [22]. Генетическая составляющая индивидуальной изменчивости довольно мала, что делает нецелесообразным индивидуальный отбор по этому признаку [37, 57, 58].

Вариации количества градусодней, требуемых для вылупления и развития, генетически контролируются, и различия между суммами температур, необходимыми для вылупления и выхода личинок из бугров у ранних и позднерестующих популяций, приводят к тенденции сходства време-

ни выхода личинок из бугров [56].

Отстающие в росте личинки и молодь имеют слабое развитие физиологических систем [15], низкую степень дифференциации органов [2, 8, 20]. У отстающих в росте и лидеров, имеется различие в скорости обмена веществ, обусловленное разной степенью развития гипофиза и щитовидной железы, что подтверждается гистологическими данными [20]. Отмечается обратная связь среди одновозрастных осетровых и некоторых видов морских рыб между массой тела и уровнем основного обмена [3, 44]. Есть предварительные данные о более низкой активности пищеварительных ферментов тугорослых особей [45]. У отстающих в росте годовиков семги и каспийского лосося обнаруживается меньшая развитость гонад. У самок этой группы яичники менее развиты, чем у одновозрастной крупной молоди [24].

В настоящее время есть данные, свидетельствующие о повышенной выживаемости потомства, произошедшего от более старых производителей или из более крупных икринок [19, 42, 53, 63]. В той или иной мере это может являться следствием общеизвестного факта о прямолинейной зависимости между выживаемостью и размером молоди лососевых [11].

Из анализа имеющихся литературных источников, следует:

а) Размеры икры варьируют как внутри популяции, так и внутри отдельных самок;

б) От размеров икринок зависит размер получаемых личинок;

в) Имеющаяся начальная (идущая от размеров икры) вариабельность личинок может закрепляться и усиливаться со временем начала внешнего питания;

г) Резкий рост коэффициента вариации у молоди разных видов рыб начинается с момента перехода на внешнее питание;

д) В формировании изменчивости (по массе тела и скорости роста) рыб, и лососевых в частности, ведущую роль играют экологические факторы;

е) Сформировавшиеся по темпам роста группы рыб отличаются по некоторым физиологическим параметрам;

ж) Скорость созревания кеты и формирование в связи с этим возрастной структуры зависят от темпов роста.

Из обзора литературы, однако, так и остается неясным, в какой степени разнокачественность икры по размеру и массе определяет вариационный ряд по массе скатывающейся молоди и каков механизм поддержания размерно-возрастной стабильности нерестовой части популяции.

Целью настоящей работы является изучение последствий

разнокачественности икры имеющейся у отдельных самок кеты и ее влияние на полученных из нее личинок и молоди.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В основу работы положен материал, полученный в период 2002-03 гг. на Охотском рыбоводном заводе (Юго-восточный Сахалин). Для этого была собрана икра от пяти отдельных самок кеты, произведена ее дальнейшая раздельная инкубация и подращивание молоди. Самок отбирали таким образом, чтобы по возможности представить весь спектр ее внутривидовой изменчивости по массе отдельных икринок (табл. 1). Критерием отбора самки для эксперимента являлся исключительно размер икринок, при этом масса тела и линейные размеры самок носили подчиненный характер (табл. 2).

Таблица 1
Изменчивость массы набухших икринок кеты в течение всего нерестового хода 2000 г. на Охотском рыбоводном заводе

Весовая группа, мг.	Встречаемость, %
150-169	0,12
170-189	0,61
190-209	1,71
210-229	4,91
230-249	12,87
250-269	24,55
270-289	25,46
290-309	16,94
310-329	8,93
330-349	3,1
350-369	0,68
370-389	0,09
390-409	0,03

Потомство от каждой самки весь период инкубации и подращивания содержали отдельно. Порядковый номер самки, от которой была взята икра, в последствии соответствовал номеру наблюдаемой партии икры, личинок и мальков.

Сбор икры производили 10.10.02 в течение двух часов. Икру от каждой самки осеменяли отдельным самцом. После набухания икры была измерена масса отдельных икринок в количестве 100 шт. от каждой самки. Инкубацию икры и выдерживание свободных эмбрионов производили в аппаратах Аткинса, прикрытых крышками из защитного оргстекла. Весь период инкубации температура воды составляла 6°C, содержание кислорода в воде 7,5 мг/л.

Таблица 2

Изменчивость массы набухших икринок кеты у отдельных самок, использованных в эксперименте.

№ самки (партии)	1	2	3	4	5
Масса икринки, мг	<u>136</u> 114-166	<u>181</u> 140-214	<u>259</u> 243-274	<u>288</u> 273-301	<u>345</u> 325-365
Коэффициент вариации массы икры	8,46	8,22	2,46	2,01	2,43
Возраст самки	3+	3+	4+	3+	4+
Масса самки (порка), г	1650	1540	2250	2520	3050

Примечание: над чертой - средняя масса икринки, под чертой - минимальная и максимальная масса икринки.

Кормление осуществляли после перевода молоди из аппаратов Аткинса, где происходило выдерживание, в инкубационные аппараты типа «боксы» с габаритами 790x630x450 мм. Начало перевода личинок на внешнее питание определяли по завершению запасов желточного мешка. Кормление производили десять раз в день с 9 утра до 6 вечера с интервалом в 45 минут. Использовали гранулированные корма производства Дании (Aller 514 Oil). Кормили молодь кеты избыточно, чтобы поставить все партии молоди и все размерные группы в пределах партии в одинаковые условия кормления. По мере роста молоди увеличивали объем вносимых кормов, но он всегда превышал то количество, которое молодь могла употребить. В каждом боксе подращивали по 500 шт. молоди от каждой самки. При подращивании расход воды составлял 0,8 л/с в каждом боксе, содержание кислорода в воде 8 мг/л, температура воды 6 °С.

15.06.03 вся молодь была переведена в бассейны с габаритами 800x700x1200 мм. В каждом бассейне содержали по 200 шт. молоди от каждой самки. В период подращивания в бассейнах расход воды составлял 1 л/с для каждого бассейна, содержание кислорода в воде 8 мг/л, температура воды 7,8°С.

В период подращивания в боксах ежедекадно проводили взвешивание молоди по 100 шт. из каждой самки, а в период подращивания в бассейнах такие промеры осуществляли раз в две декады. Для обездвиживания молоди применяли анестетик 2-феноксиэтанол [14]. Все данные получены на живом, нефиксированном материале для избежания изменения массы объекта и получения сопоставимых на разных

этапах развития результатов. Взвешивание производили на электронных весах Sartorius LS 621S с точностью до 0,001 г. Обработку численных данных производили при помощи компьютерной программы Microsoft Excel. Статистическую обработку материала проводили общепринятыми методами [31].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Средний вес зрелых ооцитов сахалинской осенней кеты колеблется от 183 до 300 мг [39]. По нашим данным, полученным за весь период нерестового хода 2000 г., колебания массы набухших развивающихся икринок кеты на Охотском рыбоводном заводе лежали в диапазоне от 150 до 409 мг (Табл. 1). При этом отмечено (Табл. 2) наличие средней величины корреляции между массой самок и массой икринок ($r = 0,4$).

По данным 2003 года и аналогичного материала, полученного ранее [34], установлено (рис. 1), что, чем мельче икра у самки, тем выше ее разнокачественность (коэффициент вариации набухших икринок тесно отрицательно коррелирует со средней массой набухших икринок $r = -0,68$). Это согласуется с литературными данными [26].

Наступление стадии начала пигментации глаз произошло одновременно во всех партиях икры на 39 сутки развития (на 223,8 гр. дн.), а вылупление свободных эмбрионов произошло на 89-94 сутки (по достижению 524 – 555 гр. дн.) независимо от исходной средней массы икринок.



Рис. 1. Связь между средней массой набухших икринок, полученных от отдельных самок, и ее разнокачественностью.

Таким образом, не обнаружено влияния размера икры на темп эмбрионального развития до вылупления у кеты в ус-

ловиях идентичной температуры развития.

Расход запасов желточного мешка происходил неравномерно, раньше он был исчерпан в потомстве тех самок, где масса икринок была меньше (Табл. 3; рис. 2). Однако в потомстве от одной самки резорбция желточного мешка происходила относительно равномерно, несмотря на существенный разброс по массе ооцитов в ее яичниках (Табл. 2).

В потомстве некоторых самок масса остатков желточного мешка у личинок отличалась от среднего его значения более чем в 2 раза, но при этом составляла не более 0,8 – 4,0 % от массы тела личинки, что, видимо, говорит о пропорциональности получения ооцитами от самки протеолитических ферментов и запасных веществ желтка [27, 41].

Начало смешанного питания личинок кеты при средней температуре 7,5 °С отмечено при остатке желтка 70-83 мг, что составляет до 35% от массы тела личинок [39]. В природе кета начинает потреблять пищу, еще находясь в бутре, что обусловлено обилием кормовых организмов, но интенсивность питания при этом незначительна [7, 17]. В условиях рыбоводных заводов Сахалина кормить начинают к моменту, когда масса остатков желточного мешка составляет 7-8% от массы тела. На Охотском рыбоводном заводе перевод на внешнее питание производят при остатке желтка в 2 – 2,5%. Аналогичным образом поступили и мы в опытных партиях личинок, полученных из икры разных самок. При этом личинки от самок, у которых масса икринок была меньше, раньше исчерпали запас желтка и их раньше переводили на кормление.

Таким образом, выявлена четкая зависимость между средней массой набухших икринок и периодом резорбции желточного мешка (см. рис. 2).

Таблица 3

Масса личинок кеты и остатков желточного мешка на момент перевода на внешнее питание

№ самки (партии)	1	2	3	4	5
Масса личинок, мг	$\frac{212}{186-254}$	$\frac{260}{207-323}$	$\frac{363}{340-389}$	$\frac{396}{368-424}$	$\frac{466}{411-495}$
Масса желточного мешка	$\frac{8,5}{2-14}$	$\frac{4,75}{2-10}$	$\frac{4,75}{2-8}$	$\frac{4,3}{1-9}$	$\frac{4,1}{1-8}$
Коэффициент вариации массы личинок	7,14	9,58	3,06	2,57	3,38

Примечание: над чертой - средняя масса, под чертой - минимальная и максимальная



Рис. 2. Зависимость продолжительности резорбции запасов желточного мешка у личинок кеты от начальной средней массы набухших икринок (при температуре воды 6°C).

Следует отметить, что собранные в один день, находившиеся в идентичных условиях и имеющие одинаковый возраст по сумме тепла, партии личинок от самок 1 и 5 (самые крайние значения по средней массе икринок) разошлись по срокам окончания резорбции желточного мешка на 22 суток. В аналогичном эксперименте 2001-2002 гг. такая разница в сроках окончания резорбции желточного мешка составила 23 суток [34].

Масса личинок к моменту начала кормления находится в прямой зависимости от массы набухших икринок, из которых они вылупились (связь между массой набухших икринок и массой личинок можно описать линейной функцией с высокой степенью аппроксимации $R^2 = 0,99$). Причем, полученные данные указывают на то, что не только самки с более мелкой икрой дают более мелких личинок, но и в пределах одной самки более мелкие икринки дают более мелких личинок, в то время как крупная икра – крупных личинок (рис. 3).

Следует отметить, что в потомстве каждой самки (от набухшей икры и до 180 суточной молоди) возрастает коэффициент вариации по массе (рис. 4). При этом, чем больше разнокачественность по массе ооцитов той или иной самки, тем больше будет разнообразие по массе ее молоди при дальнейшем подращивании. Одновременно с этим нами ранее (см. рис. 1) отмечено, что вариабельность массы набухших икринок выше у самок с наиболее мелкой икрой. Увеличение коэффициента вариации по различным признакам от-

мечено и другими авторами [37, 45] при переходе личинок на экзогенное питание.

Нами показано, что увеличение коэффициента вариации по массе с ростом массы тела молоди кеты может быть описано логарифмической функцией (рис. 5,6).

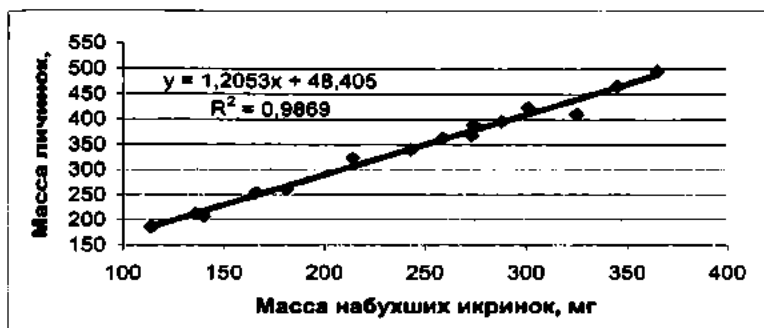


Рис. 3. Зависимость массы личинки в начале кормления от массы их набухших икринок (при температуре 6°C). *Примечание: использованы данные средних и крайних значений массы набухших икринок от каждой самки в отдельности и соответствующие значения массы тела личинок (средние и крайние), выращенных от этих же самок.*



Рис. 4. Зависимость между значениями коэффициента вариации массы набухшей икры и разнообразием по массе тела, выращенной из нее молоди кеты в различные периоды подраживания (через 1, 30 и 180 суток кормления).



Рис. 5. Изменение коэффициента вариации массы тела у молодежи в процессе подращивания (на примере партии молодежи от самки № 4).

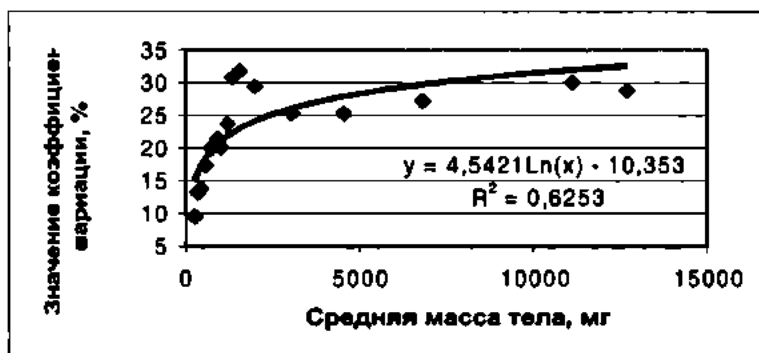


Рис. 6. Изменение коэффициента вариации массы тела у молодежи в процессе подращивания (на примере партии молодежи от самки № 2).

Наблюдающийся на рис. 6 скачок значений коэффициента вариации вызван нарастающей стесненностью условий подращивания их в «боксе» по мере роста молодежи. После пересадки их в более просторные бассейны коэффициент вариации резко снизился и в дальнейшем продолжал расти весьма незначительно.

Таким образом, увеличение плотности посадки молодежи приводит к возрастанию, а менее плотная посадка – к снижению коэффициента вариации по массе тела, не зависимо от интенсивности их кормления. Интересно отметить, что к таким же результатам изменения коэффициента вариации по многим признакам приводит и изменение кормовой базы, то есть ее снижение - к увеличению, а повышение – к сни-

жению коэффициента вариации [26].

Темпы роста с момента начала кормления не только средних, но и максимальных, и минимальных значений массы тела молоди кеты описываются экспонентой с высокой степенью аппроксимации (рис. 7). Это указывает, что в пределах потомков от одной самки происходит закономерное расщепление молоди по размерам на «лидеров» и «аутсайдеров».

В процессе роста молоди кеты достоверность различий по массе их тела между потомством от разных самок снижалась. В смежных партиях порог минимальной достоверности различий по массе был преодолен на 80-120 суток. Но между потомством от самки с самой мелкой икрой и самой крупной различия по массе оставались достоверными до 180 суток кормления (рис. 8), но по наметившейся тенденции в падении достоверности различий по массе в процессе дальнейшего роста молоди эти различия скоро исчезнут. Кормление зависело от исходного размера икры (Рис. 9). В партиях с большей начальной массой икринок за одинаковый период времени кормления молоди, обнаружен больший прирост их массы тела.

При этом рост средних значений массы тела молоди кеты каждой самки на протяжении 180 суток

По нашим данным за 2003 г. и данным аналогичного эксперимента 2002 г. [34], связь между средней массой личинок в начале и через два месяца кормления, носила линейный характер, с высокой степенью аппроксимации (рис. 10), то есть из более крупных личинок вырастает более крупная молодежь. К этому времени молодежь кеты в условиях нашего эксперимента достигала 1-2 г.

В условиях коротких рек начальные размеры икры и, как следствие, личинок, будут определять размерно-весовые характеристики покатников. При этом в более выгодном положении окажутся потомки от самок с крупной икрой.

За период подращивания молодежь с изначально меньшей массой тела в некоторой степени компенсировала отставание в росте за счет более длительного кормления, так как раньше перешла на внешнее питание. Подобный эффект отмечен А.И. Смирновым [39] для потомства карликовых самок нерки, у которых вдвое более мелкие размеры икры и, соответственно, личинок, чем у анадромной нерки. Их потомство переходит на внешнее питание раньше и на более ранних стадиях развития, чем потомки анадромных самок. Более раннее начало питания молоди от карликовых самок компенсирует малый запас желтка их личинок и по-

эволюет нивелировать со временем разницу в размерах с потомками анадромных самок.

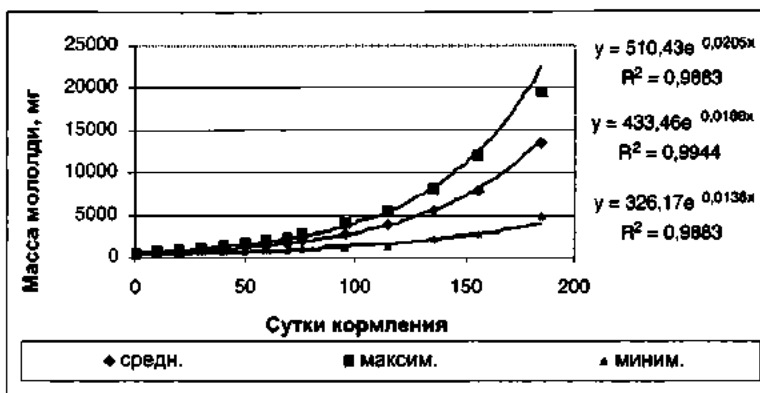


Рис. 7. Темпы роста средней, максимальной и минимальной массы тела молоди кеты (молодь от самки 3) от начала кормления.

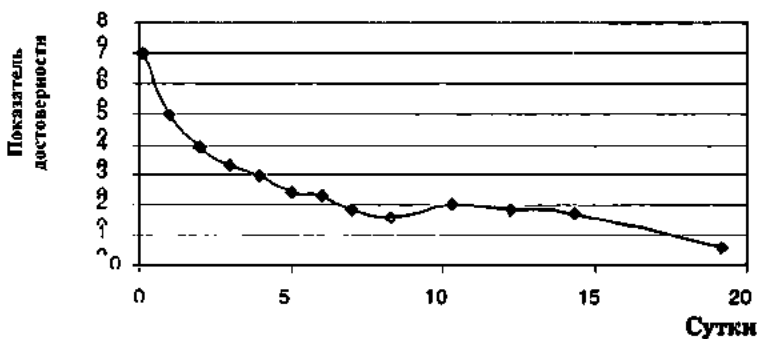


Рис. 8. Изменение достоверности различий по массе тела молоди кеты, выращенных от самок с наиболее крупной и наиболее мелкой икрой.

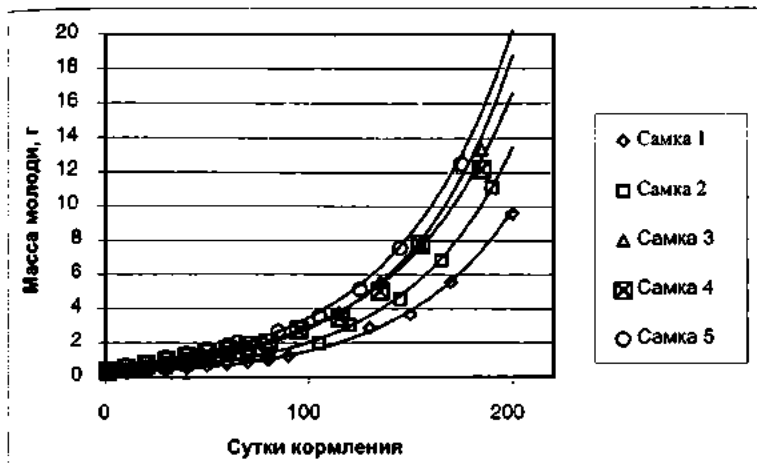


Рис. 9. Темпы роста средней массы тела молоди кеты, полученной от самок с разным размером икры.



Рис. 10. Связь между средней начальной массой личинок на начало кормления и средней массой молоди полученной через 60 суток кормления (по данным 2001-03 гг.).

У молоди кеты в конце экспериментального подращивания масса тела самых мелких и самых крупных экземпляров в каждой партии различалась в 2,5-4,8 раза (табл.4). О подобных различиях крайних значений массы тела молоди как дикой кеты [4, 5, 12], так и одновозрастной, выращенной в искусственных условиях, отмечено в работе А.А. Яржомбека [46].

Данные, полученные нами, показали, что через 180 суток выращивания молоди кеты в одинаковых условиях содержания имевшиеся изначальные различия по распределению массы молоди в потомстве от разных самок исчезли (табл. 4).

Таблица 4
Значения максимальной, средней и минимальной массы тела молоди кеты, полученной за период подращивания их в течение 360 суток от оплодотворения

№ самки	Максимальная, г	Средняя, г	Минимальная, г
1	17,18	11,14	4,29
2	20,97	12,71	5,19
3	21,68	14,67	4,51
4	19,37	13,47	7,59
5	21,74	13,63	6,81

Как у икры, так и у молоди вплоть до 11-14 г, наблюдается нормальное частотное распределение по массе. Это согласуется с данными Ямагиши [64] о том, что у рыб со стайным поведением, не склонным к агрессивности во время питания, коэффициенты вариации массы и длины тела в процессе роста возрастают не так сильно и распределение по массе и длине тела остается близким к нормальному.

ОБСУЖДЕНИЕ МАТЕРИАЛА

Наши исследования показали, что размеры икры определяют темп резорбции желтка, размеры личинок, сроки перехода на активное питание, темп роста и размеры молоди кеты в течение более чем полугода после начала кормления. Причем, чем крупнее была икра у самки, тем крупнее будут и ее потомки. Аналогичная ситуация наблюдается и при подращивании молоди из разноразмерной икры в пределах одной самки [20, 21, 23, 38, 51]. При этом данные по обратному расчислению темпов роста кеты указывают, что медленно растущие особи большее количество лет проводят в море и позже созревают, но при этом достигают большего конечного веса тела и наоборот [25, 26, 52, 59, 61].

Таким образом, выявленные закономерности роста молоди кеты указывают на механизм поддержания стабильности размерно-возрастного состава нерестовой части популяции кеты.

Нами установлено, что разнокачественность по массе тела покатников кеты в значительной степени обусловлена размерной разнокачественностью икры, полученной от разных самок. Многие авторы отмечают [6, 10, 34, 45, 51, 60]

стремительное нарастание изменчивости по массе тела молоди в первые недели кормления. При этом отмечено [20, 21, 23, 51], что исходное положение в размерном ряду определяет развитие дальнейшей весовой иерархии по массе тела и темпам роста.

В эксперименте, проведенном М.Е. Браун [50, 51] с потомством форели, полученным от одной самки в одинаковых условиях содержания, в первые недели самостоятельного питания обнаружены значительные отличия в удельной скорости роста. После 8 недель молодь была отсортирована на две группы: крупных и мелких. В каждой из групп наблюдали за отдельными экземплярами, занимавшими разное место в размерном ряду. Удельная скорость роста была выше у крупнейших в своем ряду особей и наоборот, причем, в обеих группах, крупных и мелких, особи, занимавшие одинаковое положение в своей группе, имели примерно одинаковые удельные скорости роста. Иными словами, не абсолютный размер, а положение в размерном ряду в группе определяло темп роста. Когда изымали крупных особей, мелкие увеличивали свой темп роста. При добавлении крупных, наоборот, замедляли. Автор делает вывод, что иерархия в группе по размеру определяет рост особей в группе. По мнению автора наиболее вероятным было визуальное и тактильное восприятие окружения.

У молоди кеты, вне зависимости от особенностей внесения корма, обнаруживалось установление иерархии в группах кормящейся молоди и увеличение изменчивости рыб. В условиях, когда корм вносился в одной точке бассейна и за него приходилось бороться, иерархия устанавливалась быстрее [60].

В экспериментах с радужной форелью *P. mykiss* показано, что ни избыток корма, ни отсутствие дифференцированных кормовых частиц не повлияло на образование иерархических группировок с доминантными, более агрессивными особями, обладавшими высоким темпом роста [6]. В группах рыб обнаруживаются индивидуальные различия по скорости обучения и эффективности пищевого поведения [55].

Так называемый «иерархический рост» рыб был установлен и в наших экспериментах. Показано, что при изолированном выращивании потомства от отдельных самок с различными исходными размерами икринок в потомстве от каждой самки происходит закономерное расслоение молоди по размерам на «лидеров» и «аутсайдеров», причем на ранних стадиях развития наблюдается максимальный темп ро-

ста коэффициента вариаций по массе тела, снижаясь по мере роста самой массы тела рыб. Следует отметить, что через 180 суток выращивания кеты средние и крайние значения массы тела рыб были близки у потомков исследованных самок, вне зависимости от начальных средних размеров икринок.

Таким образом, популяционное разнообразие обеспечивается независимо от размера икры у той или иной самки.

Казалось бы, возникает противоречие: с одной стороны, размерно-возрастная структура нерестовой части популяции кеты зависит от размерного разнообразия выметанной икры, с другой стороны, каждая самка может обеспечить видовое разнообразие.

Как мы отмечали выше, сам коэффициент вариации по массе тела рыб меняется не только в онтогенезе, но и может меняться в большую или меньшую сторону при воздействии внешних факторов среды, таких как величина кормовой базы или плотность посадки рыб. Мы полагаем, что он изменяется, как следствие иерархического роста, при изменении размерной структуры в процессе роста молоди. Другими словами, чем выше разнообразие самок по размеру икры, тем уже будет разброс их потомков по массе тела, однако при отдельном выращивании потомков любой самки разброс по массе тела ее потомков увеличится, дав видовой диапазон разнообразия (рис. 11). Особенно это наглядно проявляется при удалении наиболее крупных особей, когда у остальных проявляется компенсаторный рост [22].

Таким образом, иерархический рост обеспечивает поддержание размерно-вещового разнообразия популяции при любых исходах нереста.

На основании литературных материалов и собственных данных следует, что в формировании изменчивости по массе тела и скорости роста у кеты в период начала смешанного питания ведущую роль играет изменчивость массы икринок у отдельных самок. В дальнейшем формировании изменчивости молоди по массе и скорости роста ведущее значение принимает изменчивость по массе тела внутри стай одновременно нагуливающейся молоди (откармливаемой в бассейнах). В этих условиях уже сформированная начальная разноразмерность личинок, обусловленная разной массой ооцитов у каждой самки, уступает место формируемой изменчивости внутри стаи, где дальнейшее развитие изменчивости будет контролироваться сложившейся иерархией внутри группы. При этом потомство любой самки кеты по-

тенциально способно дать весь спектр изменчивости массы тела покатной молоди, характерный для вида.

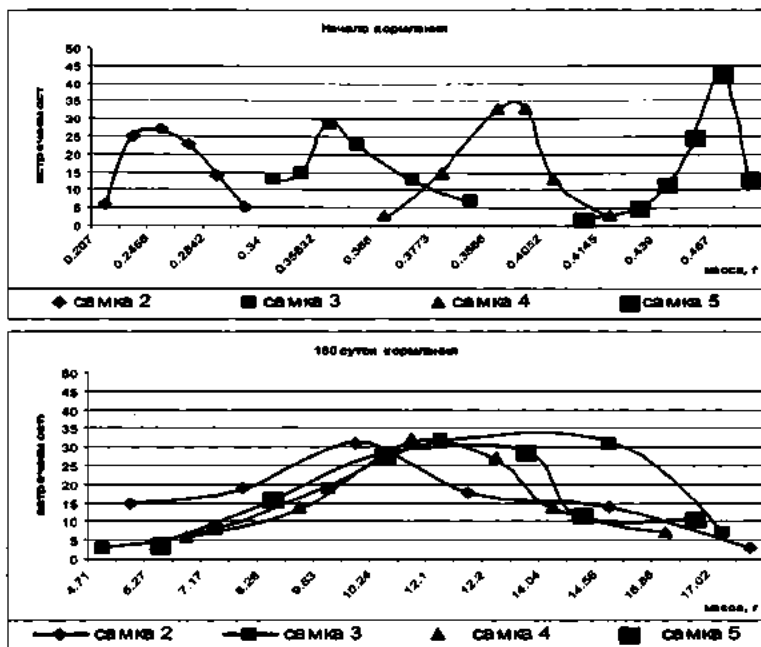


Рис. 11. Коэффициент вариации по массе тела молоди кеты, полученной от разных самок, в начале (верхний) и конце (нижний) эксперимента.

ВЫВОДЫ

1. Разнокачественность икры определяет размерно-весовой состав молоди кеты ко времени окончания запасов желточного мешка. Существует прямолинейная зависимость между средней массой и крайними значениями набухших икринок и таковыми у личинок, полученных из этих икринок на этапе перехода их на внешнее питание.

2. Личинки, полученные из икры маленького размера (массы), раньше расходуют запас желточного мешка, по сравнению с одновозрастными, но более крупными. В условиях постоянства температур существует положительная линейная зависимость между массой набухшей икринки и временем до полной резорбции желточного мешка.

3. Неодинаковое время, необходимое на полную резорбцию желточного мешка, приводит к тому, что более мелкая

молодь (из мелкой икры), раньше начав питаться, способна в условиях достатка в питании частично компенсировать отставание в росте по сравнению с более крупной молодь (из крупной икры).

4. Молодь, полученная из более крупной икры, являясь изначально более крупной, обладает более высокими темпами роста, что ставит ее в более выгодные условия роста при достаточном количестве пищи.

5. В процессе роста основное значение в формировании разнокачественности молоди кеты имеет разнокачественность внутри потомства отдельных самок. При этом потомство одной самки кеты дает широкий спектр изменчивости по массе тела молоди, характерный для вида. Молодь, полученная из более крупной икры, являясь изначально более крупной, обладает более высокими темпами роста, что ставит ее в более выгодные условия при достаточном количестве пищи.

6. Достоверность различий между потомством от самок с разными средними размерами икры начинает снижаться после достижения молодь массы тела 1,5-2 г. Но при этом вариационная структура весовой изменчивости у кеты сохраняется от оплодотворенной икры до достижения молодь средней массы 11-14 г и близка к нормальному распределению.

7. Масса тела получаемой молоди и ее размерный ряд в начале периода кормления определяется массой и размерным рядом икринок внутри самки, от которой получена молодь.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волобуев В.В. Об особенностях размножения кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) (Salmonidae) и экологии ее молоди в бассейне реки Тауй (североохотоморское побережье) // Вопросы ихтиологии. 1984. Т. 24. Вып. 6. С. 953-963.

2. Галкина З.И. Развитие молоди карпа и амурского сазана *Syrpinus carpio* L. с разной скоростью роста // Изв. ГосНИОРХ. 1964. Т. 58. С. 167-180.

3. Гершанович А.Д., Пегасов В.А., Шатуновский М.И. Экология и физиология молоди осетровых рыб. М.: Агропромиздат, 1987. 215 с.

4. Гриценко О.Ф. Приходные рыбы острова Сахалин (систематика, экология, промысел). М.: Издательство ВНИРО. 2002. 248 с.

5. Гриценко О.Ф., Ковтун А.А., Косткин В.К. Экология

и воспроизводство кеты и горбуши. М.: ВО «Агропромиздат», 1987. 166 с.

6. Дзегбуадзе Ю.Ю. Экологические закономерности изменчивости роста рыб.- М.: Наука, 2001. 276 с.

7. Дислер Н.Н. Развитие осенней кеты р. Амура *Oncorhynchus keta* (Walbaum) // Тр. Ин-та морфологии животных им. А.Н. Северцова. М.: Изд-во АН СССР, 1957. Вып.20. С. 3-70.

8. Емельянов С.В. Разнокачественность на стадии выклева личинок осетровых и костистых рыб, полученных из икры одной самки // Теоретические основы рыбоводства. М.: Наука, 1965. С. 187-204.

9. Каев А.М. Биологическая структура и формирование численности курильской кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) // В сб.: Динамика численности промысловых животных дальневосточных морей. Владивосток. 1986. С. 53-62.

10. Каев А.В., Ромасенко Л.В. Формирование изменчивости по длине тела у горбуши и кеты в раннем онтогенезе. // Вопросы рыболовства. М.: «Национальные рыбные ресурсы». 2001. Приложение 1. С. 113.

11. Канидеев А.Н. Биологические основы искусственного разведения лососевых рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 216 с.

12. Карпенко В.И. Ранний морской период жизни тихоокеанских лососей. М.: Изд-во ВНИРО, 1998. 165 с.

13. Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. Л.: Наука, 1987. 520 с.

14. Климонов В.О., Никоноров С.И., Витвицкая Л.В. Справочник по применению анестезирующих веществ в рыбоводстве. М.: Медицина, 1995. 169 с.

15. Королева Н.В. Устойчивость молоди семги к различной солености воды // Научно-техн. бюл. ГосНИОРХ. 1960. № 12. С. 33-34.

16. Крыжановский С.Г. Эколого-морфологические закономерности развития карповых, вьюновых и сомовых рыб // Тр. Ин-та морфол. Животных АН СССР. 1949. Вып. 1. С. 186-195.

17. Леванидов В.Я. Выращивание молоди амурской осенней кеты на рыбоводных заводах // Труды совещаний АН СССР ихтиол. комиссия. 1957. Вып. 7. С. 219-226.

18. Леманова Н.А. Сравнительный анализ процесса вителогенеза у разновозрастных самок радужной форели, впервые и повторно участвующих в нересте // Изв. ГосНИОРХ. 1974. Т. 97. С. 159-168.

19. Маркевич Н.Б., Виленская Н.И., Кинас Н.М. Скот горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walb.) из р. Утка (Западная Камчатка) и определяющие его факторы (анализ многолетних данных) // Исследования биологии и динамики численности рыб камчатского шельфа. П-Камчатский: КОТИНРО. 1993. Вып. 2. С. 87-99.

20. Матвеев Б.С. Индивидуальные различия темпов роста и дифференцировки осетровых рыб в условиях искусственного разведения // Тр. Ин-та морфологии животных им. А.Н. Северцова. 1951. Вып. 5. С. 156-163.

21. Мейен В.А. О причинах колебания размеров икринок костистых рыб // ДАН СССР. 1940. Т. 28. № 7. С. 453-460.

22. Мина М.В., Клевезаль Г. А. Рост животных. М.: Наука, 1976. 291 с.

23. Морозов А.В. О расхождении в росте молоди рыб и причинах этого расхождения // Зоологич. журнал. 1951. Т. 30. Вып 5. С. 457.

24. Мурза И.Г. Сравнительный гистологический анализ состояния воспроизводительной системы заводской и естественной молоди лососей // Лососевидные рыбы. Л.: Наука, 1980. С. 262-269.

25. Никольский Г.В. Экология рыб. М.: Высшая школа, 1974. 357 с.

26. Никольский Г.В. Теория динамики стада рыб. М.: Пищевая промышленность, 1974. 447 с.

27. Новиков Г.Г. Рост и энергетика развития костистых рыб в раннем онтогенезе. М.: Эдиториал УРСС, 2000. 296 с.

28. Павлов Д.А. Влияние температуры на ранний онтогенез семги *Salmo salar* L. (Salmonidae). 1. Изменчивость морфологических признаков и продолжительности развития семги при разной температуре // Вопросы ихтиологии. 1984. Т. 24, вып. 5 С. 794-802.

29. Павлов Д.А. Влияние температуры на ранний онтогенез семги *Salmo salar* L. (Salmonidae). 2. Рост зародыша и потребление желтка в процессе развития при низкой температуре // Вопросы ихтиологии. 1985. Т. 25. Вып. 1. С. 116-126.

30. Павлов Д.А. Лососевые (биология развития и воспроизводство). М.: Изд-во МГУ, 1989. 216 с.

31. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Изд-во Моск. гос. ун-та, 1970. 367 с.

32. Расс Т.С. Географические параллелизмы в строении и развитии костистых рыб. Изд. МОИП. 1941. 60 с.

33. Савостьянова Г.Г., Слуцкий Е.С. О разноразмерности

икринок радужной форели // Изв. ГосНИОРХ. 1974. Т. 97. С. 159-168.

34. Самарский В.Г., Любаев В.Я. Влияние разнокачественности половых продуктов на потомство при их искусственном воспроизводстве // Сборник научных трудов молодых ученых МГТА. М.: МГТА, 2002. Вып. II. С. 34-44.

35. Слуцкий Е.С. Изменчивость икры и личинок сазана Цимлянского водохранилища // Изв. Гос. НИИ озер. и реч. рыб. хоз-ва. Л. 1971. Т. 74. С. 62-86.

36. Слуцкий Е.С. Изменчивость размеров овулировавшей икры белого амура // Изв. Гос. НИИ озер. и реч. рыб. хоз-ва. Л. 1971. Т. 74. С. 128-139.

37. Слуцкий Е.С. Фенотипическая изменчивость рыб (селекционный аспект). Изменчивость рыб // Известия ГосНИОРХ. Л. 1978. Т. 134. С. 3-132.

38. Смирнов А.И. Вопросы рационализации биотехники разведения лососей на Сахалине // Труды совещаний АН СССР. Ихтиологическая комиссия. 1954. Вып. 4. С. 94-110.

39. Смирнов А.И. Размножение и развитие тихоокеанских лососей. М.: Наука, 1975. 334 с.

40. Соколов Л.И. Созревание и плодовитость сибирского осетра (*Acipenser bari* Вг.) реки Лены // Вопросы ихтиологии. 1965. Т. 5. Вып. 1. Т. 34. С. 70-81.

41. Тимейко В.Н., Новиков Г.Г. Развитие протеолитической активности в желудке семги в процессе личиночного развития // Вопросы ихтиологии. 1987. Т. 27. Вып. 2. С. 300-306.

42. Тихенко В.Ф. Зависимость выживаемости потомства на ранних этапах жизни от возраста, повторного нереста и размера самок атлантического лосося // Сб. науч. Тр. Гос. НИОРХ. 1985. № 235. С. 75-82.

43. Турдаков Ф.А. Возрастной отбор // Ж. Общ. биологии. 1943. Т. 4. № 3.

44. Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 1980. 283 с.

45. Шатуновский М.И. Механизмы и адаптивное значение размерно-весовой изменчивости молоди рыб // Вопросы рыболовства. Приложение 1. М.: Национальные рыбные ресурсы, 2001. С.296.

46. Яржомбек А.А. Справочные материалы по росту рыб: Лососевые рыбы. М.: Изд-во ВНИРО, 2000. 110 с.

47. Ястребков А.А. Индивидуальная и внутривидовая вариабельность размеров икринок горбуши и кеты // Тр. Мурманского биол. ин-та. 1965. Вып. 9. Т. 13. С. 26-32.

48. Beacham, T.D., Murray C.B. Comparative developmental biology of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) from the Fraser River, British Columbia. // Can. J. Fish. Aquat. 1986. V. 43. P. 252-262.

49. Beacham, T.D., Withler F.C., Morley R.B. Effect of egg size on incubation time and alevin and fry size in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) and coho salmon (*O. kisutch*). // Can. J. Zool. 1985. V. 63. P. 847-850.

50. Brown M.E. The growth of brown trout (*Salmo trutta* Linne). I. Factors influencing the growth of trout fry. // J. Exp. Biol. 1946.V. 22, N 3-4. P. 118-129.

51. Brown M.E. The growth of brown trout (*Salmo trutta* Linn). II. The growth of two-year-old trout. // J. Exper. Biol. 1946. V. 22, N 3-4. P. 130-144.

52. Helle J.H. Influence of marine environment on age and size at maturity, growth, and abundance of chum salmon, *Oncorhynchus keta* (Walbaum), from Olsen Creek, Prince William Sound, Alaska. Ph. D. thesis, Oregon State University, Corvallis, OR. 1979. 118 p.

53. Helle J.H. Relation between size-at-maturity and survival of progeny in chum salmon, *Oncorhynchus keta* (Walbaum) // J. Fish Biol. 1989. V. 35. Suppl. A. P. 99-107.

54. Kamler E., Kato T. Efficiency of yolk utilization by *Salmo gairdneri* in relation to incubation temperature and egg size // Pol. Arch. Hydrobiol. 1983. Vol. 30. P.271-306.

55. Kieffer J.D., Colgan P.W. Individual variation in learning by foraging pumpkinseed sunfish, *Lepomis gibbosus*: The influence of habitat // Anim. Behav. 1991. Vol. 41. P. 603-611.

56. Kosk, K.V. The survival and fitness of two stocks of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) from egg deposition to emergence in a controlled-stream environment at Big Beef Creek. Ph.D. thesis. University of Washington, Seattle, WA. 1975. 212 p.

57. Moav R., Wohlfarth G.W. Two-way selection for growth rate in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) // Genetics. 1976. Vol. 82. N 1. P. 83-101.

58. Purdom C.E. Genetics of growth and reproduction in teleosts // Fish phenology: anabolic adaptivness in teleosts N. Y.: Acad. Press, 1979. P. 207-217.

59. Rikker W. Ocean growth & mortality of pinc & chum salmon // J. Fish. Res. Bd. Can. 1964. V. 21. N. 5. P. 903-931.

60. Ryer C.H., Olla B.L. The influence of food distribution upon the development of aggressive and competitive behaviour in juvenile chum salmon, *Oncnrhynchus keta* // J. Fish Biol. 1995. Vol. 46. P. 264-272.

61. Salo E. Life history of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) / Pacific Salmon Life Histories. Ed. Grout C., Margolis L. UBC Press, Vancouver. 1995. P. 230-308.

62. Silverstein J.T., Hershberger W.K. Precocious of the additive genetic variance // J. Hered. 1992. V. 83. N 4. P. 282-286.

63. Wallace J.C., Aasjord D. An investigation of the consequences of egg size for the culture of arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) // J. Fish Biol. 1984. V. 24. N 4. P. 427-435.

64. Yamagishi H. Comparative study on the growth of the fry of three races of Japanese crucian carp, *Carassius carassius* L., with special reference to behaviour and competition // Jap. J. Ecol. 1965. V. 15. N 1. P. 100-113.

**CONSEQUENCES OF CAVIAR DIFFERENCE IN
ONTOGENESIS OF KETAS ONCORHYCHUS KETA
(WALBAUM, 1792)**

**Samarskiy V.G., Ljubaev V.J., Mikulin A.E.
Ochotskiy fish-breeding factory of Open Company
«Salmo», MGTUM, Moscow**

Influence on formation of posterities difference of keta *Oncorhynchus keta* (Walbaum, 1792) initial difference on weight of caviar is investigated, both within the limits of one female, and within the limits of a variety of the sexual products received from different females. It is shown, that the weight of a body of received young fish and its dimensional line in the beginning of the period of feeding is defined by weight and a dimensional line cavies inside female from which it is received. The young fish, received from caviar of the small size (weight), spend a stock of a yolk bag, in comparison with one-age, but larger earlier. The unequal time necessary on full resorption of a yolk bag, results to that finer young fish (from fine caviar), earlier having begun to eat, is capable in conditions of a prosperity in a feed in part to compensate backlog in growth in comparison with larger young fish (from large caviar). The young fish, received from larger caviar, being initially larger, has higher rates of growth that lays down it in more favourable conditions of growth at enough of food. During growth the major importance in formation of difference of ketas young fish has difference inside posterity separate females. Thus the posterity of one female of a keta gives a wide spectrum of variability on weight of a body of young fish, characteristic for a kind.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ «ЗООНОРМ» И «БИФИДУМ-СХЖ» НА МОЖАЙСКОМ ПЭРЗ

Е.С. Трифонова, Л.И. Бычкова, Л.Н. Юхименко, В.Д. Болотов

Анализируются материалы исследований эффективности влияния пробиотических препаратов «Зоонорм», «Бифидум-СХЖ» на темпы роста, выживания, контаминацию тканей и органов микроорганизмами на примере мальков и годовиков окской стерляди. Показаны повышение темпов роста, выживания и снижение обсемененности тканей внутренних органов микроорганизмами при использовании пробиотиков в составе комбикормов.

Индустриальное рыбоводство - это перспективное направление в аквакультуре. Его быстрое развитие обусловлено объективными причинами: сокращением уловов рыбы в естественных водоемах и возрастающим спросом на деликатесную продукцию. Тенденция к снижению уловов осетровых в последние годы носит устойчивый характер. Восстановление производства товарного осетра до его прежнего уровня может быть связано с новыми нетрадиционными методами рыборазведения. Создание рыбоводных комплексов с использованием установок замкнутого типа с технологией круглогодичного выращивания позволит увеличить объем производства осетровых рыб, не считая прибавки за счет роста промвозврата при зарыблении водоемов рыбопосадочным материалом [1].

Большой вклад в получение рыбной продукции вносят рыбоводные предприятия с замкнутым циклом водообеспечения (УЗВ). Короткий цикл выращивания товарной рыбы, содержание ее на всех этапах рыбоводного процесса на малых площадях при высоких плотностях посадки обеспечивают сохранность рыбы и повышают выход рыбной продукции.

Выращивание рыбы в установках с замкнутым циклом водообеспечения не решает проблемы болезней рыб. Наибольший ущерб наносят бактериальные заболевания - аэромоназ, флексибактериоз и др. Применение терапевтических препаратов (антибиотиков) в замкнутых системах не дает положительного эффекта из-за уничтожения полезных микроорганизмов биофильтра и, как следствие, ухудшение качества рециркулируемой воды. Назначение лечебных препаратов по традиционной схеме, как правило, эффекта не

даёт, а увеличение дозировки может ухудшить ситуацию. В ассоциациях чувствительность к антибактериальным препаратам у разных представителей микробиоценоза не одинаковая. Подавляя рост одних микроорганизмов, они создают условия для размножения других, способствуя развитию дисбактериоза. Поэтому первостепенное значение в хозяйствах, использующих установки с замкнутым циклом водообеспечения, приобретает комплекс профилактических и пробиозепизоотических мероприятий.

В настоящее время большой интерес для медицинской, ветеринарной и рыбоводной практики представляют данные по использованию препаратов – пробиотиков, обладающих широким спектром антимикробной и иммуномодулирующей активности.

Пробиотики в отличие от антибиотиков, не оказывают отрицательного воздействия на нормальную микрофлору, поэтому их широко применяют для профилактики и лечения дисбактериозов. Важной особенностью пробиотиков является их способность повышать противоинфекционную устойчивость организма, оказывать в ряде случаев противоаллергическое действие, регулировать и стимулировать пищеварение [2, 3].

В медицине и ветеринарии уже широко используют лактобактерин, бифидум-бактерин, колибактерин, бификол, ацилакт и др. (Алешкин, 2002).

В рыбоводстве России и государствах СНГ для профилактики бактериальных заболеваний в последние годы также предпочтение отдаётся биологическим препаратам – пробиотикам, повышающим иммунный статус рыб.

С целью отработки методов профилактики бактериальных и алиментарных болезней рыб в 2002 году на Можайском производственном экспериментальном рыбоводном заводе были начаты испытания по применению препаратов «Зоонорм» и «Бифидум – СХЖ», содержащих антагонистически активные бифидобактерии. Препараты были любезно предоставлены ЗАО «Партнёр». В эксперимент была взята стерильная окской популяции в возрасте малька и годовика. Эксперимент проводился в два этапа.

В первый этап эксперимента был взят препарат «Зоонорм» с добавлением измельчённого активированного угля. Препарат применяли для коррекции микрофлоры кишечника рыбы и нейтрализации токсического воздействия некачественного комбикорма с истекшим сроком годности. Для этого была отобрана наиболее ослабленная и отбракован-

ная рыба. Среди отобранной рыбы отмечались экземпляры с нарушением координации (вертёж) и вздутием брюшка. В ходе эксперимента были сформированы четыре группы рыб по 200 шт., содержащиеся в одном цикле и в разных бассейнах. В одном бассейне молодь окской стерляди получала токсичный комбикорм с препаратом «Зоонорм». В другом бассейне - корм с отрубями и «Зоонормом». Отруби моделировали нейтральный корм и содержали чистую клетчатку.

В третьем бассейне контрольной группе рыб давали только токсичный комбикорм. Контрольная группа рыб четвертого бассейна получала только корм из отрубей. Экспериментальное кормление проводили в течение 10 дней.

За период кормления отхода рыбы в опытных бассейнах не было. Среди рыб контрольной группы, получавших токсичный комбикорм, отмечали единичную гибель рыбы (Табл. 1).

Таблица 1

**Эффективность выращивания мальков окской стерляди
в зависимости от использованных кормов**

Условия содержания и кормления	Число экземпляров, исходное / после опыта	Масса тела, г (Me±J ₉₅)		Прирост	
		исходная	через 10 дней	грамм	%
Контроль, комбикорм, басс. № 6	200/196	21,2 (19,0 + 24,8)	28,2 (23,4 + 29,0)	7,0	33,0
Опыт №1, отруби, басс. № 8	200/200	23,8 (20,0 + 24,5)	32,0 (28,4 + 32,5)	8,2	34,0
Опыт №2, комбикорм + «Зоонорм», басс. № 4	200/200	17,8 (15,5 + 18,5)	29,7 (27,5 + 30,0)	11,9	66,8
Опыт №3, отруби + «Зоонорм», басс. № 5	200/200	19,8 (18,5 + 20,0)	27,1 (25,0 + 28,5)	7,3	37,0

Примечание: Для данной серии опытов препарат «Зоонорм» был специально расфасован во флаконы с общим содержанием $1 \cdot 3 \cdot 10^9$ КОЕ бифидобактерий. При израсходовании одного флакона на 200 экземпляров рыб, каждая особь получала $\frac{1 \cdot 3 \cdot 10^9}{200} = 0,5 - 1,5 \cdot 10^7$ бифидобактерий

У рыб опытных групп наблюдались снижение уровня контаминации, что, вероятно, связано с активацией процессов клиренса, и элиминации внутренних органов от условно-патогенных микроорганизмов. У рыб, получавших комбикорм с «Зоонормом», отмечен только единичный рост микроорганизмов (60%), у рыб, получавших корм с отрубями и «Зоонормом» -

единичный рост (20%) и умеренно – обильный рост (20%). В то время как у контрольной рыбы умеренно – обильный рост микроорганизмов составлял 40%, а единичный - 20%, что свидетельствовало о снижении иммунитета контрольной рыбы. Результаты исследований представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Уровень контаминации и микробиоценоз рыбы

Условия	№ экз.	Исследованный орган	Питательная среда Эндо, число колоний	Микробиоценоз
1	2	3	4	5
Бассейн № 4	1	К-к	< 10	<i>E.coli</i> с бронзовым блеском
	2	Пч	< 10	<i>E.coli</i>
		К-к	< 10	<i>A. sp. 9, A. Hydrophila</i>
	3	К-к	< 10	<i>E.coli, A. hydrophila</i>
	4	Пч	< 10	<i>A. hydrophila</i>
К-к		< 10	<i>E.coli</i>	
5	К-к	> 100	<i>E.coli</i>	
Бассейн № 5	6	П, пч, к-к	> 100	<i>E.coli</i> с бронзовым блеском
	7	П, пч	< 10	<i>A. hydrophila, A. sp. 1</i>
		К-к	< 50	<i>A. sp. 1</i>
	8	К-к	< 10	БГКП
	9	К-к	< 50	<i>Proteus sp., A. hydrophila</i>
11	Пч	< 50	<i>E.coli</i> с бронзовым блеском	
	К-к	< 10	<i>E.coli</i> с бронзовым блеском	
Бассейн № 8	12	Пч	< 10	<i>E.coli</i> с бронзовым блеском
	14	П, пч	< 50	<i>E.coli</i> с бронзовым блеском
	15	К-к	> 100	<i>E.coli</i>

Для установления уровня контаминации рыб исследовали печень (п), почки (пч) и содержимое кишечника (к-к) – от каждой рыбы три пробы, в каждой группе 15 проб.

Второй этап эксперимента по применению бифидобактерий в кормлении осетровых рыб был проведён на рыбе более старшего возраста. Основанием для проведения второго этапа эксперимента снова стало длительное скармливание токсичного корма с истёкшим сроком годности и ухудшение эпизоотического состояния выращиваемой рыбы. В эксперимент был взят годовик окской стерляди.

При обследовании рыбы в бассейнах отмечались отдельные экземпляры с нарушением координации (вертёж), вздутым брюшком, с покраснениями брюшка, области вокруг анального отверстия, кровоизлияниями в ткань плавников. Отмечались патологические изменения внутренних органов: печень рыхлая и очень тёмного цвета, кишечник наполнен газами и вздут, слизистая кишечника воспалена.

Зависимость контаминации печени и почек от условий содержания и кормления

Условия содержания и кормления	Контаминированность органов по уровням, %		
	отсутствие роста	единичные колонии	умеренный и обильный рост
Контроль, комбикорм, басс. № 6	40,0	20,0	40,0
Опыт № 2, комбикорм + «Зоонорм», басс. № 4	40,0	60,0	0
Опыт № 3, отруби + «Зоонорм», басс. № 5	60,0	20,0	20,0

Для эксперимента снова были сформированы 4 группы рыб по 60 шт. в каждом бассейне. Для кормления рыбы взяты препараты с бифидокультурами «Зоонорм» и «Бифидум – СХЖ».

Первая группа рыб получала комбикорм с «Зоонормом». Вторая группа рыб получала комбикорм с «Бифидум – СХЖ». Третья и четвертая группы рыб составляли контрольную группу и получали только токсичный корм. Кормление рыбы проводилось в течение 9 дней. Во время эксперимента отхода рыбы не было ни в одном бассейне (Табл. 4).

Состояние рыбы в опытных бассейнах улучшилось. Отмечено улучшение состояния внутренних органов рыб - печени по цвету и консистенции (более светлый оттенок и уменьшение рыхлости), отсутствие в кишечнике газов. У рыб контрольной группы отмечалось ухудшение состояния - развитие некроза почек, увеличение слизи в кишечнике. Одновременно наблюдали увеличение массы тела рыбы в опытных группах на 14,0 и 18,7% против 4,9 и 9,9% в контрольных.

В условиях замкнутой системы Можайского рыбзавода получены положительные результаты на мальках и годовиках стерляди окской популяции. Бактериологические исследования внутренних органов свидетельствуют о повышении резистентности организма рыб. Применение «Зоонорма» с комбикормом в течение 10 дней обеспечивает устойчивое снижение уровня контаминации внутренних органов рыбы. Препараты «Зоонорм» и «Бифидум – СХЖ» обеспечивают лечебный эффект, детоксикацию организма мальков и годовиков окской стерляди и увеличение массы тела также в течение 10 дней. В условиях развития интенсивного рыбоводства такие препараты являются наиболее перспективными и экологически безопасными.

Таблица 4

Эффективность выращивания годовиков окской стерляди при использовании препаратов «Бифидум – СХЖ» и «Зоонорм»

Условия содержания и кормления	Число экземпляров исходное / после опыта	Масса тела, г (Me±J ₉₅)		Прирост массы	
		исходная	через 10 дней	грамм	%
Контроль 1, комбикорм, басс. № 11	60/60	142,0 (140,0 + 145,0)	149,0 (146,0 + 152,0)	7,0	4,9
Контроль 2, комбикорм, басс. № 15	60/60	142,0 (139 + 144,0)	156,0 (152,0 + 158,0)	14,0	9,9
Опыт 1, комбикорм ++ «Зоонорм», басс. № 1	60/60	139,0 (137,0 + 142,0)	165,0 (160,0 + 167,0)	26,0	18,7
Опыт 2, комбикорм ++ «Бифидум-СХЖ», басс. № 2	60/60	142,0 (137,0 + 150,0)	162,0 (159,0 + 165,0)	20,0	14,0

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселёв А.Ю. Выращивание товарного осетра в условиях замкнутых рыбоводных установок. // Мат. межд. симп. «Итоги тридцатилетнего развития рыбоводства на тёплых водах и перспективы на XXI век. Москва 1998». – СПб.: ГосНИОРХ, 1998. С. 134 – 139.

2. Карасева Т.А., Воробьёва Н.К., Лазарева М.А. Влияние препарата «сухая бактериальная культура ацидофильной палочки» на здоровье и рост радужной форели // Тез. докл. науч. практ. конф. «Марикультура Северо-Запада России». Мурманск. 2000. С. 22 -23.

3. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Бычкова Л.И. Перспективы использования субалина для коррекции микрофлоры кишечника и профилактики БГС // Тез. докл. науч. практ. конф. «Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре». М.: МИК, 2000. С. 133 -136.

EFFICIENCY OF APPLICATION OF PROBIOTIC PREPARATIONS «ZOONORM» AND «BIFIDUM-SHZH» ON MOZHAISK PEFF

E.S.Trifonova, L.I.Bychkova, L.N.Juhimenko, V.D.Bolotov

Materials of researches of efficiency of influence of probiotic preparations «ZOONORM», «BIFIDUM-SHZH»

on rates of growth, a survival, contamination of tissues and organs by microorganisms on an example of newly-hatched fish and yearling of Oka sterlets are analyzed. Increase of rates of growth, a survival and decrease of microbic semination of internal organs tissues are shown at use of probiotics in structure of mixed fodders.

УДК 639.553.2

**ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОГО
ПРЕПАРАТА – БИФИЛАКТРИНА НА РАННЕЙ
СТАДИИ ВЫРАЩИВАНИЯ БЕСТЕРА**

**Филиппова О.П., Бычкова Л. И., Трифонова Е.С.,
Мягких Ф.Ф.**

1 - ВНИРО, 2 - МГУТУ, 3 - ФГУ «Мосрыбвод», 4 - ЗАО «Партнер»

Приведены данные исследования влияния кормления пробиотическим препаратом – бифилактрином - на темпы роста и выживания личинок бестера после перехода их на активное питание. Кормление рыб пробиотиком осуществляли в течение 10 дней, а наблюдение за ростом и выживанием – по истечении 20 дней после начала опыта. Показано увеличение выживаемости личинок в опыте на 20% по сравнению с контролем.

Бестер - единственный представитель осетровых рыб, существование которого в аквакультуре поддерживается уже более 40 лет, с репродукцией четырёх поколений. По рыбо-водно-хозяйственным качествам он выгодно отличается как от исходных видов - белуги и стерляди, так и от конкурирующих с ним в хозяйственном отношении других видов осетровых. Внешний вид и вкусовые качества икры и мяса бестера значительно лучше, чем исходных видов. В настоящее время для товарного выращивания используются гибриды бестера 2-го, 3-го и 4-го поколений [3, 4].

Переход на активное питание - один из наиболее сложных этапов в технологии выращивания осетровых рыб. Именно в этот период наблюдается максимальная гибель личинок осетровых. Известно, что у бестера - гибрида между белугой и стерлядью - при переходе на активное питание смертность личинок составляет 50%, а у потомства от самок 1-го поколения она может быть и выше [2]. В целях повышения выживаемости молоди рыб на ранних этапах онтогенеза в практике рыбоводства широко применяются

пробиотики [1, 3, 4].

Действие таких препаратов основано не только на элиминации патогенной микрофлоры кишечного тракта рыбы (снижение или полное вытеснение), но и на улучшении процессов пищеварения и усвоения корма за счёт активизации пищеварительных ферментов. Одной из наиболее важных функций пробиотиков является продуцирование комплекса биологически активных веществ, способных нейтрализовать токсины бактерий, опасные метаболиты [5].

Экспериментальная работа проводилась на рыбоводном заводе ЗАО «Казачка» Ростовской области. Цель – определить влияние пробиотического препарата «Бифилактрина» на выживаемость и темпы роста бестера после перехода его на активное питание. В опытах использовали личинок бестера (после перехода их на активное питание). В качестве пробиотика использовали новый пробиотический препарат – бифилактрин, предоставленный ЗАО «Партнер». Препарат содержит живые бифидобактерии, иммобилизованные на сорбенте и лактобактерии. Одна доза препарата содержит не менее 10^8 живых бактерий. Для эксперимента отбирали потомство от самки ВС I-го поколения 1967 года рождения (9 нерест). Рыбоводная икра была получена 15.04.04г.

Продолжительность эксперимента составляла 10 дней (с 1 по 10 мая). В этот период содержание кислорода в воде было невысоким и составляло на входе в бассейн 5 мг/л и на выходе 2-3 мг/л. В первый бассейн с личинкой вносили необходимое количество корма с бифилактрином, личинка бестера другого бассейна служила контролем. В качестве стартовых кормов использовали датские корма фирмы «Aller Aqua».

В первые 5 дней давали корм крупкой 00, а вторые 5 дней крупкой 0, из расчёта 30% корма от общей массы тела личинок гранулированного корма и дополнительно 30% декапсулированных яиц артемии, что соответствует нормативам, разработанным во ВНИРО. Рыбу кормили 10 раз в день через каждые 2 часа и заканчивали кормление в 24 часа. Расход препарата на суточное количество корма составил не менее 10^8 живых бактерий. На начальном этапе кормления часть личинок сразу перешла на питание присутствующей дафнией. У личинок уже были сформированы челюстные зубы, предшествующие переходу личинок на экзогенное питание. Функционирование пищеварительной системы у осетровых рыб начинается ещё до полной резорбции желтка.

На четвертый день эксперимента (04.05.04) отмечался массовый переход личинок на активное питание. Одновременно с этим в течение 5 дней в каждом бассейне начали регистрировать и их массовую гибель по 500 шт. Контрольный облов, проведенный 9 мая, показал, что средняя масса рыб в опытном и контрольном бассейнах достигла 50 мг. Дальнейшее наблюдение за рыбой показало, что, начиная с 10 мая, гибель личинок в опытном бассейне составила 150 шт. в день, тогда как в контроле она была выше и составляла 400 шт. личинок в день. Начиная с 12.05.04г. гибель в опытном бассейне практически прекратилась, а в контроле снизилась до 100 шт. в день (см. Рисунок). Когда вся рыба в эксперименте 12 мая была поштучно пересчитана, то отметили, что выживание в опыте составило 70%, а в контроле 60%. Средняя масса личинок была одинакова как в контроле, так и в опыте и составила 55 мг. В дальнейшем их отход в опытном бассейне практически прекратился по сравнению с контрольным. Разницы в массе тела рыб за такой короткий период времени не отмечено.

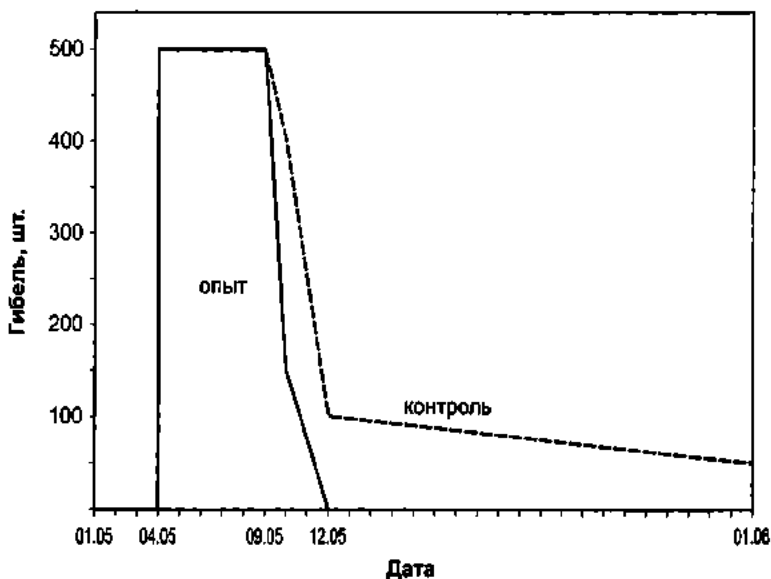


Рис. Влияние бифилактрина на выживаемость личинок бестера.

Следует отметить, что при переходе личинок бестера на активное питание в начале эксперимента наблюдали дей-

ствии пониженной температуры. Для бестера оптимальная температура воды на этом этапе должна составлять 22-24°C. Однако средняя температура воды в начале эксперимента была 14°C - 15°C. Плавное повышение температуры отмечали с 5-го дня эксперимента. Дальнейшее наблюдение за рыбой показало, что после эксперимента (с 12 мая) гибель личинок в опытном бассейне прекратилась. В последующие дни в контрольном бассейне отмечено снижение их гибели до 50 штук в день. Следовательно, положительное действие препарата бифилактрина на рыбу не ограничилось временем проведения эксперимента и продолжало воздействовать и дальше. Контрольные взвешивания, проведенные 20 и 30 мая, показали, что средняя масса тела рыб составила (20 мая) в опыте 0,3 г, а в контроле - 0,25 г; на 30 мая в опыте - 1,0 г, в контроле - 0,9 г. Кормовой коэффициент примерно был равен 1. Отмечена незначительная разница в массе тела рыб опытной и контрольной групп. Окончательный подсчет рыбы при облове 1 июня показал, что в контрольном бассейне суммарное количество погибшей рыбы составило 50%, а в опытном бассейне - 30%.

Таким образом, разница в выживании рыб этих групп на самом сложном этапе составила 20%. Учитывая, что эксперимент проводился не в замкнутой системе, где потери корма на первых этапах были значительные, а температура воды не отвечала нормативным требованиям, полученный результат является положительным. Пробиотический препарат бифилактрин действительно оказывает благотворное воздействие на личинок и молодь бестера и может быть рекомендован для выращивания осетровых рыб в искусственных условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карасева Т.А., Воробьева Н.К., Лазарева М.А. Влияние препарата «сухая бактериальная культура ацидофильной палочки» на здоровье и рост радужной форели // Тез. докл. науч.-практ. конф. «Марикультура Северо-Запада России». Мурманск, 2000. С. 22 - 23.

2. Крылова В.Д. Ранние этапы развития гибрида второго поколения между белугой и стерлядью // Тр. ВНИРО. 1970. Т. 76. С. 231-237.

3. Трифонова Е.С., Бычкова Л.И., Юхименко Л. Н., Гаврилин К.В. Применение пробиотиков для компенсации воздействия агрессивных факторов водной среды при выращи-

вании осетровых рыб в системах с замкнутым водоснабжением // Сб. тез. Всеросс. Научно-практ. конф. «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов». Россельхозакадемия, 2003. С. 130 – 131.

4. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Бычкова Л.И. Перспективы использования субалина для коррекции микрофлоры кишечника и профилактики БГС // Тез. докл. науч.-практ. конф. «Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре». М.: МИК, 2000. С. 10 – 13.

5. Hansen G.H. u Olafsen J. A. Bacterial interactions in early life stadies of marine cold water fish.// Microb. Ecol. 1999. 38 (1). P. 1 - 26.

**EXPERIENCE OF USE OF THE PROBIOTIC
PREPARATION - BIFILAKTRIN –
AT THE EARLY STAGE OF CULTIVATION OF BESTER
Filippova O.P., Vychkova L.I., Trifonova E.S., Soft Ф.Ф.**

The given researches of influence of feeding by probiotic preparation - bifilaktrin - on rates of growth and a survival of bester larvae after their transition to an active feed are given. Feeding of fishes probiotic carried out within 10 days, and supervision over growth and a survival - after the expiration of 20 days after the beginning of experience. The increase of survival rate of larvae in experience on 20 % is shown in comparison with the control.

ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ КЛАРИЕВОГО СОМА

CLARIAS GARIPINUS

В ИСКУССТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

А.М. Наумова¹ К.В. Ковалев²

Межведомственная Ихтиологическая комиссия, МСХА

Московская сельскохозяйственная академия

им. К.А. Тимирязева

Москва, Россия, mik-com@yandex.ru

Африканский (клаеривый) сом является перспективным объектом аквакультуры, успешно выращиваемым в установках с замкнутым циклом водообеспечения. В литературе указано на высокую жизнестойкость этих рыб в естественных условиях, однако в искусственных условиях для его эффективного выращивания необходим экологический и физиологический контроль.

Проведено паразитологические, бактериологические и гематологические исследования клариевого сома, а также гидрохимические и санитарно-бактериологические исследования воды при содержании этих рыб в искусственных условиях. При проточности гидрохимические и санитарно-бактериологические показатели воды соответствовали нормативам: ОМЧ (общее микробное число) $1,8 \cdot 10$ КОЕ/мл, NH₄ – 0,85 мг/л, окисляемость 8,0 мгО/л. Гематологические показатели рыб были также в норме: Hb – 10 г/%, СОЭ – 9,5 мм/ч. Возбудители инфекций и инвазий не выявлены. В отсутствии проточности, при частичной смене воды в рыбоводных емкостях ухудшались санитарно-бактериологические показатели воды: ОМЧ повышался – до $1,8 \cdot 10^3$ КОЕ/мл. При совместном содержании с золотыми рыбками, зараженными дактилогирусами, происходило заражение *Clarias garipinus*. Интенсивность инвазии была единичной, при экстенсивности до 40 %. При этом у зараженных рыб ухудшались показатели крови в сравнении с незараженными оставаясь на грани норматива: Hb на 12% ($7,9 \pm 0,05$ г/%), СОЭ в 2 раза ($12,5 \pm 3,7$ мм/ч). Бактериологическими исследованиями рыб возбудители инфекции не выявлены.

Проведенные исследования показали, что для успешного содержания клариевых сомов в искусственных условиях необходимо поддерживать постоянную проточность для обеспечения благоприятного гидрохимического и бактериологического режимов и избегать совместного содержания с рыбой, зараженной паразитами.

**ECOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL CONTROL
CLARIAS GARIPINUS IN ARTIFICIAL CONDITIONS**

A.M. Naumova, K.V. Kovalev

*Interdep. Ichtilological Commission, (MSHA),
Moscow Agricultural Academia K.A. Timirjazeva,
Moscow, Russia mik-com@yandex.ru*

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие.....	3
Часть I. Вопросы общей и частной иммунологии.....	6
<i>Микряков В.Р.</i> Вклад д.б.н. Г. Д. Гончарова в становление и развитие инфекционной патологии и иммунологии рыб.....	6
<i>Галактионов В. Г.</i> Эволюционное развитие суперсемейства иммуноглобулинов.....	12
<i>Кондратьева И.А., Китацов А.В., Киташова А.А., Криксунов Е.А.</i> Иммуный статус гидробионтов Белого моря в норме и при стрессе.....	30
<i>Балабанова Л.В., Микряков В.Р.</i> Изменение специфических и неспецифических показателей иммунитета при инфильтрационных способах вакцинации карпа против аэромонады.....	50
<i>Богдан В.В., Смирнов Л.П., Юхименко Л.Н.</i> Особенности липидного обмена у иммунизированных голодающих и питающихся карпов при спонтанном аэромонозе.....	54
<i>Валедская О. М.</i> Результаты изучения иммунного статуса рыб дельты Волги и рекомендации по их использованию.....	62
<i>Гаверилин К.В., Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И.</i> Специфическая иммунопрофилактика аэромонадной инфекции карпа (<i>Cyprinus carpio</i> L.).....	73
<i>Заботкина Е.А., Балабанова Л.В., Микряков В.Р.</i> Особенности реакции иммуноцитов на иммунизацию рыб корпускулярным и растворимым антигеном: ультраструктурные исследования.....	81
<i>Заботкина Е.А., Бубенкова Е. В., Назарова Е. А.</i> Влияние сублетальных концентраций ионов кадмия на структуру иммунокомпетентных органов карпа.....	92
<i>Кузьмина В.В., Шишин М.М., Смирнова Е.С.</i> Влияние тяжелых металлов на функцию неспецифической защиты пищеварительного тракта рыб.....	101
<i>Ланирова Т.Б., Балабанова Л.В., Микряков В.Р.</i> Влияние ионов кадмия на некоторые показатели иммунореактивности обыкновенного карпа (<i>Cyprinus carpio</i> L.).....	112
<i>Микряков Д.В., Микряков В.Р., Попов А.В.</i> Реакция лейкоцитов карася <i>Carassius carassius</i> . L. на воздействие дексаметазон-фосфата.....	123
<i>Микряков В.Р., Попов А.В., Половкова С.Н.</i> Структурно-функциональные изменения в иммунной системе рыб оз. Неро в связи с загрязнением воды пестицидами.....	132
<i>Смирнов Л.П., Богдан В.В., Немова Н.Н., Юхименко Л.Н.</i> Биохимическая вакцина против бактериальных болезней рыб.....	144
<i>Степанова В.М., Микряков В.Р.</i> Влияние избытка аммония и	

недостатка кальция на субпопуляции лимфоцитов карпа (<i>Surginus carpio</i> L.).....	153
<i>Субботкина Т. А., Субботкин М. Ф.</i> Уровень лизоцима у некоторых видов хищных рыб.....	159
<i>Терещенко В.Г., Микряков Д.В., Микряков В.Р.</i> Опыт применения индекса Шеннона для оценки дестабилизационных процессов в составе лейкоцитов рыб.....	168
Часть II. Вопросы общей и частной патологии.....	183
<i>Макрушин А.В.</i> Природа разрушений в организме, наблюдаемых при воспалении, неоплазии и старческой инволюции.....	183
<i>Запруднова Р.А.</i> Стресс и болезни: изменения в системе водно-солевого равновесия у пресноводных рыб.....	192
<i>Микулин А.Е., Микодина Е.В.</i> Энкефалины как эндогенные регуляторы адаптивного ответа на изменения факторов внешней среды.....	211
<i>Головин П.П., Головина Н.А., Романова Н.Н.</i> Адаптивные физиолого-биохимические реакции рыб на резкие температурные изменения воды.....	235
<i>Васильев А.С., Буйневич А.В.</i> Морфопатологический анализ состояния органов и тканей массовых видов рыб Рыбинского водохранилища.....	243
<i>Высоцкая Р.У., Иешко Е.П., Евсеева Н.В.</i> Изучение роли некоторых лизосомальных и цитоплазматических ферментов в адаптационных механизмах системы <i>Schistocephalus solidus</i> (Cestoda) – колюшка трехиглая <i>Gasterosteus aculeatus</i> L.....	252
<i>Валова В.Н., Панченко Е.А., Асеева Н.Л.</i> Оценка физиологического состояния молоди кеты (<i>Oncorhynchus keta</i>), выпускаемой лососевыми рыбоводными заводами Приморского края.....	262
<i>Гаврюшева Т.В.</i> Гистопатологические изменения при алиментарном токсикозе у искусственно выращиваемых мальков тихоокеанских лососей на рыбоводных заводах Камчатки.....	276
<i>Голованова И.Л.</i> Влияние повышения температуры воды и содержания ртути в корме на устойчивость пищеварительных карбогидраз карпа к действию тяжелых металлов.....	287
<i>Дуркина В.Б.</i> Состояние половых и интерреналовых желез у полосатой камбалы <i>Pleuronectes pinnifasciatus</i> из Амурского залива Японского моря.....	295
<i>Любаев В.Я., Микулин А.Е., Старостина Ю.В., Самсонова М.В., Лаптева Т.И.</i> Биохимический состав сеголетков кеты (<i>Oncorhynchus keta</i> (Walbaum)) и кижуча (<i>Oncorhynchus kisutch</i> (Walbaum)) при смене среды обитания.....	304
<i>Никифоров-Никишин А.Л., Никифоров-Никишин Д.Л., Симаков</i>	

<i>Ю.Г., Бородин А.Л.</i> Гистологические и гистохимические особенности строения хрусталика пескаря (<i>Gobio gobio, gobio L.</i>).....	316
<i>Никифоров-Никишин А.Л., Никифоров-Никишин Д.Л., Симаков Ю.Г., Бородин А.Л.</i> Особенности строения хрусталика ротанголовешки, <i>Percottus glehni</i> , Dybowski, 1877.....	322
<i>Никифоров-Никишин А.Л., Симаков Ю.Г., Бородин А.Л.</i> Морфологические и гистологические изменения в хрусталике рыб при диплостомозе.....	331
<i>Размашкин Д.А., Бурундукова Т.С.</i> Причины и условия возникновения вспышки алиментарно-токсической пароксизмальной миоглобинурии в Тюменской области.....	338
<i>Силкина Н.И., Микряков В.Р.</i> Некоторые особенности перекисного окисления липидов в системе паразит-хозяин на примере <i>Ligula intestinalis</i> (Cestoda, Pseudophyllidea) – <i>Abramis brama</i> (L.).....	349
<i>Симаков Ю.Г., Никифоров-Никишин А.Л., Бородин А.Л.</i> Ингибиторы клеточной пролиферации в хрусталиках рыб и амфибий.....	358
<i>Чеботарева Ю.В., Таликина М.Г., Изюмов Ю.Г.</i> Некоторые гематологические показатели молоди плотвы <i>Rutilus rutilus</i> (Cypriniformes, Cyprinidae) после воздействия токсикантов на спермии производителей.....	369
<i>Широков Д.А.</i> Результаты исследований загрязняющих веществ на шельфе северо-востока Сахалина в 2002 году.....	378
Часть III. Болезни рыб и охрана здоровья гидробионтов.....	389
<i>Щелкунов И.С.</i> Весенняя вирусемия и другие рабдовирусные болезни рыб: от иммунологических к молекулярно-генетическим методам диагностики.....	389
<i>Бочкова Е.В., Рудакова С.Л.</i> Инфекционный некроз гемопозитической ткани (ИНН) в популяции нерки <i>Oncorhynchus nerka</i> (Walbaum) озера Начикинское (Камчатка).....	404
<i>А.Е. Мисулин</i> Инфекционный некроз гемопозитической ткани лососевых рыб (ИНГТ), этиология и предполагаемые меры борьбы.....	416
<i>Нечаева Т.А., Есеева Н. В., Антипова Н.А.</i> Бактериальные болезни радужной форели в условиях рыбоводных хозяйств Северо - Запада России.....	420
<i>Барская Ю.Ю., Нешко Е.П.</i> Паразитофауна лососевидных рыб водоемов национального парка «Паанаярви».....	430
<i>Линёва Г.П.</i> Паразитологические исследования икры кеты на Паратунском экспериментальном лососевом рыбноводном заводе.....	437
<i>Линёва Г.П., Корнеева С.А., Гаврюсева Т.В.</i> Микроспоридия	

<i>Pleistophora</i> sp. у производителей и молоди тихоокеанских лососей на рыбоводных заводах Камчатки.....	441
Шестаковская Е.В., Стрижакова Т.В., Казарникова А.В., Подзорова А.А., Низова Г.А., Безгачина Т.В. Мониторинг паразитов, потенциально опасных для здоровья человека, у промысловых рыб Азовского бассейна.....	447
Голованов В.К. Методологические аспекты лечения и профилактики болезней рыб с использованием температурного фактора.....	456
Антонов А.А., Ким Х.Ю., Руднев В.А., Микулин А.Е. Изменения численности смежных поколений горбуши и состояние ее запасов в заливе Анива острова Сахалин.....	464
Калайда М.Л. Роль экологических факторов в заболеваемости судака и берша.....	477
Казарникова А.В., Шестаковская Е.В. Методы поддержания здоровья осетровых рыб при заводском получении и товарном выращивании в современных условиях.....	486
Наумова А.Ю. Современные экологически безопасные методы борьбы с болезнями рыб.....	495
Самарский В.Г., Любаев В.Я., Микулин А.Е. Последствия разнокачественности икры в онтогенезе кеты <i>Oncorhynchus keta</i> (Walbaum, 1792).....	504
Трифонова Е.С., Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н., Болотов В.Д. Эффективность применения пробиотических препаратов «ЗООНОРМ» и «БИФИДУМ - СХЖ» на Можайском ПЭРЗ.....	528
Филиппова О.П., Бычкова Л.И., Трифонова Е.С., Мягких Ф.Ф. Опыт использования пробиотического препарата – бифилактрина на ранней стадии выращивания бестера.....	534
Наумова А.М., Ковалев К.В. Экологический и физиологический контроль при выращивании клариевого сома <i>Clarias garipinus</i> в искусственных условиях	539

ПРОБЛЕМЫ ИММУНОЛОГИИ, ПАТОЛОГИИ И ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ РЫБ

**Расширенные материалы
Всероссийской научно-практической конференции**

Ответственные за выпуск:
академик А.М. Смирнов (РАСХН);
д.б.н., проф. В.Р. Микряков (ИБВВ РАН);
д.б.н., проф. С.И. Никоноров (МИК);
д.б.н. А.М. Наумова (МИК, ВНИИР РАСХН);
к.б.н. А.Л. Никифоров-Никишина (МГУТУ);
к.б.н. Е.А. Заботкина(ИБВВ РАН).

Частное издательство
ООО «Газеты Авошь-ка», 2004.
Председатель совета директоров Б.В. Хайтович.
Генеральный директор М.Е. Фрейнк.

Типография ООО «Газета Авошь-ка»
Смоленская обл., г. Десногорск, 2 м-он, Дом быта.
Лицензия ПД №8-0058 от 7.06.2001
Формат 60*84, 1/16. Тираж 200 экз.
Печать офсетная. Заказ № 904.